



**HAL**  
open science

# La globozoospermie, des mécanismes moléculaires à de nouvelles stratégies thérapeutiques

Sandra Yassine

► **To cite this version:**

Sandra Yassine. La globozoospermie, des mécanismes moléculaires à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Biologie du développement. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV008 . tel-01271051

**HAL Id: tel-01271051**

**<https://theses.hal.science/tel-01271051v1>**

Submitted on 8 Feb 2016

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie de développement-Oncogenèse**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Sandra YASSINE**

Thèse dirigée par **Christophe ARNOULT**

Préparée au sein de l'**Institut Albert Bonniot, Equipe GETI**

Dans l'**École Doctorale de Chimie et Science du Vivant**

## **La globozoospermie, des mécanismes moléculaires à de nouvelles stratégies thérapeutiques**

Thèse soutenue publiquement le **30 octobre 2015**

Devant le jury composé de :

**Monsieur Guillaume HALET**

Chargé de recherche CNRS, HDR, à l'Université de Rennes, Rapporteur

**Monsieur Michael MITCHELL**

Directeur de recherche INSERM à l'Université Aix Marseille, Rapporteur

**Madame Sophie ROUSSEAUX**

Directrice de recherche INSERM, Examineur

**Madame Jessica ESCOFFIER**

Maître de conférences assistant à l'Université de Genève, Examineur

**Madame Sylviane HENNEBICQ**

Professeur à l'UFR de médecine, Université Joseph Fourier, Président

**Monsieur Christophe ARNOULT**

Directeur de recherche CNRS, Directeur de thèse



## Remerciements

*Je souhaite remercier, dans un premier temps, les membres du jury, le Docteur Halet Guillaume, le Docteur Mitchell Michael, le Docteur Rousseaux Sophie et le Docteur Escoffier Jessica pour le temps qu'ils ont accepté de me consacrer afin d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le Professeur Hennebicq Sylviane qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.*

*Je remercie également Docteur Sophie Rousseaux et Docteur serge Bottari, les membres du jury de mon comité de suivi de thèse pour leur disponibilité, leurs conseils et pour les nombreuses discussions scientifiques que j'ai pu avoir avec eux qui m'ont beaucoup apporté.*

*Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude au Docteur Christophe Arnoult, mon directeur de thèse pour avoir dirigé ce travail, pour ses conseils, son encouragement et sa disponibilité. Je le remercie aussi pour la confiance qu'il m'a accordée et pour l'opportunité qu'il m'a donnée de réaliser cette thèse dans le domaine de l'infertilité qui m'a toujours passionné. Je le remercie pour la qualité de son encadrement sur le plan scientifique qu'humain. Je le remercie encore pour sa présence, son investissement, ses explications claires dès que j'avais une question et pour son écoute malgré ses nombreuses charges. Son encadrement m'a permis de mener cette thèse à son terme avec des publications.*

*Je tiens à remercier Jessica Escoffier, ancienne post-doc du laboratoire pour l'attention et le soutien qu'elle m'a accordés pendant ma thèse et pour avoir partagé avec moi tout son expérience et ses compétences. Je la remercie pour avoir répondu à toutes mes interrogations et pour son encouragement.*

*J'adresse ma plus sincère reconnaissance à Dr Roland Abi Nahed, un ami très proche et un collègue au laboratoire avec lequel j'ai partagé 3 ans de paillasse et de très bons souvenirs. Je le remercie pour son amitié, son aide, son soutien pendant mes périodes de doutes et pour ses multiples encouragements répétés. Je te remercie de me donner un coup de main pour que je puisse réaliser mes expériences scientifiques à temps pendant toute la durée de ma thèse et plus particulièrement durant les derniers mois de rédaction qui n'ont pas toujours été des plus agréables. Merci pour ta patience et pour le temps que tu m'as accordé pour écouter ma présentation orale. Je te souhaite une très bonne continuation et une vie pleine de joie et de réussite avec ton nouveau post-doc.*

*Je remercie également Jihad Karroum, un ami très proche et un frère, pour sa bonne humeur, son support et sa gentillesse. Je le remercie pour son soutien quotidien réconfortant surtout pendant la période de rédaction, pour les belles mémoires. Je te souhaite un avenir plein de succès et de bonnes choses.*

*Je remercie aussi Guillaume Martinez mon collègue au laboratoire, pour sa bonne humeur et sa légèreté et le nombre de fois qui nous a fait peur au labo !!*

*Je remercie également tout les membres de l'équipe GETI pour leur soutien, leur aide et leur accueil surtout Dr Pierre Ray qui m'a toujours encouragé et donné des précieuses conseils.*

*J'adresse mes plus vifs remerciements à toutes les personnes qui ont concouru à rendre cette thèse agréable et pour le climat sympathique dans lequel ils m'ont permis de travailler : Jean pascal, Sevcan, Zin el dine, Marie Christou, Julien, Kevin, Clémentine, Charles Coutton, Sophie Brouillet et Thomas.*

*Je souhaite également remercier mes ami (e)s libanais présents ici à Grenoble et à Lyon pour avoir constitué un grand support moral et pour me constituer une deuxième famille : Mouhanad Massoud, Mohamed Makieh, Wael, Abed, Abir, Elissar Mortada, Sawsan Khoury, racha hallal , Hassan Hallal, Lamas Gattas, Meryam Krit.*

*Je souhaite également remercier mes meilleurs amies au liban Sirine Ahmad et Hiba el Sayed.*

*Je tiens également à remercier mes amies et mes sœurs à Grenoble qui étaient toujours là à mon côté : Hind Basbous, Rida Awad et Mariam el Khatib je les remercie pour leur soutien continu, leur gentillesse. Vous m'avez fourni, tout au long de mon doctorat, un support grandement apprécié. Je vous aime.*

*Une pensée particulière à maha Moussa, une amie très chère avec laquelle je partage le jour de la soutenance, qui était toujours prête à me présenter son support bien qu'elle soit dans la même situation.*

*Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi à mes amis Mahmoud el Hajj chehadé et Ali hajj Hassan qui étaient présents quand j'avais le moindre souci. Je les remercie pour leur support, leur encouragement. Je vous souhaite le meilleur pour l'avenir.*

*Enfin Je voudrais remercier mes parents Hassib Yassine et Leila Yassine, mes deux sœurs Samar Yassine et Leina Yassine, mes deux nièces Lydia et Lia et mon neveu Ahmad et toute ma famille qui ont stressé plus souvent que moi pendant ces trois années. Je vous remercie de m'avoir écoutée, soutenue durant toute ma vie. C'est grâce à vous si j'en suis arrivé jusque là, merci pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté. Je vous aime beaucoup*

# **TABLE DES MATIERES**



# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>7</b>
<b>AVANT PROPOS</b> .....	<b>13</b>
<b>Partie 1 :</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b><i>Chapitre I. La spermatogenèse</i></b> .....	<b>19</b>
1. <i>Description générale de la spermatogenèse</i> .....	19
2. <i>Le déroulement de la spermatogenèse</i> .....	19
3. <i>Le spermatozoïde : gamète fécondant</i> .....	20
4. <i>Anatomie de l'appareil génital masculin chez la souris</i> .....	21
4.1 <i>Organisation des testicules : siège de la production des spermatozoïdes</i> .....	21
4.1.1 <i>Structure histologique des tubules séminifères</i> .....	22
4.2 <i>Organisation de l'épididyme : lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes</i> .....	22
<b><i>Chapitre II. Description de la spermiogenèse et de ses principales étapes...</i></b> 24	
A- <i>Modifications morphologiques ou non nucléaire</i> .....	24
1. <i>Biogenèse de l'acrosome</i> .....	24
1.1 <i>Définition de l'acrosome</i> .....	24
1.2 <i>Les principales étapes de la biogenèse de l'acrosome</i> .....	24
1.3 <i>Importance de l'acrosome</i> .....	26
1.4 <i>Le complexe acrosome-acroplaxome</i> .....	26
2. <i>L'apparition de la manchette</i> .....	29
2.1 <i>Rôle de la manchette.</i> .....	31
3. <i>Interaction Acrosome-Acroplaxome-Manchette-Enveloppe nucléaire et élongation du noyau spermatique</i> .....	33
3.1 <i>Origine extrinsèques et intrinsèques des forces nécessaires à l'élongation nucléaire</i> ....	33
4. <i>La thèque périnucléaire</i> .....	36
5. <i>La globozoospermie</i> .....	37

5.1	Caractéristique de la globozoospermie de type I.....	37
5.2	La globozoospermie, modèle d'étude de la formation de l'acrosome .....	38
5.3	Les gènes impliqués dans la globozoospermie murine et humaine .....	38
5.4	La globozoospermie et le gène DPY19L2.....	41
5.5	Importance de la protéine DPY19L2 pour la formation de l'acrosome .....	41
5.6	Localisation subcellulaire et fonction de la protéine Dpy19L2 .....	42
6.	<i>Remaniement de l'enveloppe nucléaire durant la spermiogenèse</i> .....	43
6.1	Structure et fonction de l'enveloppe nucléaire .....	43
6.2	La lamina nucléaire .....	44
6.3	Les protéines de l'enveloppe nucléaire .....	47
6.4	Rôle du complexe LINC dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire .....	48
<i>B.</i>	<i>Modifications nucléaires</i> .....	60
<i>1.</i>	<i>Restructuration globale du génome du gamète mâle haploïde au cours de la spermiogenèse</i> .....	60
1.1	Organisation de la structure de la chromatine dans une cellule somatique .....	60
1.2	Organisation de la chromatine dans une cellule germinale mâle haploïde.....	70
1.3	Les protéines basiques liant l'ADN spermatique .....	78
1.3.1	Les protéines de transition « TP1 et TP2 » et leur incorporation au cours de la condensation de la chromatine .....	78
<b>Chapitre III. Fécondation et fusion gamétique .....</b>		<b>102</b>
<b>Chapitre IV. L'activation ovocytaire chez les mammifères.....</b>		<b>104</b>
<i>1.</i>	<i>Les différentes hypothèses proposées, expliquant l'augmentation de la <math>[Ca^{2+}]_i</math> au sein de l'ooplasme au moment de la fécondation .....</i>	<i>105</i>
1.1	L'hypothèse de la bombe à calcium .....	105
1.2	L'hypothèse du pore à calcium.....	106
1.3	Hypothèse ligand spermatique/récepteur ovocytaire : Récepteur couplé aux protéines G/PLC $\beta$ , Récepteur à activité tyrosine kinase/PLC $\gamma$ .....	106
1.4	L'hypothèse du facteur spermatique activateur .....	106
<i>2.</i>	<i>Facteur spermatique : une PLC spécifique des spermatozoïdes, PLC zêta .....</i>	<i>108</i>



2.1 Structure/fonction de la PLC $\zeta$ .....	110
2.2 Localisation cellulaire de la PLC $\zeta$ au niveau du spermatozoïde épидидymaire .....	114
2.3 Mécanisme d'action de la PLC $\zeta$ .....	115
2.4 Localisation de la PLC $\zeta$ dans l'ovocyte et translocation nucléaire chez la souris.....	118
2.5 PLC $\zeta$ et fertilité masculine chez l'homme.....	120
2.6 PLC $\zeta$ et infertilité masculine : la globozoospermie.....	121
<b><i>Objectifs de ma thèse</i></b> .....	<b>124</b>
<b>Partie 2:</b> .....	<b>127</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>127</b>
<b><i>Article 1:</i></b> .....	<b>129</b>
<b><i>Article 2:</i></b> .....	<b>149</b>
<b><i>Article 3:</i></b> .....	<b>178</b>
<b><i>Article 4:</i></b> .....	<b>195</b>
<b>Partie 3:</b> .....	<b>213</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSIONS</b> .....	<b>213</b>
<b><i>1. Le signal calcique est indispensable à la réussite de la fécondation et l'initiation du développement embryonnaire</i></b> .....	<b>215</b>
<b><i>2. Activation ovocytaire artificielle et restauration du signal calcique dans le cadre de la globozoospermie</i></b> .....	<b>216</b>
<b><i>3. Effet de l'endommagement du génome paternel sur le développement embryonnaire</i></b> .....	<b>217</b>
<b>CONCLUSIONS:</b> .....	<b>219</b>
<b>PERSPECTIVES :</b> .....	<b>221</b>



# **ABBREVIATIONS**



# Abréviations

## **A**

aa: Acide aminé

ABD: Actin Binding Domain

ADN: Acide désoxyribonucléique

AMP : Assistance médicale à la procréation / Aide médicale à la procréation

AOA: Activation Ovocytaire Artificielle /Assisted Oocyte Activation

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

Azh: Abnormal spermatozoon head shape

## **B**

BAF: Barrier to Autointegration Factor

BET: Bromodomain and Extra Terminal

BRCA1: Breast Cancer Susceptibility Protein

53BP1: p53 Binding Protein 1

## **C**

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> : Concentration intracellulaire d'ion calcique libre

CaMKII : kinase II dépendante de la calmoduline

CICR : Calcium Induced Calcium Release (libération de Ca<sup>2+</sup> induite par le Ca<sup>2+</sup>)

CNELS/NELS: Classic Nuclear Envelope Localization Signal

COMPASS: Complex Proteins Associated with Set1

CpG: Cytosine- Guanine nucleotide-pair

CRE: cAMP response element

Csnk2a2: Casein kinase 2 alpha

Cs-PKA: condensing spermatid-Protein Kinase A

## **D**

DAG: Diacylglycérole

DMED : Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss

## **E**

EN : Enveloppe nucléaire

ENE : Enveloppe nucléaire externe

ENI: Enveloppe nucléaire interne

Extrémité C-ter : Extrémité carboxy-terminale

Extrémité N-ter : Extrémité amino-terminale

## **F**

FerT: Fer Testis protein kinase

FIV: Fécondation *In Vitro*

## **G**

GOPC: Golgi-associated-PDZ and Coiled-Coil motif-containing protein

## **H**

HGPS : Hutchison-Gilford-Progeria Syndrom

HILS1: H1-Like protein in spermatids 1

HP1: Heterochromatin protein 1

Hrb: HIV-Rev-binding protein

HTCA: Head to Tail Coupling Apparatus

## **I**

ICSI : Intracytoplasmic sperm injection ou injection intracytoplasmique de spermatozoïde

IICR: IP3 Induced Calcium Release

IMT: Intra-Manchette Transport

INM-SM: Inner Nuclear Membrane-Sorting Motif

IP3: Inositol 1, 4, 5- triphosphate

IP3R/IP3R1: Récepteur de l'inositol 1, 4, 5- triphosphate

## **J**

JmjC: Jumonji C-terminal domain

KASH: Klarsicht, ANC-1 and Syne Homology

KO: Knock out

## **L**

LAP1: Lamina-associated polypeptide 1

LAP2: Lamina-associated polypeptide 2

LBR: Lamin B Receptor

LINC: LIInker of the nucleoskeleton and the cytoskeleton

## **M**

MAE : Membrane acrosomale externe

MAI : Membrane acrosomale interne

MMP2: Métalloprotéase 2

MOAT: Mouse Oocyte Activation Test

MP : Membrane plasmique

MPF: Maturation promoting factor

MSCI: Meiosis Sex Chromosome Inactivation

MyRIP: Myosin Rab Interacting Protein

## **N**

Nesprine: Nuclear envelope with spectrin repeats proteins

NPC: Nuclear pore complex

## **O**

Ovocyte MII : ovocyte en stade métaphase II de la méiose

## **P**

PARG: Poly ADP Ribose Glycohydrolase

PARPs: Poly ADP-Ribose Polymérase

PFN3: Profilin 3

PFN4: Profilin 4

PIP2: Phosphatidylinositol bisphosphate membranaire

Pick1: Protein interacting with C kinase 1

PKA: Cyclic AMP dependent Protein Kinase

PKC: Protéine kinase C

PLC  $\zeta$ : Phospholipase zeta

PLC: Phospholipase C

PNS: perinuclear space

## **R**

RE: Réticulum Endoplasmique

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

## **S**

S/MAR: Scaffold/Matrix Attachment Regions

Sak57: Spermatogenic cell/ sperm associated keratin5

SCP3 : Protéine du complexe synaptonémale

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

siARN: small interfering RNA

SPACA1: Sperm Associated Antigen 1

SPAG4: Sperm Associated Antigen 4

SPAG4L: Sperm Associated Antigen 4 Like

SUN: Sad1 and UNC-84

SUN-NELS: SUN proteins-Nuclear Envelope Localization Signal

Syne: Synaptic nuclear envelope

## **T**

TOP2B: Topoisomérase II beta

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

## **U**

USP: Ubiquitin Specific Protease

## **W**

WT: Wild Type

## **Z**

ZPBP1: Zona Pellucida Binding Protein 1



# **AVANT PROPOS**



# **AVANT PROPOS**

L'infertilité est un problème majeur de santé publique affectant 15% des couples à l'échelle mondiale (Perrin et al., 2013). D'après l'organisation mondiale de la santé, l'infertilité se définit par l'incapacité d'un couple à procréer après 1 an d'essais de conception sans moyen de contraception, malgré des rapports sexuels fréquents. De nos jours, environ un couple sur sept se heurte à des difficultés de conception et consulte dans un service spécialisé d'aide médicale à la procréation (AMP) afin d'accomplir leur rêve d'enfantement (C. Roux, Berdin, & Amiot, 2014). Lorsqu'une infertilité est avérée, la cause est d'origine masculine dans environ 30 % des cas et mixte pour près de 40 % des couples (Boivin, Bunting, Collins, & Nygren, 2007). Les causes de cette infertilité sont diverses, elles peuvent être environnementales, sociales et/ou génétiques dans la moitié des cas.

Pendant ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à un syndrome d'infertilité masculine sévère qu'est la globozoospermie de type I. Il s'agit d'une tératospermie rare (incidence < 0.1%), caractérisée par la présence dans l'éjaculat des patients de 100% de spermatozoïdes à têtes rondes et dépourvus d'acrosome (Dam, Feenstra, et al., 2007). Ce dernier consiste en une vésicule de sécrétion géante, riche en enzymes protéolytiques et hydrolytiques, qui vont permettre au spermatozoïde de traverser les couches protectrices de l'ovocyte au moment de la fécondation. L'absence d'acrosome chez les patients atteints par la globozoospermie est considérée comme la cause majeure de leur infertilité.

Afin de préciser le contexte physiologique de mon travail, je commencerai cette introduction par un bref rappel du processus de la spermatogenèse chez la souris, ainsi que des principales étapes de la spermiogenèse, étape au cours de laquelle l'acrosome est mis en place. Puis je décrirai les principales causes moléculaires de la globozoospermie, et plus particulièrement l'importance d'une nouvelle protéine Dpy19l2 dans cette pathologie. Je terminerai l'introduction par la description du facteur spermatique impliqué dans l'activation ovocytaire. Dans une seconde partie, je présenterai la problématique sur laquelle j'ai travaillé au cours de ma thèse. Ensuite, j'exposerai mes travaux, et les principaux résultats que j'ai pu obtenir.



**Partie 1 :**  
**INTRODUCTION**



## INTRODUCTION:

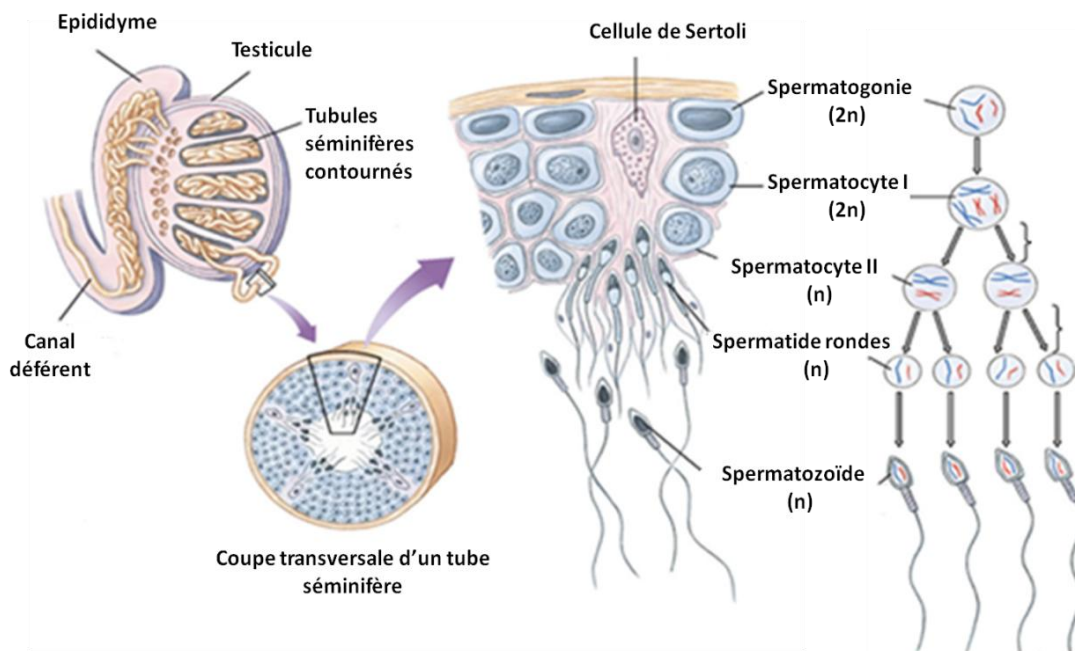
# Chapitre I. La spermatogenèse

### *1. Description générale de la spermatogenèse*

La spermatogenèse est un processus biologique complexe, qui a lieu dans les tubes séminifères des testicules. Elle consiste en la production des spermatozoïdes ou gamètes mâles haploïdes à partir des spermatogonies, cellules souches germinales diploïdes (Tulsiani, Abou-Haila, Loeser, & Pereira, 1998).

### *2. Le déroulement de la spermatogenèse*

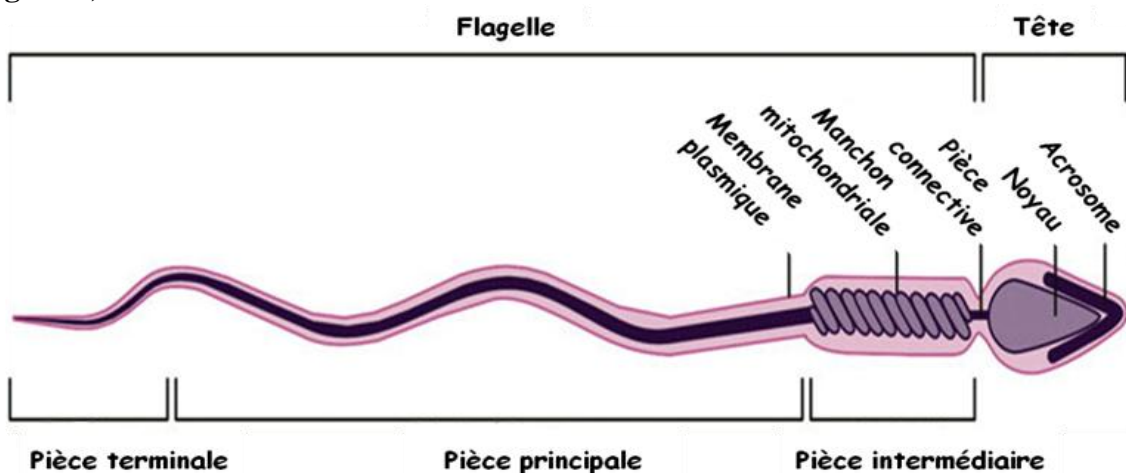
La spermatogenèse débute à la puberté et se déroule d'une façon continue jusqu'à un âge avancé de la vie. C'est un processus lent nécessitant 72-74 jours environ chez l'homme et 35 jours chez la souris. Elle commence à la périphérie des tubes séminifères sur la membrane basale où se trouve une population des cellules souches germinales. Ce sont les spermatogonies de type A. Ces dernières se divisent par mitose: une des cellules filles renouvelle le stock des spermatogonies de type A, l'autre devient une spermatogonie de type B, cette étape est connue comme « **la phase de multiplication** ». Ensuite, les spermatogonies de types B augmentent de volume et donnent des spermatocytes I (toujours diploïdes), c'est « **la phase d'accroissement** » (Kato, Nagata, & Todokoro, 2004; J. Wang et al., 2012). Les spermatocytes I sont le siège de la première division méiotique, appelée aussi division réductionnelle, et se divisent en spermatocytes II haploïdes. Durant la première division méiotique des spermatocytes I, et particulièrement pendant la prophase I, deux processus prennent lieu, qui sont la réplication de l'ADN et la recombinaison homologue. Les spermatocytes II à leur tour se divisent pour donner des spermatides rondes haploïdes. Ces dernières ne se divisent plus et se différencient en spermatozoïdes, c'est la dernière étape de la spermatogenèse dénommée « **spermiogenèse** » (Arimitsu et al., 2011) (**Figure 1**). La progression de la spermatogenèse se fait d'une manière centripète. Les cellules germinales migrent, de la périphérie jusqu'à la lumière des tubules. Lors des divisions cellulaires susmentionnées, la division du cytoplasme n'est pas complète. Les cellules filles restent alors attachées par des ponts cytoplasmiques permettant l'échange des molécules et des protéines indispensables au développement synchronisé de ces cellules (Abou-Haila & Tulsiani, 2000; Huang & Ho, 2006).



**Figure 1:** Les différentes étapes de la spermatogénèse. Adaptée d' (Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014).

### 3. Le spermatozoïde : gamète fécondant

Le spermatozoïde des mammifères est une cellule hautement différencié et mobile. Il est divisé en deux grandes parties, la tête et le flagelle, reliées par une pièce connective ou col (Berruti & Paiardi, 2011). La tête est occupée essentiellement par : le noyau renfermant sous une forme extrêmement condensée le génome paternel et l'acrosome. Le flagelle, représente l'appareil propulseur, indispensable à la mobilité du spermatozoïde. Il est divisé en 3 parties qui sont respectivement : la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Figure 2).





**Figure 2 :** Anatomie du spermatozoïde de mammifère Adaptée de (Borg, Wolski, Gibbs, & O'Bryan, 2010)

#### **4. Anatomie de l'appareil génital masculin chez la souris**

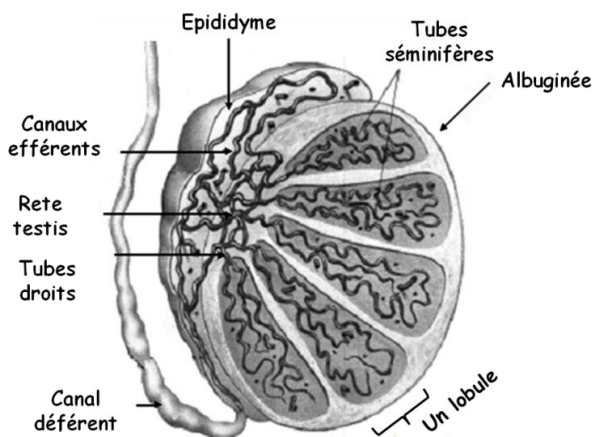
L'appareil génital masculin chez la souris est constitué de différentes structures et organes qui permettent la production, le transport, la maturation, le stockage et l'expulsion des gamètes mâles que sont les spermatozoïdes. Il comprend :

- Les **deux testicules** ayant une double fonction à la fois exocrine (production et émission des spermatozoïdes) et endocrine (synthèse d'androgènes).
- Le **tractus génital** constitué par les voies spermatiques intra-testiculaires (tubes droits et rete testis) et extra-testiculaires : canaux efférents, épидидyme, canal déférent assurant le transport des spermatozoïdes.

Je décrirai l'anatomie des principaux éléments constituant l'appareil génital masculin en respectant le trajet des spermatozoïdes depuis leur production jusqu'à leur émission.

##### **4.1 Organisation des testicules : siège de la production des spermatozoïdes**

Le testicule est un organe pair de forme ovoïde, entouré par une enveloppe épaisse, l'albuginée, qui consiste en une capsule conjonctive fibreuse, dont un épaississement au pôle supérieur forme le rete testis, qui constitue le point de convergence des tubules séminifères. Entre l'albuginée et le rete testis, on trouve des fines cloisons conjonctives délimitant des lobules testiculaires, au nombre de 200 à 300 par testicule. A l'intérieur de chaque lobule, il existe 2 à 3 tubules séminifères très contournés, lieu de formation des spermatozoïdes. Les tubules séminifères de chaque lobule confluent en un tube droit qui vient s'aboucher dans le rete testis. Ce dernier est drainé par des canaux pelotonnés : les canaux efférents qui se prolongent par le canal de l'épididyme, qui devient ultérieurement le canal déférent (**Figure 3**).

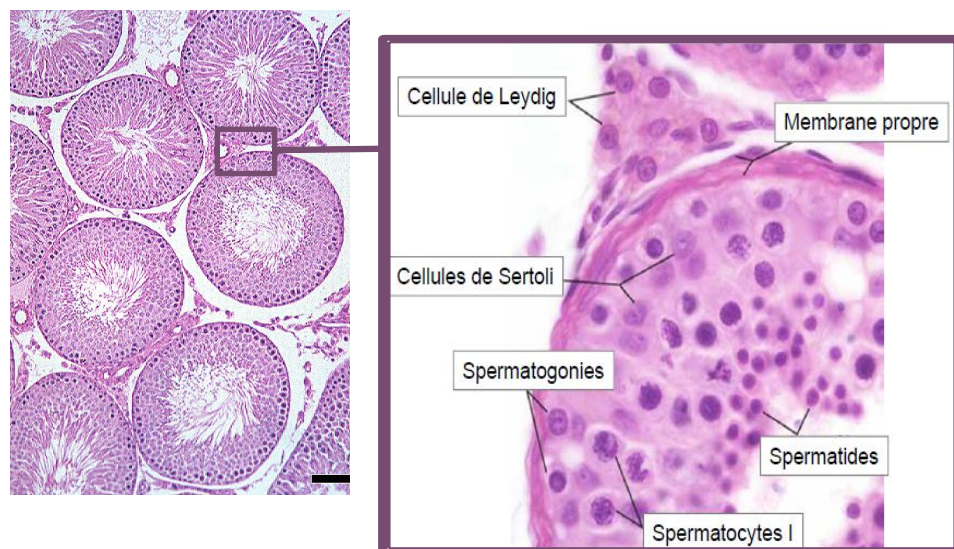


**Figure 3 :** Structure interne du testicule. Le testicule est le lieu de production des spermatozoïdes. Il est entouré d'une couche de tissu conjonctif dense fibreux, l'albuginée, d'où partent à sa face interne de nombreuses cloisons fines, divisant le tissu en lobules. Chaque lobule, contient deux à trois tubes séminifères qui se prolongent par des conduits excréteurs intra-testiculaire (les tubes droits et le rete testis) et extra-testiculaires (les canaux efférents, l'épididyme et le canal déférent) (Adaptée de [www.biotope.net/Schemas/Testicule structure](http://www.biotope.net/Schemas/Testicule%20structure)).

#### 4.1.1 Structure histologique des tubules séminifères

Les tubules séminifères contiennent des cellules de la lignée germinale à différents stades, disposés sur 4 à 8 couches ainsi que des cellules somatiques : « les cellules de Sertoli ». Ces dernières, sont des cellules hautes à contour irrégulier, reposant sur la membrane basale et atteignant la lumière du tubule par leur pôle apical. Elles soutiennent et nourrissent les spermatogonies et sont donc indispensables à la spermatogénèse. Les cellules de Sertoli contribuent également à la libération des spermatozoïdes en fin de spermatogénèse dans la lumière du tubule processus connu sous le nom de «spermiation ». Cette association de cellules germinales et de cellules de Sertoli forme l'épithélium séminifère (O'Donnell & O'Bryan, 2014)

Chaque tubule est entouré par une gaine tubulaire mince formée de la lame ou membrane basale (membrane propre) et de fibroblastes. Entre les tubules séminifères, un tissu conjonctif très vascularisé au sein duquel se trouvent des îlots de cellules endocrines : les cellules de Leydig. Ces cellules sécrètent essentiellement de la testostérone indispensable à la croissance et au bon fonctionnement de l'appareil génital (**Figure 4**).

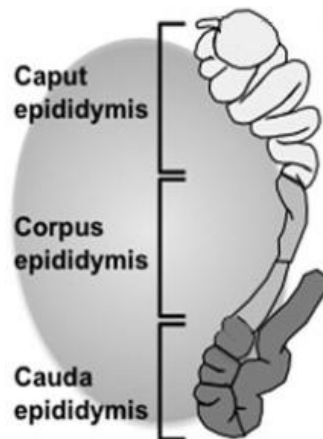


**Figure 4 :** Représentation schématique d'une coupe transversale d'un tube séminifère de testicule de souris adulte : épithélium séminal. (À gauche) : coupes transversales des tubules séminifères de testicule de souris, colorées à l'hématoxyline-éosine. (À droite) agrandissement du carré dans la figure à gauche, représentant la paroi du tube séminifère et les différentes cellules composantes l'épithélium germinale. Adaptée de [www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/h\\_fram20.html](http://www.meddean.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/h_fram20.html) et [www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/malerepro/malerepro.htm](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/malerepro/malerepro.htm)

#### 4.2 Organisation de l'épididyme : lieu de maturation et de stockage des spermatozoïdes

L'épididyme coiffe le testicule et présente à partir du pôle supérieur, trois parties anatomiques et fonctionnelles d'épaisseur décroissantes : la tête « caput », qui reçoit les

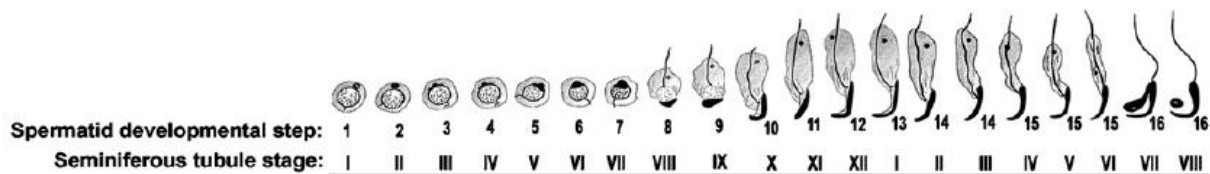
spermatozoïdes des canaux efférents, est située à la face supérieure du testicule, le corps « corpus » et la queue « cauda » qui reposent sur la face postéro-latérale du testicule (**Figure 5**). Il contient deux types de canaux: les cônes efférents, situés dans la tête de l'épididyme, et le canal épидидymaire, où confluent les cônes efférents. Ce canal occupe le corps et la queue et se prolonge hors de l'épididyme par le canal déférent. Chez les mammifères, la durée de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme est variable selon les espèces. Le temps de séjour le plus long correspond au temps de résidence dans la queue de l'épididyme (Aitken & De Iuliis, 2010).



**Figure 5** : Testicule et épидидyme de souris. L'épididyme est divisé en 3 parties d'épaisseur décroissantes. La tête de l'épididyme ou caput, le corps de l'épididyme ou corpus, et la queue de l'épididyme ou cauda. Le transit des spermatozoïdes dans les différentes parties de l'épididyme, est indispensable à leur maturation Adaptée de (Aitken & De Iuliis, 2010)

## *Chapitre II. Description de la spermiogenèse et de ses principales étapes*

La spermiogenèse correspond à la dernière étape de la spermatogenèse (Alvarez Sedo, Rawe, & Chemes, 2012). Elle représente l'ensemble des modifications que subit une spermatide ronde pour aboutir à un spermatozoïde allongé ayant une forme spécifique de l'espèce (Toshimori & Ito, 2003). Ces modifications sont de deux types et peuvent se dérouler d'une manière synchrone. Il s'agit des modifications morphologiques ou non nucléaires ainsi que des modifications nucléaires (Kato et al., 2004). Les différentes étapes de la spermiogenèse varient selon les espèces. Elle comprend 6 étapes chez l'homme, 16 étapes chez la souris et 19 étapes chez le rat (W. Yan, 2009) (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Les différentes étapes de la spermiogenèse chez la souris. Les chiffres arabes correspondent aux différentes étapes de la différenciation de la spermatide ronde en spermatozoïde allongé. Les chiffres romains correspondent aux différents stades du cycle de l'épithélium séminifère. Au cours de la spermiogenèse, des événements majeurs prennent lieu tels que la biogenèse de l'acrosome, la mise en forme du noyau spermatique/élongation de la tête, la compaction de la chromatine et finalement la mise en place du flagelle Adaptée de (W. Yan, 2009).

### *A- Modifications morphologiques ou non nucléaire*

#### *1. Biogenèse de l'acrosome*

##### *1.1 Définition de l'acrosome*

L'acrosome est une vésicule de sécrétion, qui forme un capuchon céphalique entourant les 2/3 antérieurs du noyau spermatique et pourvu d'un équipement enzymatique permettant la traversée de la zone pellucide de l'ovocyte (Abou-Haila & Tulsiani, 2000).

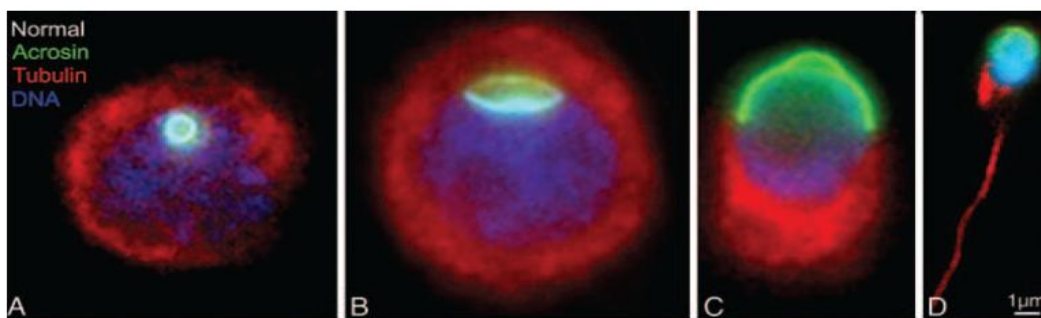
##### *1.2 Les principales étapes de la biogenèse de l'acrosome*

La biogenèse de l'acrosome débute au stade précoce, durant le développement de la jeune spermatide, et peut être divisée en 4 phases : phase de Golgi, phase du capuchon, phase de l'acrosome et la phase de maturation (Alvarez Sedo et al., 2012).

**Phase de Golgi :** Dans la phase Golgienne, de nombreux granules proacrosomaux, bourgeonnent à partir du réseau trans Golgien, présent en position juxta-nucléaire dans le cytoplasme de la spermatide ronde. Ces granules vont ensuite fusionner entre eux pour former une vésicule acrosomale unique, qui commence à se lier au noyau et à l'envelopper (Ramalho-Santos, Schatten, & Moreno, 2002). Cette phase se déroule des stades 1 à 3 de la spermiogenèse chez la souris.

**Phase du capuchon :** Durant cette étape, la vésicule acrosomale commence s'élargir et s'étaler sur le pôle antérieur du futur spermatozoïde, dû au flux continu des vésicules proacrosomales. Sa membrane s'étend le long de la membrane nucléaire formant ainsi la coiffe céphalique ou capuchon. A ce moment, l'appareil de Golgi devient inactif et migre par la suite vers le pôle postérieur de la cellule (Ramalho-Santos, Moreno, Wessel, Chan, & Schatten, 2001). Cette phase se déroule des stades 4 à 7 de la spermiogenèse chez la souris.

**Phase de l'acrosome et phase de maturation:** L'acrosome est ainsi formé, avec une membrane acrosomale externe (MAE) du côté de la membrane plasmique (MP), une membrane acrosomale interne (MAI) du côté de l'enveloppe nucléaire (EN) et une matrice acrosomale riche en enzymes, qui apparaît comme une structure dense en microscopie électronique (Buffone, Foster, & Gerton, 2008) (Funaki et al., 2013). L'acrosome acquiert ensuite sa forme définitive spécifique de chaque espèce, à la fin de la phase de maturation (Moreno, Palomino, & Schatten, 2006) ; (Huang & Ho, 2006) (**Figure 7**).



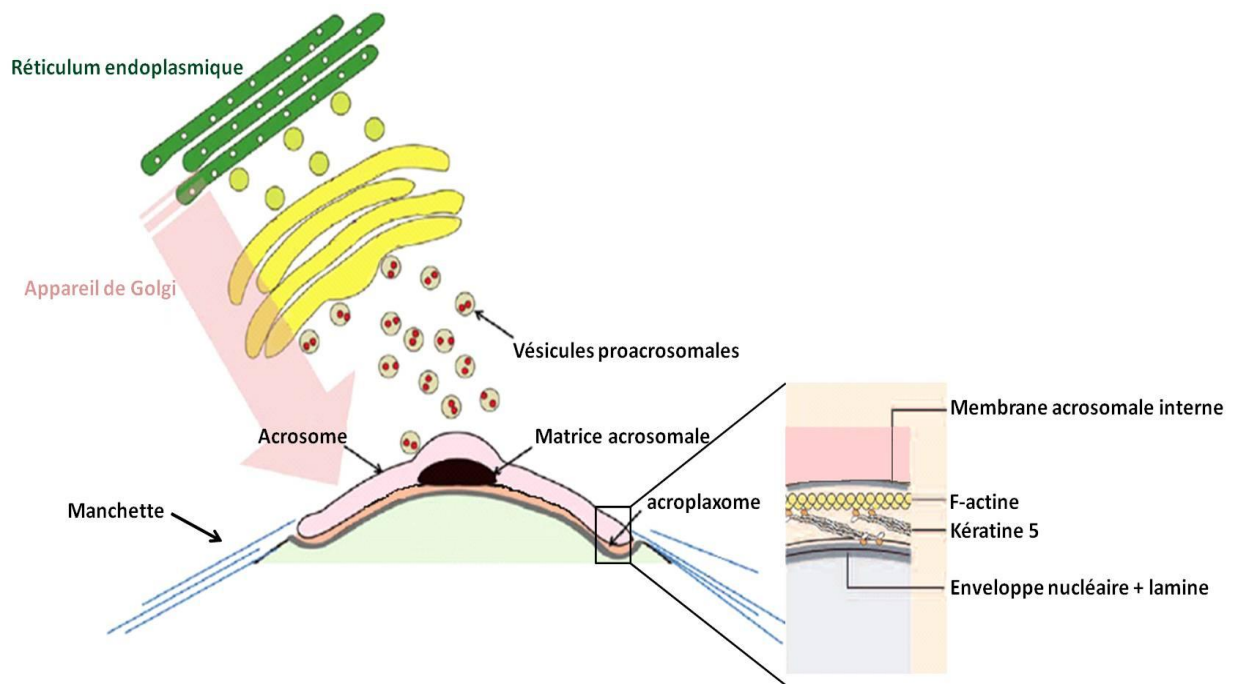
**Figure 7 :** Les différentes étapes de la biogenèse de l'acrosome lors de la spermiogenèse chez l'homme. Les figures (A-D) représentent le développement de l'acrosome allant de la jeune spermatide jusqu'au stade spermatozoïde mature. Ces étapes sont observées en microscopie à fluorescence, en suivant la distribution de l'acrosine (signal vert), une protéine qui appartient à la matrice acrosomale, utilisée pour évaluer le développement de l'acrosome. Le noyau de la spermatide est coloré au DAPI (signal bleu) et le cytosquelette périnucléaire (signal rouge) est identifié en utilisant un anti-tubuline Adaptée de (Alvarez Sedo et al., 2012)

### ***1.3 Importance de l'acrosome***

L'importance de l'acrosome est due à sa richesse en enzymes hydrolytiques et protéolytiques, tels que des protéases comme la proacrosine (Mao & Yang, 2013), la métalloprotéase 2 (MMP2) (Ferrer, Rodriguez, et al., 2012), des estérases, des phosphatases, des glycohydrolases, et des hyaluronidases tel que la protéine PH-20, située au niveau de la membrane plasmique du spermatozoïde ainsi qu'au niveau de la membrane acrosomale interne (Yudin, Vandervoort, Li, & Overstreet, 1999). Elle lui permet de déstabiliser la matrice extracellulaire, riche en acide hyaluronique, liant les cellules folliculaires du cumulus entourant l'ovocyte (Y. Lin, Mahan, Lathrop, Myles, & Primakoff, 1994). Ces enzymes interviendront d'une manière cruciale dans la traversée des enveloppes protectrices de l'ovocyte, ainsi que dans la progression dans l'espace périvitellin en vue de la fusion des deux gamètes.

### ***1.4 Le complexe acrosome-acroplaxome***

A l'endroit où l'acrosome recouvre le noyau, des modifications de l'EN se réalisent : les pores nucléaires disparaissent et les 2 membranes de l'EN se rapprochent extrêmement (Ferrer, Xu, & Oko, 2012). La membrane nucléaire externe (MNE) n'est séparée de la membrane acrosomale interne que par un très faible espace sub-acrosomale (Manandhar & Toshimori, 2003). En effet, l'acrosome est ancré à l'EN par une structure hautement spécifique, unique au spermatozoïde: l'**Acroplaxome** (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2003). Il s'agit d'un réseau de protéines, composé principalement de F-actine et de kératine 5/Sak57, ainsi que des protéines motrices telle que la myosine Va (C. Ito et al., 2010). L'acroplaxome joue un rôle essentiel dans la biogenèse de l'acrosome, outre son rôle dans son ancrage à l'EN (**Figure 8**).



**Figure 8 :** Les différentes étapes de la biogenèse de l'acrosome. Les vésicules proacrosomales issues de l'appareil de Golgi sont transportées vers le pôle antérieur du noyau spermatique où elles fusionnent pour donner une vésicule unique : la vésicule acrosomale ou acrosome. L'acrosome est attaché au noyau grâce à une structure du cytosquelette, l'acroplaxome. Ce dernier est un réseau de protéines, composé principalement de F-actine et de kératine 5 (sak57/k5). Adaptée de (Kierszenbaum & Tres, 2004) et de (Fujihara et al., 2012).

En effet, la myosine Va de l'acroplaxome est impliquée dans le transport des vésicules proacrosomales, qui dérivent de l'appareil de Golgi, lors de la biogenèse de l'acrosome, vers la vésicule acrosomale en développement, via les microfilaments d'actine. La protéine Rab27a/b, présente sur la face cytoplasmique des vésicules proacrosomales, ne peut pas cependant, se lier directement à la myosine Va, elle a besoin de la protéine de liaison ou la protéine adaptatrice MyRIP (Myosin Rab Interacting Protein), qui assure la connexion entre les deux, permettant ainsi aux vésicules proacrosomales de fusionner entre elles et de s'attacher à l'EN via l'acroplaxome (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2007). Rab27a/b appartient à la famille des petites protéines GTPases. Elle joue un rôle crucial dans la reconnaissance spécifique des vésicules proacrosomales de leur site d'attachement ce qui permet la fusion correcte des vésicules entre elles et non pas avec la membrane d'un organe autre que l'acrosome (Kierszenbaum, Tres, Rivkin, Kang-Decker, & van Deursen, 2004).

Le trafic des vésicules proacrosomales entre le Golgi et l'acrosome dépend également des microtubules (Ramalho-Santos et al., 2001). Lors de la spermiogenèse, la localisation des microtubules varie selon l'état de différenciation des cellules germinales. Au niveau des spermatides rondes, les microtubules se localisent du côté antérieur par rapport au noyau

spermatique, à proximité de l'appareil de Golgi et de l'acrosome en développement (Moreno et al., 2006). Elles participent au transport vésiculaire et contribuent à la mise en forme et à l'étalement de l'acrosome sur le noyau spermatique (O'Donnell & O'Bryan, 2014). Le rôle des microtubules dans le développement de l'acrosome a été mis en évidence par deux moyens. Le premier, est en perturbant la structure des microtubules par l'utilisation des inhibiteurs de la polymérisation des tubulines, constituants principaux des microtubules, tels que la colchicine (Huang & Ho, 2006) ou le nocodazole (Moreno et al., 2006). Le deuxième est l'étude du développement de l'acrosome dans des modèles animaux ayant une organisation défectueuse des microtubules. Le modèle le mieux décrit est le modèle des souris mutante pour le gène *Azh* (abnormal spermatozoon head shape) (Mochida, Tres, & Kierszenbaum, 1999). La délétion des exons 10 et 11 du gène *Azh* chez ces souris, aboutit à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle. La protéine codée par ce gène est appelée Hook1. Elle est associée au réseau de microtubules et impliquée dans le transport des vésicules entre l'appareil de Golgi et le réseau de microtubules au niveau des spermatides rondes (Mendoza-Lujambio et al., 2002). Dans les deux cas (utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou altération génétique affectant l'organisation des microtubules), les défauts observés de la structure des microtubules affectaient particulièrement la structure de l'appareil de Golgi et le bourgeonnement normal des vésicules Golgiennes entraînant également un défaut de la mise en forme de l'acrosome. Ces deux moyens ont donc permis de mettre en évidence la participation des microtubules au trafic vésiculaire, nécessaire à la biogenèse de l'acrosome.

L'acroplaxome contient également certaines protéines impliquées dans la régulation de la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine. Parmi ces protéines, on peut citer la profiline (PFN3 et PFN4) (Behnen et al., 2009), la contractine, et la protéine Kinase FerT (Fer Testis protein kinase) (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2008).

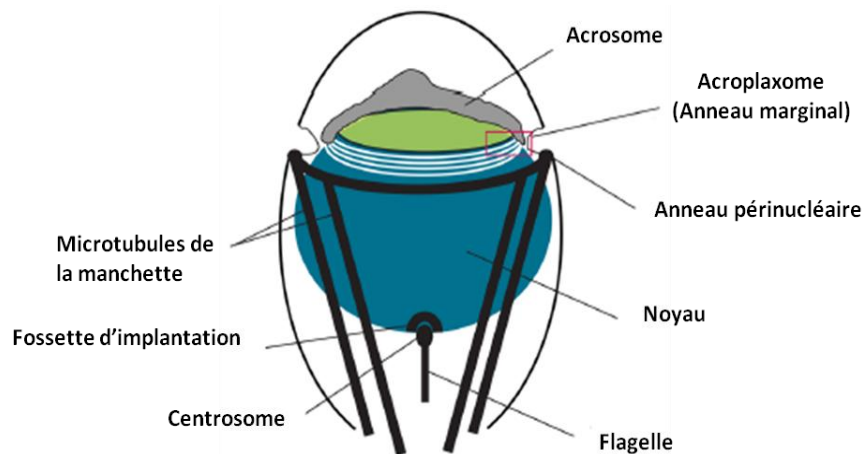
Les bords de cette plaque de cytosquelette ou acroplaxome, constituent un anneau appelé l'anneau marginal. Cet anneau est situé entre la membrane acrosomale interne et l'EN et est formé également des filaments intermédiaires de type kératine5/Sak57. Les jonctions entre la membrane acrosomale interne et l'acroplaxome, ainsi que celles entre l'acroplaxome et la membrane nucléaire ne sont pas caractérisées à ce jours (Kierszenbaum et al., 2003; Kierszenbaum et al., 2004) (**Figure 9**).



De plus, en regard de l'acrosome, la lamine nucléaire a une densité remarquable, bordant l'enveloppe nucléaire interne (ENI) du côté du nucléoplasme. La nature moléculaire de cette lamine nommée « lamine nucléaire dense » n'est pas encore déterminée. Cependant, il semble que l'interaction entre l'acroplaxome et cette lamine est indispensable à la stabilisation de l'attachement de l'acrosome à l'EN durant la spermiogenèse (**Figure 8**) (Kierszenbaum & Tres, 2004; Kierszenbaum et al., 2004)

## 2. L'apparition de la manchette

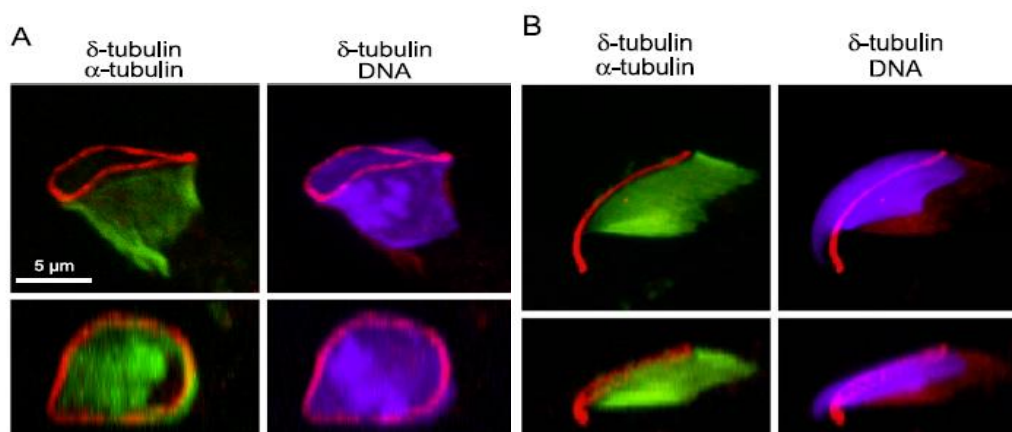
La biogenèse de l'acrosome est également accompagnée par l'apparition, dans le cytoplasme de la spermatide ronde, d'une structure transitoire du cytosquelette, appelée manchette (J. Zhou et al., 2009). La manchette est constituée d'un double réseau de microtubules (formées de deux hétérodimères  $\alpha$  et  $\beta$  tubuline), parallèle au grand axe de la cellule, qui s'ancre sur la zone marginale de l'acroplaxome (Mochida, Tres, & Kierszenbaum, 1998) (Kierszenbaum, 2002). Elle décrit un anneau périnucléaire, adjacent à l'anneau marginal de l'acroplaxome. L'anneau périnucléaire entoure le noyau spermatique, et constitue le site d'insertion des microtubules se développant vers le côté postérieur, opposé à l'acrosome (**Figure 9**).



**Figure 9** : Schéma représentatif du complexe acrosome, acroplaxome, et manchette dans une spermatide ronde en voie de différenciation. La manchette décrit un anneau périnucléaire, adjacent à l'anneau marginal de l'acroplaxome. L'anneau marginal de l'acroplaxome se situe à l'interface entre l'enveloppe acrosomale interne et l'enveloppe nucléaire. L'anneau périnucléaire de la manchette, entoure le noyau spermatique et constitue le site d'insertion des microtubules se développant vers le côté postérieur, opposé à l'acrosome et participant à la formation du flagelle. Adaptée de (Kasioulis et al., 2014)

L'origine des microtubules composants la manchette a été le sujet d'un long débat. Certaines études suggèrent que l'origine des microtubules est le centrosome situé du côté postérieur, opposé à l'acrosome, à la base de la tête du spermatozoïde, au niveau du col reliant

la tête au flagelle. Ainsi le centrosome est considéré comme le centre organisateur des microtubules de la manchette, renfermant la  $\gamma$  tubuline et représentant ainsi l'extrémité négative des microtubules. Tandis que l'anneau périnucléaire se comporte comme un large kinétochore sur lequel les microtubules qui ont pris naissance ailleurs, sont attachés et stabilisés. Il représente ainsi l'extrémité positive des microtubules. Néanmoins, d'autres études récentes suggèrent que l'anneau périnucléaire est le centre organisateur des microtubules, à partir duquel émergent les microtubules (centre de leur nucléation), mais par opposition aux centres organisateurs des cellules somatiques, qui contiennent la  $\gamma$  tubuline, l'anneau périnucléaire n'en contient pas. Il contient à la place, une nouvelle isoforme de tubuline, spécifique des cellules germinales mâles, appelée  $\delta$  tubuline (Kato et al., 2004). Outre la  $\delta$  tubuline, l'anneau périnucléaire comprend également la kératine 9 (Mochida, Rivkin, Gil, & Kierszenbaum, 2000). De même, cet anneau est lié à la membrane plasmique de la spermatide ainsi qu'à l'EN (**Figure 10**).



**Figure 10** : Localisation de l'anneau périnucléaire lors de la spermiogenèse chez la souris. (A) spermatide ronde (étape 8 de la spermiogenèse), (B) spermatide en élancement (étape 10 de la spermiogenèse). Les images sont obtenues par microscopie confocale et reconstituées en trois dimensions. Les panneaux du haut (A-B) montrent une vue latérale des images reconstituées en trois dimensions. Les panneaux du bas (A-B) montrent une vue de dessus des images en trois dimensions. L'anneau périnucléaire (anti  $\delta$ -tubuline, signal rouge), les microtubules de la manchette (anti  $\alpha$ -tubuline, signal vert), et le noyau de la spermatide coloré au DAPI (bleu) Adaptée de (Kato et al., 2004)

La manchette est formée également outre le réseau de microtubules, de filaments d'actine ainsi que de nombreuses protéines associées soit motrices, telles que la kinésine KIF1C (Yang & Sperry, 2003), la dynéine, la dynactine (p150Glued), et la myosine Va/VIIa, soit non motrices telles que la protéine Hook1 et la protéine Polaris, qui assistent au transport des cargos via la manchette (X. Sun et al., 2011; Toshimori & Ito, 2003).

La manchette apparaît à un moment précis de la spermiogenèse qui coïncide avec l'initiation de l'allongement du noyau de la spermatide ronde (stade 8-9 de la spermiogenèse

chez la souris) ainsi qu'avec le début de la condensation de la chromatine, et disparaît juste avant l'achèvement complet de ces deux processus (stade 14 de la spermiogenèse de la souris) par un mécanisme de désassemblage encore méconnu (Kierszenbaum et al., 2007; Yoshida, Ioshii, Imanaka-Yoshida, & Izutsu, 1994).

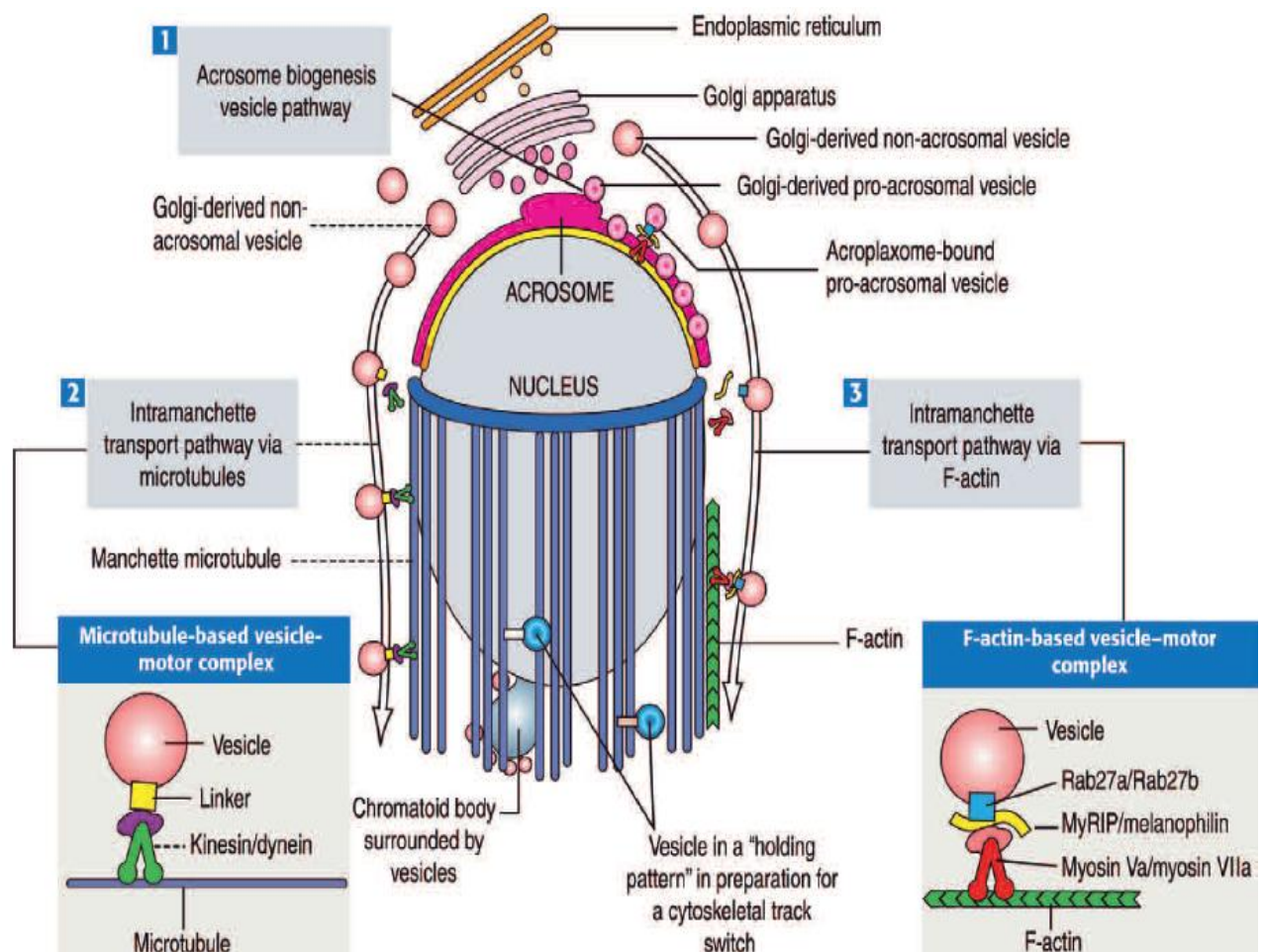
### ***2.1 Rôle de la manchette.***

Les rôles de la manchette au cours de la spermiogenèse sont très divers. Cette structure microtubulaire, joue un rôle crucial dans l'élongation du noyau spermatique (rôle détaillé dans la partie qui suit). De nombreuses mutations affectant des gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation de la manchette et son organisation cellulaire, ont été associées à des anomalies de la mise en forme du noyau spermatique. Parmi ces diverses protéines, on peut citer : RIMBP3 (J. Zhou et al., 2009), Hook1 (Mendoza-Lujambio et al., 2002), LRGUK1 (Y. Liu et al., 2015), SEPT12 (Kuo et al., 2013), MEIG1/PARCG (W. Li et al., 2015).

La manchette est également impliquée dans la condensation de la chromatine. Elle contribue au transport des protéines nucléaires indispensables à la compaction du génome, via des protéines non motrices, associées aux microtubules, les protéines Ran (Kierszenbaum, 2002). Ces protéines appartiennent à la famille des petites GTPase (Ras Related GTPase), impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2011). Les protéines Ran sont également impliquées dans la nucléation des microtubules et se relocalisent de la manchette vers le centrosome à la fin de la spermiogenèse (Kierszenbaum, 2002).

Outre ses rôles dans la morphogenèse du noyau spermatique et la condensation de sa chromatine, la manchette contribue à la formation du flagelle via le transport de nombreuses protéines composant le flagelle, à travers son réseau de microtubules et de microfilaments d'actine, ainsi que les protéines motrices auxquelles elles sont associées (Kinésine/dynéine/Myosine) (Kierszenbaum, 2002; Y. Liu et al., 2015). Ce type de transport est appelé transport intra-manchette (IMT) et est divisé en deux voies de transport : un transport via les filaments d'actine constitutives de la manchette et/ou un transport via son réseau de microtubules (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2011). Le transport intra-manchette consiste au transport des vésicules d'origine Golgienne (non acrosomale), contenant des protéines indispensables à la formation du flagelle, vers le centrosome de la pièce connective ou également connue par région HTCA (Head to Tail Coupling Apparatus), qui se prolonge

par l'axonème formant ainsi le flagelle (Kierszenbaum & Tres, 2004). La voie de transport via les filaments d'actine de la manchette, fait intervenir le complexe Rab27a/b, les protéines adaptatrices MyRIP/Mélanophiline et la MyosineVa/MyosineVIIa, tandis que celle des microtubules fait intervenir la kinésine/la dynéine et leurs protéines associées telles que la dynactine (p150Glued) (Hayasaka et al., 2008) (**Figure 11**). De nombreuses protéines non motrices, associées aux microtubules, jouent également un rôle essentiel dans le transport vésiculaire via la manchette telle que la protéine Hook1 (Meistrich, Trostle-Weige, & Russell, 1990), GMAP120 (Kierszenbaum, Rivkin, Tres, et al., 2011), ADP-ribosylation factor-like 3 (Qi et al., 2013), en permettant le recrutement des vésicules non proacrosomales vers la manchette.



**Figure 11 :** Représentation schématique des deux principales voies de transport via la manchette (IMT) ainsi que les complexes protéiques moteurs mis en jeu, lors de la spermiogénèse. 1- Transport des vésicules proacrosomales issues de l'appareil de Golgi, vers leur site d'attachement qui est l'acroplaxome, lors de la biogenèse de l'acrosome. Ce transport se fait via les filaments d'actines et les microtubules. 2- Transport des vésicules d'origine Golgienne (non proacrosomale), vers le centrosome et le flagelle en formation. Ce transport se fait via les microtubules de la manchette et leur protéines motrices et non motrices associées kinésine/dynéine. 3- Les vésicules d'origine Golgienne (non proacrosomale), peuvent être également transportées vers le flagelle en extension, via le réseau de microfilaments d'actine de la manchette ainsi que leur protéines

motrices et non motrices associées Rab27a/b, MyRIP/mélanophiline, Myosine Va/VIIa. D'après (Kierszenbaum & Tres, 2004)

### ***3. Interaction Acrosome-Acroplaxome-Manchette-Enveloppe nucléaire et élongation du noyau spermatique***

L'élongation du noyau de la spermatide ronde, s'initie à partir des stades 8-9 de la spermiogenèse chez la souris. Elle débute en même temps que l'initiation de la compaction de la chromatine, qui consiste au remplacement de la majorité des histones canoniques par des protéines hautement basiques, riche en arginine et cystéine, les protamines (Gaucher et al., 2010). Au cours de l'élongation nucléaire, la configuration de l'acrosome guidée par la plaque acroplaxomique, suit la mise en forme du noyau. L'acroplaxome joue un rôle crucial dans le maintien de la stabilité de l'ancrage de l'acrosome à l'EN, prévenant ainsi le détachement de l'acrosome et sa dislocation (Kasioulis et al., 2014). L'élongation du noyau spermatique est la résultante de plusieurs forces de constriction intrinsèques et extrinsèques qui s'exercent sur la spermatide en voie de différenciation.

#### ***3.1 Origine extrinsèques et intrinsèques des forces nécessaires à l'élongation nucléaire***

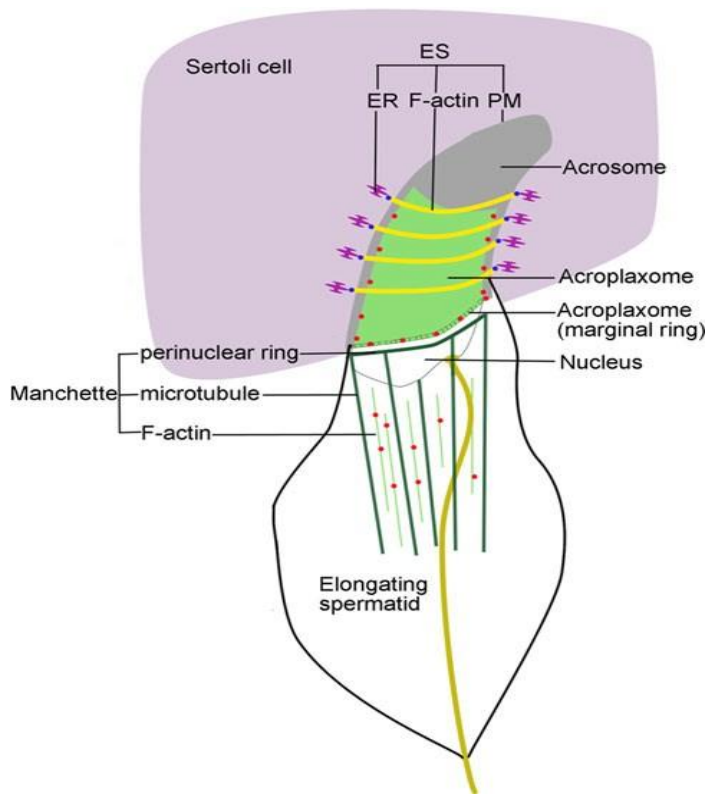
Les forces d'origine **extrinsèques**, sont des forces exercées par un réseau d'actine présent dans la spécialisation ectoplasmique de la cellule de Sertoli et coiffant la partie apicale de la spermatide. La spécialisation ectoplasmique des cellules de Sertoli, est une structure formée d'un réseau d'actine compris entre la membrane plasmique de la cellule de Sertoli et son RE. Elle représente une jonction adhérente entre la cellule de Sertoli et la spermatide en voie de différenciation et permet l'ancrage des cellules germinales dans la partie apicale de l'épithélium germinale, surtout lors de l'élongation du noyau spermatique (H. H. Yan, Mruk, Lee, & Cheng, 2007). Elle apparaît au stade 8 de la spermiogenèse chez la souris et se désassemble uniquement lors de la spermiation, étape durant laquelle les spermatozoïdes sont libérés dans la lumière des tubules séminifères (N. P. Lee & Cheng, 2004). De nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation de l'assemblage/désassemblage des filaments d'actine constitutives de la spécialisation. Parmi ces protéines, Fscn1 (Fasine) est une protéine impliquée dans la polymérisation des filaments d'actine de la spécialisation ectoplasmique des cellules de Sertoli. La réduction de son expression par siARN *in vivo* chez le rat, aboutit à une altération de la spermatogenèse et une perte de la polarité des cellules germinales, initialement en contact étroit avec les cellules de Sertoli (Gungor-Ordueri, Celik-Ozenci, & Cheng, 2014). De même, Formin1 est une protéine de nucléation située également au niveau des filaments d'actine de la spécialisation ectoplasmique. Elle favorise la polymérisation de l'actine monomérique et son assemblage en microfilaments d'actine (N. Li et al., 2015).

La jonction étroite établie entre la spermatide ronde et la cellule de Sertoli via la spécialisation ectoplasmique, est essentielle à la stabilisation et le maintien du positionnement de la spermatide dans l'épithélium germinale lors de l'élongation, vu les forces appliquées sur cette dernière lors de ce processus. Toute déstabilisation de cette jonction, aboutit à l'altération de la morphogénèse du spermatozoïde et peut être à l'origine d'une infertilité.

La cellule de Sertoli et la spermatide communiquent via le complexe suivant : actine/afadine/nectine2/nectine3. L'afadine est une protéine régulatrice des adhésions cellulaires. Elle se lie d'une part aux filaments d'actine de la spécialisation ectoplasmique de la cellule de Sertoli et d'autre part à l'extrémité cytoplasmique de la nectine2, une protéine transmembranaire, appartenant à la membrane plasmique de la cellule de Sertoli. Cette dernière à son tour interagit, via son domaine extracellulaire avec la protéine nectine3, de la membrane plasmique de la spermatide ronde permettant ainsi l'établissement d'une jonction étroite entre les deux cellules et la transmission des forces de constriction nécessaires à l'élongation de la spermatide (Inagaki et al., 2006; Toyama, Suzuki-Toyota, Maekawa, Ito, & Toshimori, 2008).

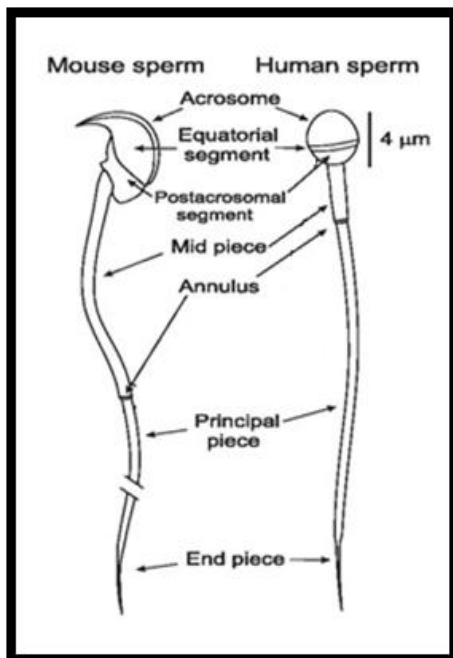
Les souris *nectine2<sup>-/-</sup>* sont stériles. La jonction établie entre la cellule de Sertoli et la spermatide en voie d'élongation, est altérée due à la déstabilisation du complexe actine-afadine-nectine2/3. Pour cette raison, de nombreuses spermatides ont été détachées de l'épithélium germinale et les spermatozoïdes produits étaient malformés (Mueller, Rosenquist, Takai, Bronson, & Wimmer, 2003).

Les forces extrinsèques sont donc, dues aux filaments d'actines de la spécialisation ectoplasmique des cellules de Sertoli, qui coiffe la partie apicale du noyau de la spermatide. A ces forces, s'ajoutent les forces de constriction d'origine **intrinsèques**, dues à l'action simultanée de l'anneau marginal de l'acroplaxome et l'anneau périnucléaire de la manchette, entourant ensemble, le tiers postérieur du noyau spermatique (Kierszenbaum et al., 2007) (**Figure 9**). Ces deux anneaux, réduisent leur diamètre d'une façon dynamique et synchronisé afin de permettre l'élongation et la mise en place d'une forme spécifique, espèce dépendante du spermatozoïde (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2011). De même, l'acroplaxome ainsi que la lamine nucléaire, modulent le stress mécanique généré par ces forces de constriction (X. Sun et al., 2011). La figure 12 représente un modèle regroupant l'ensemble des forces exercées sur le noyau de la spermatide en élongation (**Figure 12**).



**Figure 12** : Schéma représentant une spermatide au cours de l'élongation, chez le rat, et le rôle du complexe acrosome, acroplaxome, et manchette dans ce processus. L'allongement de la tête de la spermatide est la conséquence des forces de constriction exercées par le rétrécissement simultané des deux anneaux marginaux de l'acroplaxome et périnucléaire de la manchette entourant le noyau du côté postérieur et par le réseau d'actine présent dans la spécialisation ectoplasmique de la cellule de Sertoli, coiffant la spermatide du côté apical. D'après (X. Sun, Kovacs, Hu, & Yang, 2011)

La forme de la tête des spermatozoïdes à la fin de la spermiogenèse est très variable d'une espèce à l'autre. Elle est aplatie et effilée chez l'homme, alors que chez la souris elle est courbée et crochue (Darszon et al., 2011) (**Figure 13**).



**Figure 13** : Schéma représentant un spermatozoïde de souris (à gauche) et un spermatozoïde humain (à droite) ayant chacun une forme spécifique. (À gauche) un spermatozoïde de souris ayant une tête courbée et crochue et un acrosome en forme de croissant. (À droite) un spermatozoïde humain ayant une tête aplatie et effilée munie d'un acrosome en forme de capuchon. Le segment équatorial sépare l'extrémité distale de l'acrosome de la région post-acrosomale. Le flagelle est divisé en 3 parties de longueurs différentes : pièce intermédiaire (Mid piece), pièce principale (principal piece) et pièce terminale (end piece). La pièce intermédiaire est séparée de la pièce principale par l'annulus. Adaptée de (Darszon, Nishigaki, Beltran, & Trevino, 2011)

#### **4. La thèque périnucléaire**

Le noyau du spermatozoïde de mammifère, est entouré d'une couche de cytosquelette, insoluble au SDS, appelée thèque périnucléaire, également connue par substance périnucléaire ou matrice périnucléaire. Cette dernière occupe la majeure partie du cytosol entourant le noyau spermatique, sauf au niveau d'une petite dépression appelée « la fossette d'implantation » qui relie la tête au cou (C. Ito et al., 2010). La thèque périnucléaire est répartie en deux régions, ayant chacune une composition ainsi qu'une structure différente (Oko & Sutovsky, 2009).

**La région sub-acrosomale**, du côté antérieur, correspond à l'acroplaxome situé entre la membrane acrosomale interne et l'EN. Elle est assemblée tôt dans la spermiogenèse, et joue un rôle important dans la biogenèse de l'acrosome, son attachement à l'EN et la mise en forme du noyau spermatique (Manandhar & Toshimori, 2003). On y trouve dans cette région des protéines telles que RAB2A, une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire et la fusion des membranes cellulaires (Mountjoy, Xu, McLeod, Hyndman, & Oko, 2008), des variants d'histone, tels que le variant de l'histone H2B, SubH2Bv (Oko & Sutovsky, 2009).

**La région post-acrosomale** ou calyx, du côté postérieur, se forme à des stades tardifs, à partir des protéines cytoplasmiques transportées à travers les microtubules de la manchette. Elle se situe entre l'EN et la membrane plasmique. Cette région joue un rôle très important dans la mise en place du flagelle, la fusion gamétique et l'activation ovocytaire au moment de la fécondation (Toshimori & Ito, 2003). On y trouve dans cette région des protéines telles que CYPT1 (CYstein rich Perinuclear Theca Protein) (Kitamura, Iguchi, Kaneko, Tanaka, & Nishimune, 2004), PAWP (Post-Acrosomal WW-binding domain Protein) (A. T. Wu et al., 2007), Arp-T1 et T2 (actin related protein) qui interagissent avec l'actine (Heid et al., 2002), MN13 (Manandhar & Toshimori, 2003).

La différenciation de la jeune spermatide nécessite par la suite la stabilité du complexe acrosome-acroplaxome-manchette et enveloppe nucléaire. Toute altération de ce complexe empêche soit la biogenèse de l'acrosome, soit l'élongation du noyau spermatique et ainsi la mise en forme du noyau aboutissant ainsi à une tératospermie. Les recherches de notre équipe ont été focalisées principalement sur une tératospermie sévère appelée la globozoospermie de type I, sur laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse.

A la fin de la spermiogenèse, l'acroplaxome et la manchette disparaissent au niveau des stades tardifs et c'est seulement la thèque périnucléaire qui persiste pour protéger le noyau et assurer la stabilité du complexe acrosome-noyau-flagelle (Kierszenbaum, Rivkin, & Tres, 2011).



## **5. La globozoospermie**

La globozoospermie de type I est une cause peu répandue d'infertilité masculine (incidence < 0.1% des patients infertiles), mais qui est sévère répondant très mal aux traitements proposés dans le cadre de l'AMP (Perrin et al., 2013). Elle est caractérisée par la production exclusive des spermatozoïdes dont les têtes sont rondes au lieu d'être allongées et dépourvues d'acrosome (Dam, Feenstra, et al., 2007).

En effet, cette pathologie est due à une altération durant la spermiogenèse de la biogenèse de l'acrosome rendant ainsi les spermatozoïdes non fécondant incapables de traverser la zone pellucide (Sermondade et al., 2011).

### **5.1 Caractéristique de la globozoospermie de type I**

L'absence de l'acrosome est le défaut majeur de la globozoospermie. Cependant les spermatozoïdes globozoospermiques ont de multiples défauts secondaires impliquant le cytosquelette tels qu'un mauvais positionnement de la manchette, une absence de la gaine post-acrosomale, une malformation de la tête, un défaut d'élongation nucléaire et une séparation des deux membranes nucléaires (Dirican, Isik, Vicdan, Sozen, & Suludere, 2008; Singh, 1992). Les flagelles de ces spermatozoïdes sont souvent enroulés et présentent une désorganisation des mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire (Suzuki-Toyota et al., 2004). Les spermatozoïdes globozoospermiques présentent également des défauts de maturation tels que la persistance du corps résiduel autour du noyau ou la pièce intermédiaire. De même, l'altération de l'acrosome est souvent associée à un défaut de compaction nucléaire (Vicari et al., 2002). En effet, l'analyse des spermatozoïdes globozoocéphales par le test TUNEL, un test qui permet de détecter les cassures d'ADN double brin, montre une fragmentation de l'ADN spermatique affectant ainsi l'intégrité du matériel génétique paternel (Brahem, Mehdi, Elghezal, & Saad, 2012).

En 1992, l'introduction de l'ICSI ou injection directe des spermatozoïdes dans le cytoplasme des ovocytes a fourni une solution dans le cadre du traitement de l'infertilité des patients atteints par la globozoospermie (Palermo, Joris, Devroey, & Van Steirteghem, 1992). De nombreuses tentatives d'ICSI ont été donc réalisées, certaines ont abouti à des grossesses menées à terme avec des enfants normaux et sains (J. Liu et al., 1995) (Rybouchkin, Van der Straeten, Quatacker, De Sutter, & Dhont, 1997). Cependant, le taux de réussite de l'ICSI reste relativement faible dans le cas de la globozoospermie. Ceci est dû à un défaut d'activation ovocytaire lié à une réduction voir même absence de la PLC  $\zeta$ , le facteur spermatique

déclenchant l'activation ovocytaire (Heindryckx, Van der Elst, De Sutter, & Dhont, 2005; Heytens et al., 2009).

L'existence de nombreux cas familiaux a suggéré une origine génétique de cette pathologie (Kilani et al., 2004). Toutefois, le(s) gène(s) responsable et le mode de transmission étaient encore méconnus.

### ***5.2 La globozoospermie, modèle d'étude de la formation de l'acrosome***

Bien que les changements morphologiques de l'acrosome soient bien documentés, les mécanismes moléculaires sous-jacents concernant sa formation, son attachement et son étalement ne sont pas encore bien élucidés. Par exemple, aucune protéine ancrant l'acrosome à l'enveloppe nucléaire n'a été trouvée à ce jour. La globozoospermie, tant murine qu'humaine permet de mettre le doigt sur des gènes importants impliqués dans la formation de l'acrosome.

### ***5.3 Les gènes impliqués dans la globozoospermie murine et humaine***

Dans les modèles de souris knock-out, plusieurs gènes ont été caractérisés comme responsable de la globozoospermie (Coutton, Escoffier, Martinez, Arnoult, & Ray, 2015). On peut citer : Casein kinase 2 alpha (Csnk2a2)(Xu, Toselli, Russell, & Seldin, 1999), HIV-Rev-binding protein (Hrb) également appelée Rab ou hRip (Kang-Decker, Mantchev, Juneja, McNiven, & van Deursen, 2001), Golgi-associated-PDZ and Coiled-Coil motif-containing protein (GOPC) (Yao et al., 2002), Hook1 (Moreno et al., 2006), protein interacting with C kinase 1(Pick1) (Xiao et al., 2009), p125/sec23 interacting protein (sec23ip) (Arimitsu et al., 2011), RC/BTB2 (J. Wang et al., 2012), Arf GAP SMAP2 (Funaki et al., 2013), Galnt3 (T. Miyazaki et al., 2013), Zona Pellucida Binding Protein 1 (ZPBP1) (Y. N. Lin, Roy, Yan, Burns, & Matzuk, 2007), Sperm Associated Antigen 1 (SPACA1) (Fujihara et al., 2012), Vps54 (Paiardi, Pasini, Gioria, & Berruti, 2011). Ces gènes codent pour des protéines ayant des localisations cellulaires ainsi que des rôles physiologiques très diverses. Une majorité est cependant impliquée dans le trafic vésiculaire entre l'appareil de Golgi et l'acrosome en maturation. Cependant, aucune mutation de ces gènes n'a été identifiée chez des patients globozoocéphales. Seule une mutation du gène PICK1 a été identifiée chez un patient globozoocéphale parmi 3 frères infertiles globozoospermiques d'une famille chinoise (G. Liu, Shi, & Lu, 2010).

Pour cette raison, de nombreuses recherches, portant sur les gènes impliqués dans la formation des spermatozoïdes ont été réalisées, pour comprendre les causes de cette infertilité

masculine. Un premier gène SPATA16 pour spermatogenesis associated 16, impliqué dans le trafic vésiculaire, a été trouvé muté à l'état homozygote chez trois frères dans une famille juive, cependant aucune mutation de ce gène n'a été trouvée dans une autre cohorte de patients atteints par la globozoospermie (Dam, Koscinski, et al., 2007). Récemment une mutation du gène SPATA16 a été identifiée chez un patient parmi une large cohorte de patients globozoocéphales (Karaca et al., 2014). Cela indique que le gène SPATA16 n'est pas le gène majeur associé à la globozoospermie chez l'homme et que d'autres gènes peuvent en être responsables.

Ci-dessous, un tableau présentant quelques gènes impliqués dans la globozoospermie de type I murine, la protéine codée par chacun de ces gènes ainsi que son rôle physiologique durant la spermatogenèse (**Voir tableau 1**).

KO mouse ID	Full name	Function	Localization and partners	Acrosome In sperm	Nuclear shape	Nuclear membrane and lamina	References
Atg7	Autophagy related 7	Golgi vesicle fusion; Protein trafficking	Cytoplasm	Present, no hook shaped	Poorly elongated ↳ 30% Globular or deformed head	Normal	<a href="#">Wang et al. (2014)</a>
Csnk2a2	Casein kinase II alpha' catalytic subunit	Kinase/phosphorylation	Ubiquitous Acrosomal matrix Pick1 partner	Partially separated from the nucleus	Poorly elongated	Swelling of nuclear membranes	<a href="#">Xu et al. (1999)</a> and <a href="#">Mannowetz et al. (2010)</a>
Dpy19l2	Dpy-19-like 2 (C. elegans)	Glycosylase? Structural protein of the Inner Nuclear membrane	Inner Nuclear membrane	Absent	Round, rod shaped	Destabilization of nuclear lamina facing the acrosome. Nuclear membrane splitting off	<a href="#">Pierre et al. (2012)</a>
Gba2	Glucosidase beta 2	Hydrolyzes glucosylceramide	Endoplasmic reticulum and/or plasma membrane	Partially present, disordered	Not elongated and irregular outline	?	<a href="#">Yildiz et al. (2006)</a> and <a href="#">Walden et al. (2007)</a>
Gopc	Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein)	Golgi vesicle fusion; Vesicle trafficking	Trans-Golgi Pick1 partner	Fragmented	Round or ovoid not hook shape	Normal	<a href="#">Yao et al. (2002)</a> and <a href="#">Ito et al. (2004)</a>
Hrb	HIV-1 Rev binding protein	Golgi vesicle fusion	Cytoplasmic surface of acrosome	Absent	Globular	Apparently normal	<a href="#">Kang-Decker et al. (2001)</a> and <a href="#">Kierszenbaum et al. (2004)</a>
Agfg1 (official)	ArfGAP with FG repeats 1 (official symbol)			Failure of vesicle fusion			
Hsp90b1	Heat shock protein 90b1 heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1 (official symbol)	Endoplasmic chaperone	Endoplasmic reticulum	Partially present	Globular or deformed	?	<a href="#">Audouard and Christians (2011)</a>
Pick1*	Protein interacting with C kinase 1	Golgi vesicle fusion; Protein trafficking	Trans-Golgi Gopc partner Ck2a' partner	Fragmented	Poorly elongated, not hook shape	Normal	<a href="#">Xiao et al. (2009)</a>
Smap2	small ArfGAP 2 Arf GTPase-activating small GTPases protein	Golgi vesicles fusion; Protein trafficking	Trans Golgi binds to both clathrin and the clathrin assembly protein	Partially present, fragmented	Poorly elongated, not hook shape	Apparently normal	<a href="#">Funaki et al. (2013)</a>
Spaca1	sperm acrosome associated 1	Structural protein of the acrosomal membrane	Inner acrosomal membrane	Partially present	Round or rod shaped	Loss of the nuclear lamina facing the acrosome	<a href="#">Fujihara et al. (2012)</a>
Tmf1	TATA element modulatory factor 1	– Trafficking of Golgi-derived vesicles and/or Golgi vesicles fusion – Cytoplasm removal	Golgi-associated protein	Absent	Round or rod shaped. Nuclei are embedded in aberrant cytoplasm rest.	Apparently normal Dense nuclear lamina is present at the apical side	<a href="#">Lerer-Goldshtein et al. (2010)</a>
Vps54**	Vacuolar-vesicular protein sorting 54 homolog	Vesicular sorting protein Retrograde traffic	Acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Poorly elongated and irregular outline	Normal	<a href="#">Paiardi et al. (2011)</a>
Zbp1	Zona pellucida binding protein 1	Binding and penetration into the zona pellucida	Acrosomal matrix	Bulged	Shortened hook	Normal	<a href="#">Lin et al. (2007)</a> and <a href="#">Yatsenko et al. (2012)</a>

**Tableau 1 :** Les gènes impliqués dans la globozoospermie murine. D'après (Coutton et al., 2015)

#### **5.4 La globozoospermie et le gène *DPY19L2***

En 2011, les recherches réalisées par notre équipe GETI « Génétique, Epigénétique et Thérapies de l'Infertilité », ont menées à la découverte du gène *DPY19L2*, gène majeur responsable de la globozoospermie humaine (Harbuz et al., 2011; Koscinski et al., 2011). En effet, en analysant une cohorte de 20 patients tunisiens atteints par la globozoospermie de types I, ils ont trouvé chez 75% des patients analysés (15 parmi 20), une délétion à l'état homozygote du gène *DPY19L2* (Harbuz et al., 2011). L'analyse d'une autre cohorte de patients atteints par la globozoospermie de type I a permis d'identifier la même délétion du gène *DPY19L2* chez 19% patients analysés (4 parmi 21) (Koscinski et al., 2011). La délétion n'est pas la seule altération génétique qui a été identifiée, d'autres mutations affectant particulièrement l'exon 8 du gène *DPY19L2* ont été mise en évidence par d'autres études (Coutton et al., 2012). Une de ces mutations, aboutie à la substitution de l'arginine en position 290 en histidine. Il s'est avéré que cet acide aminé est hautement conservé au cours de l'évolution et que sa substitution a un effet délétère, similaire à celui obtenu lors de la délétion totale du gène (Coutton et al., 2012) (Elinati et al., 2012) (Zhu, Gong, Lin, & Lu, 2013). Ceci fait de *DPY19L2*, le gène le plus souvent atteint dans cette affection.

*Dpy-19*, l'ancêtre du gène humain chez le ver *C.elegans*, code pour une protéine de 10 domaines transmembranaires dont le rôle était inconnu. La mutation affectant ce gène, se traduit par l'apparition d'un phénotype « **dumpy or dpy** » caractérisé par un corps rétréci du ver ainsi qu'une migration défectueuse des neuroblastes (Watanabe et al., 2011). Quatre gènes *dpy-19 like (DPY19L1-4)*, ont été identifiés à la fois chez l'homme et chez la souris. Ces gènes codent pour des protéines transmembranaires, ayant 9 à 11 domaines transmembranaires, ce qui suggère une structure de ces protéines similaire à celle de la protéine ancestrale, mais aux rôles tout aussi inconnus (Carson, Cheung, & Scherer, 2006). En outre, la séquence des protéines humaines *DPY19L*, possède un niveau de similitude élevé avec la séquence de la protéine *dpy-19*, ce qui est compatible avec une conservation probable de la fonction de la protéine ancestrale chez l'homme (De Braekeleer, Nguyen, Morel, & Perrin, 2015).

#### **5.5 Importance de la protéine *DPY19L2* pour la formation de l'acrosome**

Le gène *DPY19L2* s'exprime de manière prédominante dans le testicule et code pour une protéine dont le rôle était encore méconnu avant sa découverte dans la globozoospermie par notre équipe.

Afin de comprendre pourquoi l'absence de ce gène était responsable de l'apparition d'un tel phénotype et quel était son rôle dans la spermatogenèse, l'équipe a produit une lignée de souris invalidée pour le gène *Dpy19l2*. Ces souris constituaient un excellent modèle d'étude puisqu'elles présentaient un phénotype mimant parfaitement la globozoospermie humaine, du point de vue stérilité complète des mâles et morphologie des spermatozoïdes.

### **5.6 Localisation subcellulaire et fonction de la protéine *Dpy19l2***

Dans le but de comprendre la fonction cellulaire de *Dpy19l2*, il était primordial d'étudier sa localisation qui est intimement liée à son rôle. A partir du modèle de souris invalidée pour le gène *Dpy19l2*, l'équipe a démontré que *Dpy19l2* est une protéine transmembranaire, appartenant à la membrane nucléaire interne, et située en regard de l'acrosome. Elle possède 11 segments transmembranaires putatifs, avec une extrémité amino-terminale (N-ter), située du côté du nucléoplasme et une extrémité carboxy-terminale (C-ter), située du côté du lumen, l'espace séparant les deux membranes nucléaires interne et externe.

L'analyse du profil d'expression de *Dpy19l2* au cours de la spermatogenèse montre qu'il s'agit d'une protéine à expression testiculaire et post méiotique. Elle est absente au niveau du spermatocyte I, puis elle apparaît au stade spermatide ronde au moment de la biogenèse et l'extension bilatérale de l'acrosome, elle persiste jusqu'aux stades spermatide en élongation et spermatide condensée, pour finir par disparaître au niveau du spermatozoïde épiddymaire.

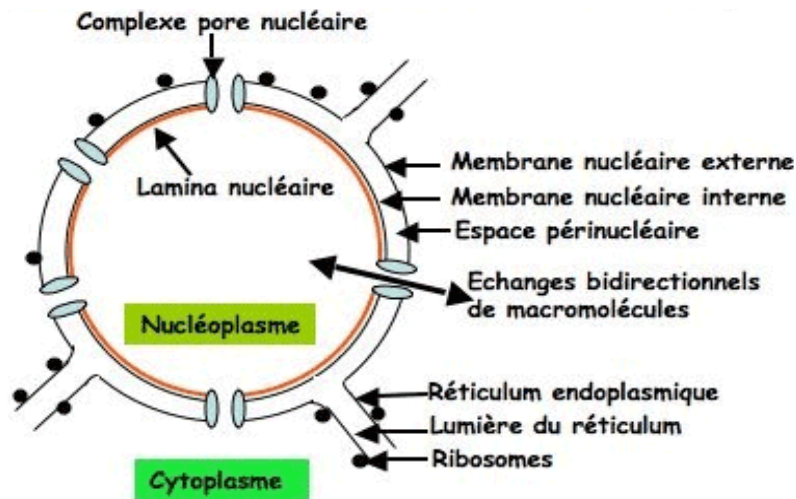
L'analyse des résultats obtenus par la microscopie électronique sur des cellules spermatogéniques KO vs WT, montre qu'en absence de *Dpy19l2*, on assiste à un détachement progressif de l'acrosome au fur et à mesure de la progression de la spermiogenèse, concomitant à une fragmentation progressive de la lamina nucléaire sous jacente, aboutissant par la suite à son détachement complet de l'enveloppe nucléaire, tout en restant attaché à l'acroplaxome. Ce résultat indique que *Dpy19l2* n'est pas impliquée dans la biogenèse de l'acrosome, qui arrive toujours à se former correctement, mais elle est plutôt responsable de son attachement à l'enveloppe nucléaire. En absence de *Dpy19l2*, l'acrosome n'arrive pas à s'étaler comme il faut (d'une façon bilatérale) due à un déséquilibre de forces qui s'exercent de part et d'autre et finit par se détacher pour être finalement éliminé avec le corps résiduel durant la dernière phase de la maturation du spermatozoïde. L'absence de l'acrosome est également accompagnée par un mauvais positionnement de la manchette, contribuant ensemble à l'altération de la mise en forme du spermatozoïde (Pierre et al., 2012).

## ***6. Remaniement de l'enveloppe nucléaire durant la spermiogenèse***

Durant l'élongation, l'enveloppe nucléaire subit un remaniement très important de ses protéines (Ho, 2010). Certaines protéines disparaissent et ne sont plus présentes alors que d'autres protéines apparaissent, on dit alors que l'expression spatio-temporelle de ces protéines dépend de l'état de différenciation de la spermatide. En effet, durant ce remaniement, de nombreuses protéines de l'EN se relocalisent, et migrent du côté antérieur vers le côté postérieur (Gob, Schmitt, Benavente, & Alsheimer, 2010; Schutz, Alsheimer, Ollinger, & Benavente, 2005). Ce réarrangement des protéines de l'EN permet à ces dernières d'interagir avec les différents éléments du cytosquelette ainsi que ceux du nucléosquelette. Cette interaction est indispensable à la transmission et le remodelage des forces exercées sur le noyau spermatique en voie d'élongation (Gob et al., 2010).

### ***6.1 Structure et fonction de l'enveloppe nucléaire***

Le noyau d'une cellule eucaryote est délimité par une bicouche lipidique appelée « enveloppe nucléaire » (EN) qui le sépare du reste du cytoplasme (Stewart, Roux, & Burke, 2007). L'EN des cellules eucaryotes est formée d'une membrane nucléaire externe, en continuité avec la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et d'une membrane nucléaire interne (Crisp & Burke, 2008). Ces deux enveloppes sont séparées par un espace, appelé lumen ou espace périnucléaire (PNS) et se rejoignent au niveau des pores nucléaires. Ces derniers sont responsables de la communication et de la régulation du trafic bidirectionnel des molécules entre le nucléoplasme et le cytoplasme (Quimby & Corbett, 2001). Les deux enveloppes nucléaires ainsi que la membrane du RE forment un système membranaire continu, de façon que le lumen soit considéré comme l'extension de la lumière du RE (Anderson & Hetzer, 2007; Stewart et al., 2007). L'enveloppe nucléaire interne (ENI), est caractérisée principalement par un maillage de protéine ayant une épaisseur de 20 à 50 nm, bordant l'enveloppe du côté du nucléoplasme, appelé « la lamine nucléaire » (Crisp & Burke, 2008; Verstraeten, Broers, Ramaekers, & van Steensel, 2007) (**Figure 14**).



**Figure 14 :** Organisation générale de l'enveloppe nucléaire. (Adaptée de Sciencebio.com)

## 6.2 La lamina nucléaire

La lamina nucléaire est un réseau de polymères de lamines qui s'intercale entre la chromatine et l'ENI (Gruenbaum et al., 2003). Elle est formée par des filaments intermédiaires de types V, dont la composition varie selon le type cellulaire et l'état de différenciation (Dechat, Adam, & Goldman, 2009; Kierszenbaum & Tres, 2004). Outre leur localisation périnucléaire, les lamines sont également dispersées dans le nucléoplasme, formant un réseau fibrillaire mince (Gruenbaum, Wilson, Harel, Goldberg, & Cohen, 2000; Taddei, Hediger, Neumann, & Gasser, 2004). La lamina nucléaire joue un rôle à la fois structural et fonctionnel. Elle constitue un support mécanique de l'EN et lui fournit la stabilité et la rigidité (Zhong, Wilson, & Dahl, 2010). De même, la lamina nucléaire fournit des sites d'ancrage de la chromatine à certains domaines à la périphérie nucléaire (Gotzmann & Foisner, 1999; F. Lin & Worman, 1993).

### 6.2.1 La synthèse des lamines

Les lamines sont des protéines fibrillaires composées d'un domaine central capable de se lier à la chromatine. Ce domaine permet également la polymérisation de deux molécules parallèles de lamines. Puis ces dimères, s'organisent en de longs filaments en se mettant bout à bout formant ainsi un réseau assez solide qui donne au noyau sa forme (Crisp & Burke, 2008). Dans les cellules eucaryotes, il existe 2 types principaux de lamines : lamine de type A et lamine de type B (Gerace & Huber, 2012; Gotzmann & Foisner, 1999).

La lamine de type A est codée par un gène unique *LMNA* qui donne naissance, suite à un épissage alternatif, à 4 isoformes qui sont les suivants : lamines A, A  $\Delta$ 10, C, C2. La lamine A et lamine C sont les isoformes majoritaires et la lamine A  $\Delta$ 10 et la lamine C2 sont



les isoformes minoritaires (J. S. Lee et al., 2007; Schutz, Alsheimer, et al., 2005). La lamine de type B est codée par deux gènes *LMNB* différents. La lamine B1 est codée par le gène *LMNB1* et la lamine B2 et la lamine B3 sont codées par le gène *LMNB2* suite à de l'épissage alternatif (Maeno, Sugimoto, & Nakajima, 1995; Schutz, Benavente, & Alsheimer, 2005; Zewe et al., 1991).

Les lamines de types B sont exprimées au niveau de toutes les cellules nucléées alors que les lamines de types A sont exprimées au niveau des cellules différenciées (Dechat et al., 2009; J. S. Lee et al., 2007).

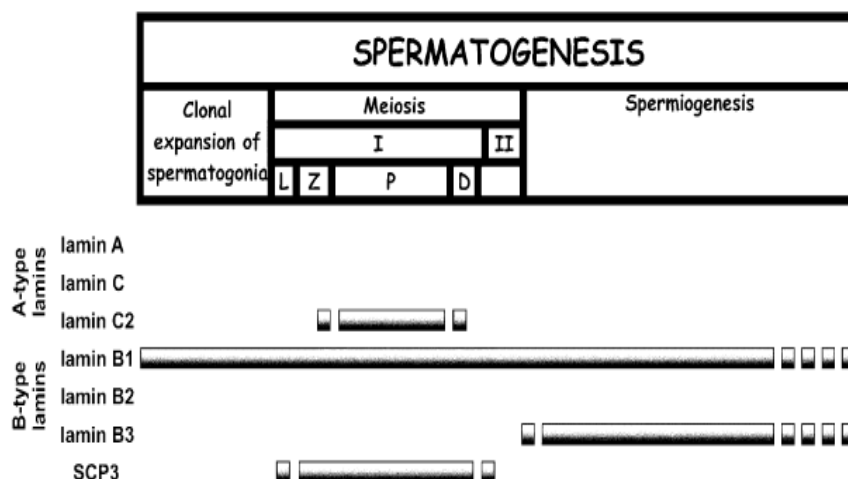
Les deux types de lamines interagissent à la fois avec des protéines transmembranaires de l'ENI, ainsi qu'avec la chromatine (Hetzer, 2010). Leur interaction avec la chromatine peut se faire, soit directement en se liant à des séquences spécifiques de l'ADN S/MAR (**S**caffold/**M**atrix **A**ttachment **R**egions) (Camoszi et al., 2014), soit indirectement via des protéines de liaison à l'ADN comme la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1) ou via les histones (Mattout, Goldberg, Tzur, Margalit, & Gruenbaum, 2007). Ces régions sont impliquées dans la régulation de la transcription, la réplication de l'ADN, et l'organisation de la chromatine dans le noyau (Gruenbaum & Medalia, 2015). La lamina nucléaire est une composante essentielle des cellules eucaryotes. Elle est impliquée dans la plupart des activités nucléaires, y compris la réplication de l'ADN, la transcription, et la régulation de l'expression génique, l'organisation nucléaire de la chromatine, le développement et la différenciation cellulaire, la migration nucléaire, et l'apoptose (Gruenbaum et al., 2003). Elle est devenue un sujet d'étude important, à cause de la découverte de nombreuses maladies humaines dues à des mutations spécifiques dans les gènes de la lamine. Ces pathologies qui sont dues à un défaut de la lamina nucléaire sont de ce fait nommées laminopathies (Vlcek & Foisner, 2007); (Bonne, 2014); (Chi, Chen, & Jeang, 2012); (Starr, 2012). Ces maladies comprennent la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (DMED), et le syndrome de Hutchison-Gilford-Progeria (HGPS), qui sont dues à des mutations affectant le gène *LMNA* (Worman, Ostlund, & Wang, 2010); (S. G. Young, Jung, Lee, & Fong, 2014).

### ***6.2.2 Le rôle de la lamina nucléaire au cours de la spermatogenèse chez la souris et chez l'homme***

Les cellules de la lignée germinale possèdent une composition en lamines qui leur est spécifique et qui diffère de celle retrouvée au niveau des cellules somatiques. Les lamines A, C, et B2 qui sont à expression ubiquitaire dans les cellules somatiques, sont absentes au niveau des cellules germinales lors de la spermatogenèse (Schutz, Alsheimer, et al., 2005). La

lamina nucléaire des cellules spermatogéniques murines est composée principalement de la lamine B1 à expression ubiquitaire et de la lamine B3 et la lamine C2 qui sont des isoformes plus courtes des lamines B2 et C respectivement. Ces deux types de lamines sont spécifiques aux cellules germinales (Gruenbaum et al., 2000). La lamine C2 est exprimée au niveau des spermatocytes I (stade pré-méiotique), lors de la spermatogénèse chez la souris. Elle constitue un site d'ancrage sur lequel se fixent les télomères des chromosomes homologues lors de la prophase 1 de la méiose. Cet attachement est indispensable au mouvement dynamique de ces derniers ainsi qu'à leur organisation nucléaire sous forme d'un bouquet, facilitant leur appariement (Jahn, Schramm, Benavente, & Alsheimer, 2010). La lamine C2 disparaît ensuite dans les stades post-méiotique, pour être remplacée par la lamine B3 (Jahn et al., 2010; Schutz, Benavente, et al., 2005) (**Figure 15**). De même la localisation de la lamine B3 varie au cours de la spermiogénèse. Au stade spermatide ronde, la lamine B3 borde les extrémités latérales de l'EN du côté du nucléoplasme ainsi que l'extrémité postérieure opposée à l'acrosome. Cependant au fur et à mesure de la progression de la spermiogénèse, elle subit une migration vers le côté postérieur opposé à l'acrosome pour finir par disparaître au niveau du spermatozoïde épидидymaire (Schutz, Alsheimer, et al., 2005; Schutz, Benavente, et al., 2005).

Que ce soit la lamine B1 ou la lamine B3, la localisation qu'elles occupent est polarisée et restreinte au pôle postérieur opposé à l'acrosome. Il est donc nécessaire de dévoiler la nature de la lamina nucléaire dense sous jacente à l'ENI en face de l'acrosome. Une telle découverte permettra l'identification de nouveaux complexes protéiques associés à l'ENI, à la lamina et à la chromatine, qui peuvent être responsable de la liaison de certains organelles au noyau tel que l'acrosome et dont l'altération peut être à l'origine de nombreuses tératospermies, telles que la globozoospermie ou d'autres laminopathies encore méconnues.

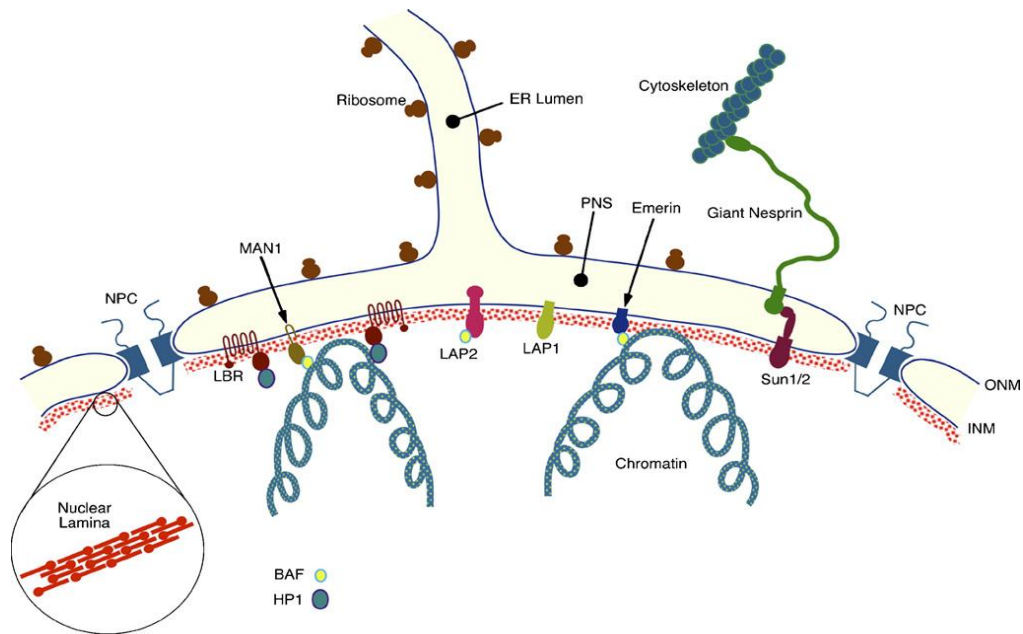


**Figure 15** : Résumé du profil d'expression des lamines nucléaires lors de la spermatogenèse chez la souris. Le profil d'expression des lamines a été comparé avec celui d'une protéine à expression spécifique de la méiose SCP3. L : Leptotène, Z : Zygotène, P : Pachytène, D : Diplotène, SCP3 : protéine du complexe synaptonémal. D'après (Schutz, Alsheimer, et al., 2005)

Chez l'homme et contrairement au modèle murin, la nature de la lamina nucléaire présente dans le noyau de la spermatide ronde au cours de la spermiogenèse était encore obscure. Des études réalisées par El Khatib et al. (2015) ont montré qu'il y a deux types de lamines présents dans le noyau de la spermatide humaine, qui sont la lamine B1 et la lamine B3 et que seule la lamine B1 persiste au niveau des spermatozoïdes matures éjaculés (Elkhatib et al., 2015).

### **6.3 Les protéines de l'enveloppe nucléaire**

Bien que la membrane externe et interne du noyau soit continue, les deux membranes ont une composition protéique différente. L'enveloppe nucléaire externe (ENE) possède beaucoup de protéines en commun avec le RE dont elle est le prolongement, tandis que l'ENI possède une composition spécifique de protéines qui la caractérise et permet sa distinction de l'ENE (Stewart et al., 2007). On retrouve ainsi les protéines LBR pour « lamin B receptor » qui se lie à la lamine B ainsi qu'à la protéine de l'hétérochromatine HP1, les protéines LAP1 et LAP2 pour « Lamina-associated polypeptide 1 et 2 » qui lie l'hétérochromatine grâce à la protéine BAF pour « Barrier to Autointegration Factor », une protéine de liaison à l'ADN double brin, les protéines Emerine, MAN1, SUN1 et SUN2, qui s'ajoutent à de nombreuses autres protéines interagissant avec les lamines, appartenant à la famille des protéines à domaine LEM pour « Lap, Emerin, Man » (Schirmer & Foisner, 2007). Les protéines de l'ENI sont synthétisées au niveau du RE rugueux (RER) puis transportées vers l'ENI, à travers le complexe du pore nucléaire (NPC), où elles sont retenues grâce à leur interaction, via leur extrémité N-ter, soit avec des protéines de la lamina nucléaire, soit avec la chromatine comme par exemple la protéine BAF (Pouton, Wagstaff, Roth, Moseley, & Jans, 2007; Taddei et al., 2004). Ces interactions sont illustrées dans la figure 16 (**Figure 16**). Le transport de ces protéines vers l'ENI est facilité par une famille des protéines appelées importines alpha (Goldfarb, Corbett, Mason, Harreman, & Adam, 2004).



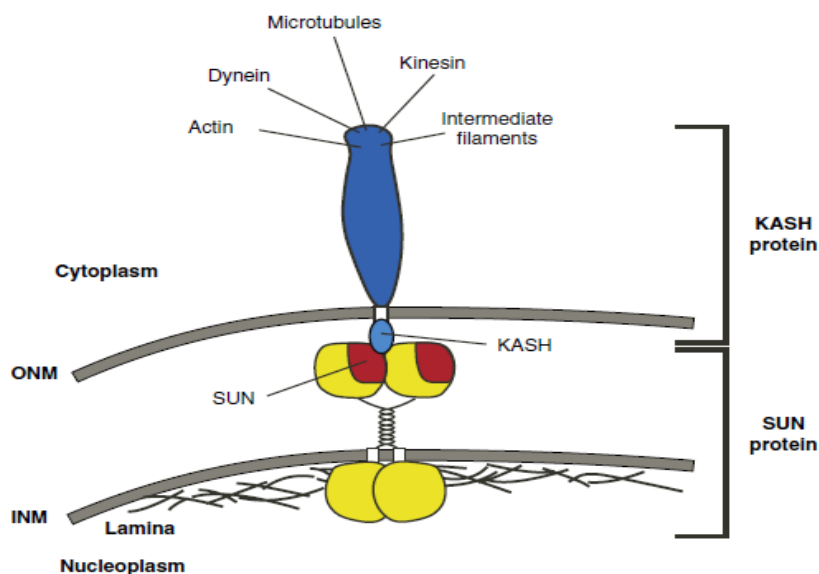
**Figure 16 :** Représentation schématique de l'enveloppe nucléaire et ses différents composants. D'après (K. J. Roux & Burke, 2007)

## 6.4 Rôle du complexe LINC dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire

### 6.4.1 Définition du complexe LINC

La membrane nucléaire est le lieu d'interaction du cytosquelette avec le nucléosquelette. Les forces exercées sur le cytosquelette peuvent ainsi être transmises au noyau et inversement. Cette transduction du signal mécanique entre ces deux compartiments est due à des protéines spécifiques appartenant à l'ENE ainsi qu'à l'ENI formant ainsi un complexe protéique appelé « complexe LINC » pour LInker of the nucleoskeleton and the cytoskeleton (Lombardi & Lammerding, 2011).

Le complexe LINC regroupe deux grandes familles de protéines très conservées au cours de l'évolution, qui sont la famille des protéines SUN pour « Sad1 et UNC-84 », appartenant à l'ENI, et la famille des protéines KASH, pour « Klarsicht, ANC-1 and Syne Homology », appartenant à l'ENE (Starr & Fridolfsson, 2010; Zhong et al., 2010). Ces deux types de protéines interagissent ensemble au niveau de l'espace périnucléaire via leur domaine SUN-KASH luminaux (D. I. Kim, Birendra, & Roux, 2015) (**Figure 17**).



**Figure 17 :** Les protéines KASH et les protéines SUN relient les deux enveloppes nucléaires externe et interne (ONM et INM). Les protéines KASH (bleu) appartiennent à l'ENE (ONM), elles interagissent via leur domaine cytoplasmique avec une variété de composants du cytosquelette. Les protéines SUN (jaunes et rouges; montrées comme un dimère) appartiennent à l'ENI (INM). Elles interagissent via leur domaine nucléoplasmique avec les lamines ou d'autres composants nucléaires. Les protéines SUN et les protéines KASH interagissent les unes avec les autres dans l'espace périnucléaire, via leur domaine SUN et KASH luminaux, pour former un pont qui stabilise l'enveloppe nucléaire et relie le cytosquelette au nucleosquelette. D'après (Starr, 2011)

## 6.4.2 Composants du complexe LINC

### 6.4.2.1 Les protéines KASH de l'enveloppe nucléaire externe

Les protéines à domaine KASH ont tout d'abord été identifiées chez *C.elegans* et *Drosophila Melanogaster* (Martins, Finan, Guilak, & Lee, 2012). Un des exemples des protéines KASH, Anc-1 est une protéine transmembranaire de type II de l'ENE chez *C.elegans*. Cette protéine est caractérisée par une très longue extrémité N-ter s'étendant jusqu'à 500 nm dans le cytoplasme et possédant un domaine de liaison à l'actine (ABD pour actin binding domain), un domaine transmembranaire et une courte extrémité C-ter de 40 aa renfermant le domaine KASH, s'étendant dans l'espace périnucléaire. Elle joue un rôle important dans le positionnement du noyau des cellules hypodermiques. En son absence, le noyau flotte librement dans la cellule (Starr & Han, 2002). MSP300 est l'orthologue d'Anc-1 chez la drosophile *Drosophila Melanogaster* (J. Yu et al., 2006). Les protéines KASH, également connues chez les mammifères par Nesprine (Nuclear envelope with spectrin repeat proteins) ou Syne (Synaptic nuclear envelope) sont des protéines transmembranaires de types II, situées au niveau de l'ENE (Q. Zhang et al., 2001). Syne1/ENAPTIN/Myne 1 ou Nesprine1 et Nesprine2/ NUANCE étaient les deux premières protéines KASH découvertes chez les mammifères (Zhen, Libotte, Munck, Noegel, & Korenbaum, 2002). Deux autres

membres de la famille des protéines KASH ont été identifiés ultérieurement qui sont Nesprine3 et Nesprine4. Comme Nesprine1 et Nesprines2, Nesprine3 possède un domaine KASH au niveau de son extrémité C-ter, mais elle diffère par l'absence d'un domaine de liaison à l'actine au niveau de son extrémité N-ter et la présence d'un domaine de liaison à la plectine, une protéine d'ancrage des éléments du cytosquelette qui lie les filaments intermédiaires ainsi que les filaments d'actine (Ketema & Sonnenberg, 2011; Wilhelmsen et al., 2005). Nesprine 4 est exprimée au niveau des cellules épithéliales où elle est impliquée dans le positionnement du noyau, dépendant des microtubules dans la cellule, grâce à son interaction avec kinésine 1, une protéine motrice associée aux microtubules (K. J. Roux et al., 2009). KASH5 est une protéine de l'ENE, appartenant à la famille des protéines KASH mais qui est exprimée uniquement lors de la méiose (Horn et al., 2013; Morimoto et al., 2012).

Les protéines KASH possèdent une topologie commune qui est la suivante :

- Une longue extrémité N-ter, peu conservée, capable d'interagir avec les différents éléments du cytosquelette (filaments d'actine, microtubules, filaments intermédiaires) (Stewart-Hutchinson, Hale, Wirtz, & Hodzic, 2008). Cette interaction se fait soit directement via un domaine de liaison à l'élément du cytosquelette, soit indirectement via une protéine d'ancrage du cytosquelette telle que la plectine, la dynéine, ou la kinésine (Razafsky & Hodzic, 2009).
  
- Une extrémité C-ter courte, renfermant le domaine KASH. Ce dernier est formé d'un domaine transmembraire et une courte séquence conservée, d'environ 35 aa, qui s'étend dans l'espace périnucléaire et qui interagit avec le domaine SUN. Ci-dessous un tableau résumant les différentes protéines KASH chez plusieurs espèces (**Tableau 2**).

Name	Cytoskeletal interaction	Proposed SUN interaction	Proposed function
<i>C. elegans</i>			
ANC-1	Actin	UNC-84	Nuclear positioning and migration; mitochondria positioning
UNC-83	Microtubules	UNC-84	Nuclear positioning and migration
Zyg-12	Dynein Centrosomes	Matefin/Sun1	Nuclear migration; centrosome/NE attachment
<i>D. melanogaster</i>			
Klarsicht	Dynein	Klaroid	Nuclear positioning in eye development
MSP-300	Actin	CG18584	Nuclear positioning/anchorage in myogenesis and oogenesis
<i>Mammals</i>			
Nesprin 1G, Syn1, Mye1, ENAPTIN	Actin	Sun1/2	Nuclear anchorage; actin/NE tethering
Nesprin 2G, Syn2, NUANCE	Actin	Sun1/2	Nuclear Anchorage; actin/NE tethering
Nesprin 3	Plectin	Sun1/2	IF/NE connection; sequestration of plectin
Nesprin 4	Not known	Sun1/2	Not known

**Tableau 2 :** Tableau résumant les différentes protéines KASH de l'enveloppe nucléaire externe chez plusieurs espèces ainsi que leurs rôles physiologiques au sein de la cellule. D'après (Martins et al., 2012)

#### 6.4.2.2 Les protéines SUN de l'enveloppe nucléaire interne

Il existe chez les mammifères, au moins 5 protéines SUN : SUN1, SUN2, SUN3, SUN4 (SPAG4 pour Sperm Associated Antigen 4), SUN5 (SPAG4L pour Sperm Associated Antigen 4 Like ou TSARG) (Starr & Fridolfsson, 2010). SUN1 et SUN2 sont à expression ubiquitaire alors que SUN3, SUN4, et SUN5, ne le sont pas, elles sont majoritairement exprimées au niveau des testicules (Kracklauer, Link, & Alsheimer, 2013). Au total, toutes les protéines SUN sont exprimées au niveau des testicules.

Les protéines SUN sont des protéines transmembranaires de types II situées au niveau de l'ENI et possédant une topologie commune qui est la suivante :

- Une extrémité N-ter non conservée, située dans le nucléoplasme par laquelle les protéines SUN interagissent avec de nombreux éléments du nucléosquelette tels que la lamine nucléaire, la chromatine, voir même d'autres protéines de l'ENI. C'est le cas de SUN2 qui nécessite la présence d'une autre protéine intégrale de l'ENI, appelée « Samp1 » pour s'ancrer et être retenue (Borrego-Pinto et al., 2012) (Isermann & Lammerding, 2013).
- Une extrémité C-ter très conservée, qui s'étend dans le lumen. Cette extrémité comprend un ou plusieurs domaines transmembranaires (TM), traversant la bicouche lipidique, un ou plusieurs domaine Coiled-Coil responsable de l'oligomérisation de la protéine et finalement un domaine d'environ 175 aa appelé domaine SUN, identifié par homologie de séquence des deux protéines Šad1 chez *S.pombe* et UNC-84 chez *C.élegans*, à

travers lequel elle interagit avec les protéines KASH de l'ENE pour former un complexe LINC (Razafsky & Hodzic, 2009; Rothballer & Kutay, 2013; Stewart-Hutchinson et al., 2008)

#### **6.4.3 Les facteurs indispensables à la formation du complexe LINC**

Pour mieux comprendre la fonction assumée par le complexe LINC, il est indispensable de comprendre en premier lieu les mécanismes moléculaires permettant l'association des deux protéines SUN et KASH au sein de l'EN et comment elles interagissent.

##### **- Assemblage du complexe LINC au sein de l'EN :**

En effet, la formation du complexe LINC nécessite plusieurs étapes. Elle débute par le recrutement des protéines SUN synthétisées au niveau du RER vers l'ENI à travers le complexe du pore nucléaire (NPC). Les protéines SUN sont donc activement transportées tout le long de la membrane du RER. Leur adressage vers l'ENI nécessite la présence séparée ou simultanée de l'un des signaux d'adressage nucléaire suivant, situé au niveau de leur extrémité N-ter (Starr & Fridolfsson, 2010) (Tapley & Starr, 2013) :

- **INM-SM:** Inner Nuclear Membrane Sorting Motif, ce motif se lie à une importine  $\alpha$  (tronquée, associée à l'EN au lieu d'être soluble), qui facilite le transport des protéines SUN vers l'ENI via le NPC à travers la membrane du RE.
- **SUN-NELS:** SUN proteins Nuclear Envelope Localization Signal
- **CNELS ou NELS:** Classic Nuclear Envelope Localization Signal

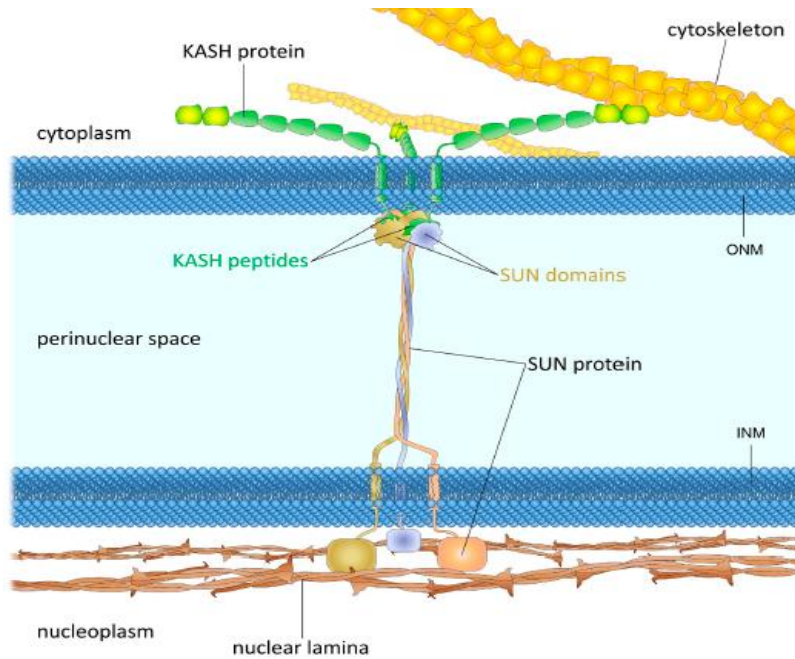
Ensuite les protéines SUN subissent une translocation à travers le pore nucléaire qui se fait selon divers mécanismes (soit en présence de l'ATP, soit via la voie du transport nucléocytoplasmique classique : signal de localisation nucléaire-importine  $\alpha$  et  $\beta$  + RanGTP), pour se situer finalement au niveau de l'ENI. Les protéines SUN doivent être ensuite retenues au sein de l'ENI. Cette rétention se fait grâce à des interactions qu'établissent les protéines SUN via leur domaine N-ter, avec les différents composants du nucléosquelette que ce soit la lamina nucléaire (Haque et al., 2006), ou la chromatine ou une autre protéine de l'ENI (exemple la protéine Samp1), ou par leur interaction avec les protéines KASH dans le lumen (Tapley, Ly, & Starr, 2011) ; (Tapley & Starr, 2013).



Une fois stabilisées dans l'ENI, les protéines SUN recrutent les protéines KASH localisées au niveau de l'ENE, liant les deux enveloppes nucléaires interne et externe et assurant par la suite le maintien de la rigidité de l'EN.

En effet, les protéines KASH comme la plupart des protéines de l'ENE sont synthétisées au niveau du RER puis elles sont recrutées et retenues au niveau de l'ENE via les protéines SUN de l'ENI. La localisation des protéines KASH au niveau de l'ENE dépend donc de l'intégrité de leur domaine KASH d'une part et de la présence des protéines spécifiques de l'ENI d'autre part (Tapley & Starr, 2013) (Burke, 2012). En effet, c'est grâce à l'interaction des deux domaines SUN et KASH dans le lumen que les protéines KASH sont bien localisées et retenues au niveau de l'ENE (Ketema et al., 2007; Padmakumar et al., 2005). Chez *C.elegans*, la localisation d'Anc-1 au niveau de l'ENE dépend de la présence de la protéine UNC-84 de l'ENI (Starr & Han, 2002). De même la localisation d'UNC-83, une autre protéine KASH de l'ENE chez *C.elegans*, nécessite la présence de la protéine UNC-84 de l'ENI (McGee, Rillo, Anderson, & Starr, 2006).

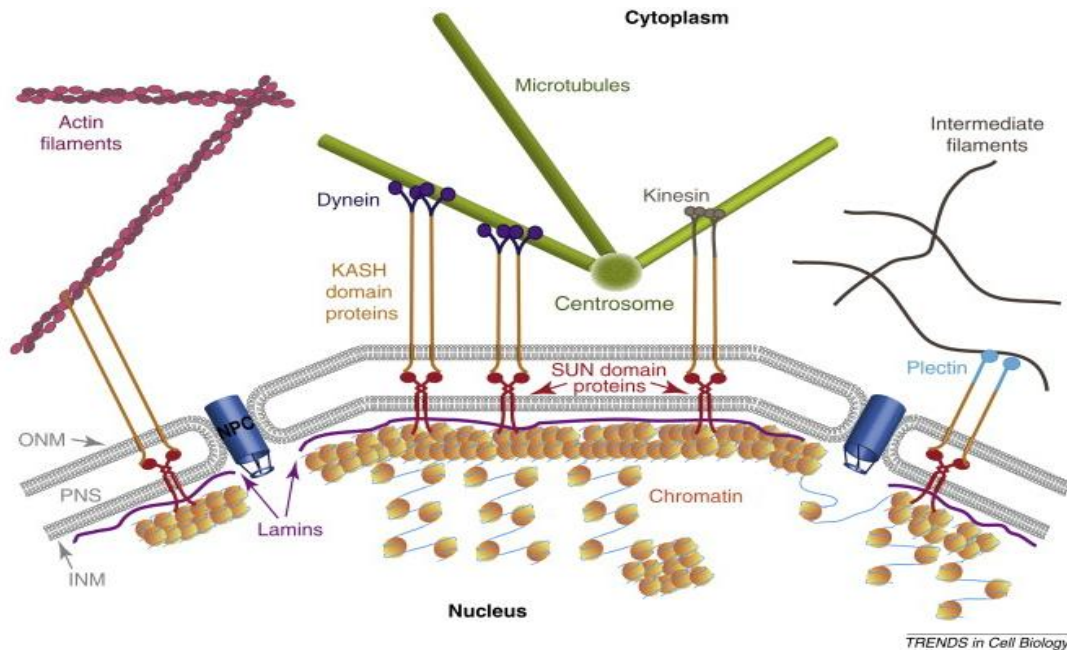
L'interaction SUN-KASH nécessite une oligomérisation des protéines SUN et particulièrement une trimérisation via leur domaine luminal appelé domaine Coiled coil qui précède le domaine SUN (Sosa, Rothballer, Kutay, & Schwartz, 2012). Les protéines SUN s'associent en trimères, et lient intimement trois peptides KASH (Burke, 2012; Sosa et al., 2012). L'association de trois protéines SUN est essentielle pour la bonne conformation du domaine globulaire responsable de la liaison avec les protéines KASH. Sans cette trimérisation la liaison SUN-KASH est perdue (Chang, Worman, & Gundersen, 2015) (**Figure 18**). Toute mutation affectant ce domaine empêche la trimérisation des protéines SUN et inhibent par la suite le recrutement des protéines KASH à l'ENE. Le but de cette trimérisation est donc d'augmenter la stabilité du complexe LINC au sein de l'EN.



**Figure 18 :** Modèle montrant la topologie du complexe LINC liant les deux enveloppes nucléaires externe (ONM) et interne (INM). Les protéines SUN insérées dans l'ENI, s'associent en trimère via leur domaine Coiled-Coil et lient trois peptides KASH dans l'espace périnucléaire. Cette interaction entre ces deux types de protéines fournit une rigidité à l'EN et assure une connexion physique entre la lamine nucléaire et le cytosquelette. D'après (Chang et al., 2015)

#### 6.4.4 Rôle du complexe LINC

Les protéines SUN et les protéines KASH forment des ponts reliant les deux membranes nucléaires interne et externe, augmentant la rigidité de l'EN. Ils permettent de maintenir un espacement uniforme entre l'ENE et l'ENI d'environ 50 nm représenté par l'espace périnucléaire (Gerlitz & Bustin, 2011; Sosa, Kutay, & Schwartz, 2013). Ces ponts protéiques établissent une connexion physique entre le cytosquelette et le nucléosquelette. De cette manière, le complexe LINC permet la transmission des forces exercées du cytosquelette au nucléosquelette et inversement (Guilluy & Burridge, 2015). Ces forces sont indispensables au déroulement de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que le positionnement du noyau dans la cellule, la polarisation cellulaire, la migration du noyau, l'attachement du centrosome à l'EN (X. Zhang et al., 2009) (**Figure 19**), et le mouvement des chromosomes lors de la méiose (gamétogenèse) (Crisp et al., 2006; Starr, 2011; Tzur, Wilson, & Gruenbaum, 2006).



**Figure 19** : Le complexe LINC lie le cytosquelette au nucléosquelette. Schéma représentant le complexe LINC formé par l'association des protéines KASH de l'enveloppe nucléaire externe (ONM) et les protéines SUN de l'enveloppe nucléaire interne (INM). Ces deux protéines interagissent dans le lumen. Les protéines KASH possèdent un long domaine N-ter cytoplasmique capable de lier les différents éléments du cytosquelette tels que les protéines motrices associées aux microtubules comme la dynéine et la kinésine, les filaments d'actine et/ou des protéines d'ancrage du cytosquelette tel que la plectine qui lie les filaments intermédiaires. Les protéines SUN sont insérées au niveau de l'ENI où elles interagissent via leur extrémité N-ter nucléoplasmique soit avec la lamina nucléaire soit avec la chromatine sous jacente. D'après (Gerlitz & Bustin, 2011)

#### 6.4.5 L'importance du complexe LINC dans la spermatogenèse

##### 6.4.5.1 Sun1 et Sun2 :

Sun1 et Sun2 sont à expression ubiquitaire, exprimées au niveau des cellules somatiques ainsi qu'au niveau de certains types des cellules de la lignée germinales. Les protéines Sun1 et Sun2 jouent des rôles divers qui varient selon le type cellulaire. Au niveau des cellules somatiques, elles interagissent via leur extrémité N-ter nucléoplasmique avec la lamine de type A et avec les protéines KASH Nesprine1 et Nesprine2 via leur domaine SUN, permettant l'attachement du centrosome à l'EN durant la neurogenèse (Haque et al., 2006; X. Zhang et al., 2009).

Au niveau des cellules spermatogéniques et particulièrement les spermatocytes I, Sun1 et Sun2 s'associent aux télomères lors de la prophase I de la méiose chez la souris. Sun1 interagit par son extrémité N-ter avec les télomères et avec une protéine KASH5 de l'ENE, via son domaine SUN luminal (Morimoto et al., 2012). Ce complexe LINC ainsi formé permet la transmission des forces du cytosquelette au nucléosquelette nécessaires aux mouvements des chromosomes à l'intérieur du noyau, favorisant par la suite l'appariement des chromosomes homologues et la formation du complexe synaptonémal (Ding et al., 2007).

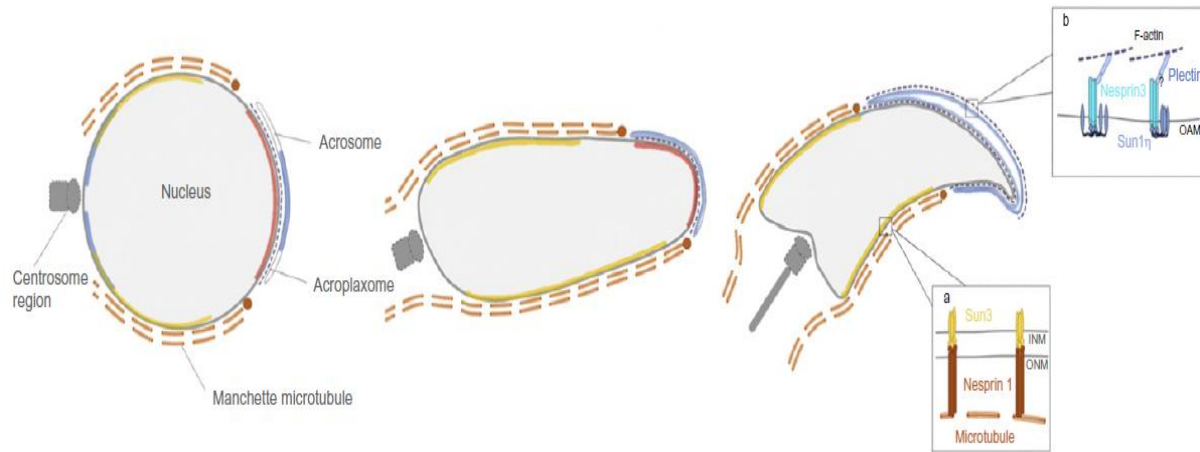
Les souris mâles et femelles invalidées pour le gène *Sun1* sont infertiles et présentent des défauts de ségrégation des chromosomes. Les souris double KO *Sun1*<sup>-/-</sup> et *Sun2*<sup>-/-</sup> meurent à la naissance.

De même, *Sun1*, mais pas *Sun2*, se concentre au niveau des pores nucléaires. Elle est impliquée dans l'organisation de l'EN et particulièrement dans le maintien de la distribution uniforme des pores nucléaires au sein de l'EN. En absence de *Sun1* ou en présence des ses formes mutées, les pores nucléaires se désorganisent et perdent leur distribution uniforme et forment à la place des agrégats (Q. Liu et al., 2007). *Sun1* et *Sun2* sont également impliquées dans la réponse à l'endommagement de l'ADN (DDR pour DNA Damage Response) (Lei et al., 2012).

#### **6.4.5.2. *Sun3* :**

Le complexe LINC intervient également dans la mise en forme du spermatozoïde par la diversité des complexes LINC formés au cours de l'élongation de la spermatide ronde. Deux complexes LINC ont été identifiés au cours de la spermiogenèse. Ils possèdent une localisation spécifique et polarisée. Le premier complexe LINC est formé par l'association de *Sun3*-*Nesprine1*. *Sun3* est exprimée exclusivement au niveau des testicules et au stade post-méiotique. Elle appartient à l'ENI de la jeune spermatide et occupe un marquage polarisé, au niveau du pôle postérieur opposé à l'acrosome. Ce marquage est interrompu au niveau de la fossette d'implantation. L'interaction de *Sun3* et *Nesprine1* se fait via leur domaine SUN-KASH dans le lumen. Le complexe ainsi formé permet la transmission des forces du cytosquelette vers le nucléosquelette via l'interaction du domaine N-ter de *Nesprine1* avec le réseau de microtubules ainsi que des filaments d'actine composants la manchette d'une part et l'interaction de *Sun3* avec la lamina via son domaine N-ter d'autre part. Ces forces seront indispensables à l'élongation du noyau de la spermatide et la morphogenèse du spermatozoïde (Gob et al., 2010). Un autre complexe LINC apparait lors de la spermiogenèse, mais cette fois du côté antérieur. Il s'agit d'un complexe particulier puisqu'il est le premier complexe LINC non nucléaire mis en évidence. Ce complexe résulte de l'interaction de *Sun1 $\eta$*  et *Nesprine3*. *Sun1 $\eta$*  est une isoforme spécifique de *Sun1*, à expression exclusivement testiculaire, située au niveau de la membrane acrosomale externe (Gob et al., 2010). Elle diffère de *Sun1*, par son extrémité N-ter tronquée due à la délétion des exons 7 à 10 et qui a perdu par la suite le signal responsable de sa localisation nucléaire (Gob, Meyer-Natus, Benavente, & Alsheimer, 2011). Ce complexe assemblé du côté antérieur pourrait être responsable de la transmission des forces provenant des prolongements ectoplasmiques des cellules de Sertoli riches en filaments

d'actine sur la partie antérieure du noyau spermatique via l'interaction entre la plectine enrichie dans la jonction Sertoli-Spermatide en élongation, et le domaine N-ter de Nesprine3, recrutée à la membrane acrosomale externe via le domaine SUN de Sun1 $\eta$  (**Figure 20**) (Gob et al., 2010; Kracklauer et al., 2013).



**Figure 20** : Répartition des protéines SUN au niveau d'une spermatide en élongation lors de la spermiogenèse chez la souris. Sun3 (en jaune) est localisée au niveau de l'ENI adjacente à la manchette cytoplasmique (en orange). Sun1 et Sun1 $\eta$  (en bleu). (a) et (b) Représentation des complexes LINC formés respectivement entre Sun3-Nesprine1 du côté postérieur (a) et Sun1 $\eta$ -Nesprine3 du côté antérieur (b) au cours de la formation de la tête. D'après (Kracklauer et al., 2013)

#### 6.4.5.3 Sun4 :

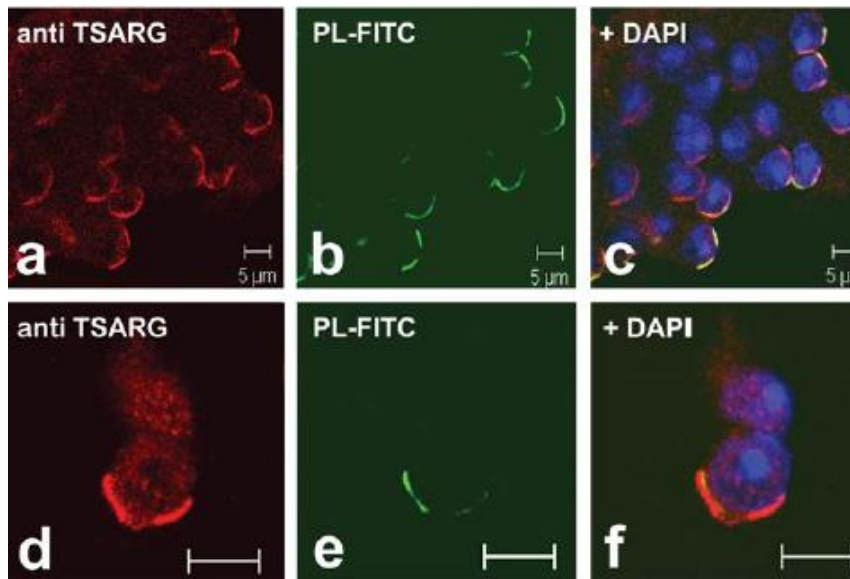
Chez les mammifères, la famille des protéines SUN, regroupe également deux autres membres qui sont Sun4/SPAG4 et Sun5/SPAG4L. Ces deux protéines sont à expression exclusivement testiculaire. Sun4 présente une expression post-méiotique. Elle est localisée au niveau de l'ENI, particulièrement au niveau de la zone en contact étroit avec la manchette de la spermatide en élongation, où elle colocalise avec Sun3. Cette localisation est la même chez l'homme et chez la souris (Kracklauer et al., 2010; Yeh et al., 2015). Au fur et à mesure de la progression de la spermiogenèse, Sun4 migre pour se localiser finalement au niveau des fibres denses externes du flagelle du spermatozoïde épидидymaire (Gob et al., 2010; Shao, Tarnasky, Lee, Oko, & van der Hoorn, 1999). Une étude récente a montré que lors de la spermiogenèse chez l'homme, Sun4 joue un rôle critique dans la mise en forme du spermatozoïde, puisqu'elle forme un complexe stable reliant la lamine nucléaire de type B1 à la protéine de la manchette SEPT12. De même, Sun4 et SEPT12 se relocalisent vers la pièce connective, près du centrosome où elles pourraient contribuer au maintien de l'attachement du centrosome au noyau, et ainsi assurer la stabilité de la liaison entre la tête et le flagelle (Kracklauer et al., 2010) (Yeh et al., 2015).

#### 6.4.5.4 *Sun5/SPAG4L* :

*Sun5/SPAG4L* est une protéine transmembranaire de type II qui appartient à l'ENI et qui constitue un nouveau membre de la famille des protéines SUN. Selon Frohnert et al. (2011), son expression débute au stade post-méiotique, au début de l'apparition des spermatozoïdes ronds (Frohnert, Schweizer, & Hoyer-Fender, 2011). Cependant selon une autre étude réalisée par Jiang et al. (2011), *Sun5* est observée également au stade pré-méiotique au niveau des spermatocytes I (Jiang, Yang, Huang, Li, & Xing, 2011).

*Sun5* ou *SPAG4L*, a été identifiée par homologie de séquence avec *Sun4* ou *Spag4*. Le gène qui code pour la protéine *Sun5* est appelé *SRG4* chez la souris et *SPAG4L* chez l'homme. Il est formé principalement de 12 exons codant pour une protéine de 348 aa mais il produit également suite à un épissage alternatif une nouvelle isoforme plus longue appelée *SPAG4L2* de 373 aa ayant 25 aa supplémentaires du côté N-terminal. Ces deux isoformes sont exprimées d'une façon équimolaire durant la spermiogenèse et occupent la même localisation cellulaire. En effet, Frohnert et al, ont montré que *Sun5* diffère de toutes les autres protéines SUN identifiées à ce jour, par sa localisation polarisée du côté apical de la spermatide ronde (**Figure 21**). Elle se situe au niveau de l'ENI, juste en face de l'acrosome et pourrait par la suite faire partie d'un nouveau complexe LINC indispensable à l'ancrage de l'acrosome à l'EN.

L'expression exclusivement testiculaire de *Sun5* et sa localisation particulière au niveau de la membrane nucléaire interne en regard de l'acrosome, ont fait de cette protéine le premier candidat au quel je me suis intéressée durant ma thèse afin de caractériser les partenaires fonctionnels de *Dpy19l2* avec lesquels elle interagit pour maintenir la stabilité de l'attachement de l'acrosome au noyau spermatique. La mise en évidence du rôle de *Sun5* au cours la spermiogenèse chez la souris permet de caractériser un nouvel acteur dans la spermatogenèse, dont l'altération peut être à l'origine d'une tératospermie telle que la globozoospermie.



**Figure 21 :** Localisation cellulaire de Sun5/SPAG4L/TSRAG au niveau des cellules spermatogéniques de souris. (a) l'anticorps anti-TSARG/Sun5 reconnaît spécifiquement la protéine TSARG (signal rouge) au niveau des spermatides rondes. (b) l'acrosome est marqué par une lectine de type Penaut lectin-FITC (vert). (c) superposition des deux images (a) et (b), les noyaux sont colorés au DAPI et représentés en bleu. (d, e et f) représentent un agrandissement d'une spermatide ronde chez la souris avec un marquage polarisé correspondant à la protéine TSARG/Sun5 (rouge) en regard de l'acrosome (vert), noyau (bleu). Adaptée de (Frohnert et al., 2011)

Ci-dessous un tableau résumant les principaux complexes LINC décrits ainsi que leurs rôles cellulaires (**Tableau 3**).

Nucleoplasmic partners/function	SUN domain protein	KASH domain protein	Cytoplasmic partners/function
Anchorage between lamina and INM Nuclear positioning (160, 161) Maintenance of perinuclear space Anchorage of telomeres (162, 163)	Sun1 and Sun2	Nesprin 1 and Nesprin 2 (multiple variants including GIANT isoforms)	Anchorage between ONM and actin filaments in cytoskeleton Nesprin 2 links nucleus to MTOC and kinesin-1 (164)
		Nesprin 3	Anchorage to intermediate filaments via plectin adaptor protein (60)
Postmeiotic, sperm-specific isoforms (62)	Sun1 $\eta$ and Sun3	Nesprin 1 and Nesprin 3	Manchette microtubules
Sperm-specific isoform (63)	SPAG4 and SPAG4L/2	Unknown	Unknown
Nuclear positioning	Unknown	Nesprin 4	Connects to Kinesin-1 (165)

**Tableau 3 :** Tableau récapitulatif représentant l'association moléculaire ou complexe LINC formé entre les différentes protéines SUN et KASH de l'enveloppe nucléaire. D'après (Martins et al., 2012)

## ***B. Modifications nucléaires***

### ***1. Restructuration globale du génome du gamète mâle haploïde au cours de la spermiogenèse***

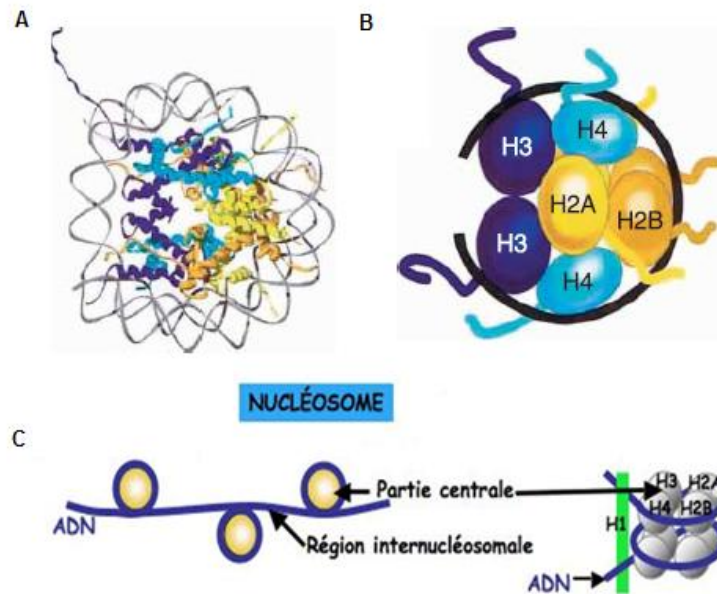
Au cours de la maturation post-méiotique des cellules germinales mâles, le noyau spermatique subit une réorganisation majeure de sa structure, incluant une condensation globale de sa chromatine (Montellier, Rousseaux, & Khochbin, 2012). La chromatine se condense progressivement, par le remplacement des histones riches en lysine, par des protéines nucléaires plus basiques « les protéines de transition ou TPs » (Brewer, Corzett, & Balhorn, 2002). Ces dernières sont à leur tour remplacées par les protamines, riches en arginine et cystéine, pour donner à la fin, un noyau très dense et compact, ayant un volume minimal (Carrell, Emery, & Hammoud, 2007). Le but de cette compaction est de protéger le génome spermatique contre les agressions physiques et chimiques durant son transit dans les voies génitales mâles ou/et femelles et de rendre le spermatozoïde plus hydrodynamique, capable de se mouvoir plus rapidement (Rousseaux et al., 2004). Ce remodelage maintient l'ADN dans un état très compacté et transcriptionnellement inactif, en attendant une éventuelle fécondation d'un ovocyte (Hazzouri et al., 2000).

#### ***1.1 Organisation de la structure de la chromatine dans une cellule somatique***

##### ***1.1.1 Le nucléosome : unité de base de la chromatine***

Dans une cellule somatique, l'ADN est empaqueté dans le noyau sous la forme d'une structure nucléoprotéique appelée la chromatine. Cette dernière est formée par l'assemblage avec l'ADN, des petites protéines basiques appelées « les protéines histones ». La chromatine est organisée en une structure dite « nucléosomale » dont l'unité de base est le nucléosome. Celui-ci consiste en un octamère formé de deux copies de chacune des histones canoniques : H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel est enroulée la molécule d'ADN sur 146 paires de base en 1,75 tour. Le nucléosome est stabilisé par la présence de l'histone de liaison H1 (histone linker 1) qui se lie à l'ADN à l'endroit où celui-ci entre et sort de l'octamère d'histones et scelle ainsi le nucléosome et le relie au nucléosome adjacent (Cutter & Hayes, 2015) (**Figure 22**).

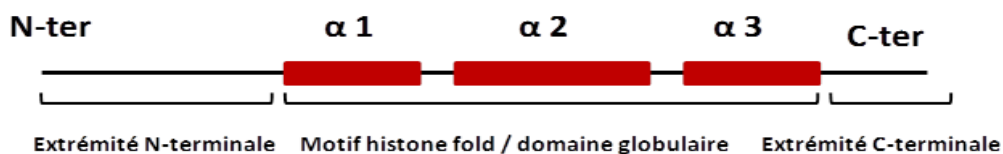




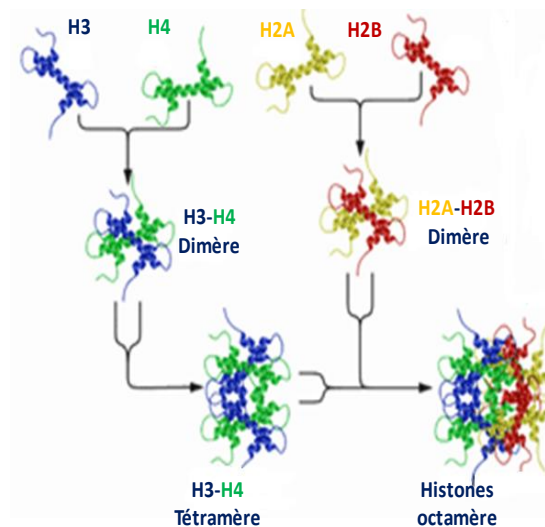
**Figure 22 :** Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine. A- Modèle représentant la structure d'un nucléosome formé de 146 pb d'ADN enroulés autour un octamère d'histones. B-Schéma d'un nucléosome composé d'un octamère d'histones 2(H3-H4) auquel s'adjoignent deux dimères H2A-H2B, entouré par l'ADN représenté par la ligne noire. C- H1 est une histone de liaison qui se lie à l'ADN à l'endroit où celui-ci entre et sort de la particule de cœur et stabilise ainsi le nucléosome. A et B Adaptée de (Zamudio, Chong, & O'Bryan, 2008) ; C Adaptée de ([www.sciencebio.com](http://www.sciencebio.com) modifiée)

### 1.1.2 Les protéines histones

Les histones sont des protéines nucléaires associées à l'ADN dans une cellule eucaryote. Ce sont de petites protéines basiques, riche en lysine et arginine, de faible poids moléculaire (11 à 22 KDa), très conservées au cours de l'évolution (Peterson & Laniel, 2004). Chaque histone se compose de deux domaines : le domaine globulaire responsable des interactions histone-histone (dimérisation des histones) ou histone-ADN, appelé domaine « histone fold », situé du côté C-terminal et organisé sous forme de trois hélices  $\alpha$  reliées entre elles par deux boucles (**Figure 23, 24**) et un domaine N-terminal libre, riche en lysine et arginine, qui projette hors du nucléosome et qui constitue la principale cible de multiples modifications post-traductionnelles.



**Figure 23 :** La structure des protéines histones.



**Figure 24 :**Assemblage des protéines histones au sein d'un nucléosome. D'après (fr.wikipedia.org/wiki/Histone)

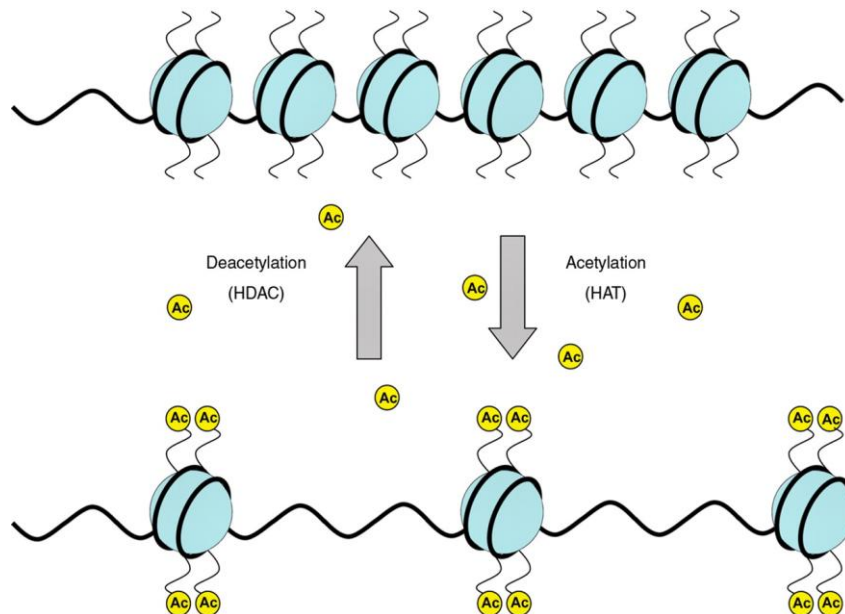
Ces modifications sont dues à l'activité des complexes spécifiques ou des enzymes spécifiques qui apportent l'information épigénétique (Geiman & Robertson, 2002). L'ensemble de ces modifications présentes sous différentes combinaisons, forme le code épigénétique des histones. Ce code définit l'état de la structure de la chromatine : structure permissive ou relâchée (activation de la transcription) ou non permissive/compacte (répression de la transcription), en d'autres termes structure accessible ou non aux facteurs et complexes de régulation de l'expression génique (Lacoste & Cote, 2003). Il existe deux types de facteurs capables de lire et interpréter ces modifications post-traductionnelles : les facteurs à bromodomaine capables de reconnaître les lysines acétylées et les facteurs à chromodomaine capables de reconnaître les lysines méthylées (Rousseaux et al., 2005).

### ***1.1.3 Les modifications post-traductionnelles des protéines histones***

Les protéines histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles covalentes de différents types. Ces modifications ont lieu principalement au niveau des queues N-ter des protéines histones, qui se localisent à l'extérieur de la partie globulaire du nucléosome, bien que dans certains cas le domaine globulaire peut être également touché comme par exemple la méthylation d'une lysine située à l'intérieur du domaine globulaire de l'histone H3 nucléosomale par l'enzyme Dot1(Khan & Hampsey, 2002). Il existe plusieurs types de modifications post-traductionnelles dont on peut citer la méthylation, la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation, et la poly ADP ribosylation (He & Lehming, 2003; J. D. Lewis, Abbott, & Ausio, 2003).

### 1.1.3.1. L'acétylation :

L'acétylation consiste en l'addition d'un groupement acétyle (-COCH<sub>3</sub>) sur des résidus lysine (K) de toutes les protéines histones. Cette acétylation neutralise la charge positive des histones diminuant ainsi leur affinité à l'ADN chargé négativement, dû aux groupements phosphates. Elle est catalysée par des enzymes spécifiques appelées HATs pour histones acétyl transférase. Les HATs sont classées selon leur structure en 3 groupes : les *Gcn5-related N-acetyltransferases* (GNAT), les *MYST-related HATs* (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, TIP60) et les p300/CBP HAT (*E1A-binding protein*, 300kD/*CREB binding protein*) (Roth, Denu, & Allis, 2001). Les histones acétylées peuvent être également désacétylées par des enzymes appelées histones désacétylases ou HDAC (**Figure 25**). L'acétylation provoque un relâchement de la structure de la chromatine, elle est donc associée à une activation de la transcription (Govin, Caron, Lestrat, Rousseaux, & Khochbin, 2004; Pons et al., 2009).



**Figure 25 :** Acétylation des histones. L'acétylation des histones est contrôlée par l'enzyme HAT. Elle consiste en l'addition du groupement acétyle, au niveau de leur queue amino-terminale. Elle aboutit au relâchement de la structure de la chromatine permettant aux facteurs de transcription d'accéder à l'ADN et d'initier la transcription des gènes. Les histones acétylées peuvent être désacétylées par des enzymes appelées histones désacétylases ou HDAC qui éliminent le groupement acétyle aboutissant à une structure non permissive de la chromatine et ainsi à la répression de la transcription génique. D'après (Pons et al., 2009).

Au cours de ces dernières années, d'autres modifications post-traductionnelles des histones ont été identifiées appelées acylations, mais leurs fonctions demeurent inconnues. Parmi ces modifications, la crotonylation des histones (cr) est une nouvelle modification plus puissante que l'acétylation. Elle est associée à une activation de la transcription et affecte toujours les

lysines des histones (Kcr) associées à des gènes transcritptionnellement actifs. Elle est catalysée par l'enzyme p300 qui possède une double activité crotonyl-transférase et acétyl-transférase, et qui utilise dans le cas de la crotonylation, le crotonyl-CoA comme substrat (Baumann, 2015) (Sabari et al., 2015). La crotonoylation est observée lors de la spermatogénèse, lors de l'inactivation des chromosomes sexuels ou MSCI pour « Meiosis Sex Chromosome Inactivation ». En effet, au cours de la méiose, les régions non appariées des chromosomes X et Y subissent une inactivation et une répression de leur expression génique pour éviter l'apparition des aneuploïdies et ainsi l'arrêt de la méiose. Cependant certains gènes liés aux chromosomes X et Y (sex chromosome-linked genes), échappent à cette inactivation et doivent rester actifs pour pouvoir s'exprimer dans les stades post-méiotiques (Turner et al., 2002) (Turner, 2007). Les histones associées à ces gènes sont crotonylées. Cette crotonylation leur confère une résistance aux répresseurs de la transcription, qui domine même dans un environnement répressif. De même, la crotonylation a été identifiée également au niveau de certains gènes autosomaux, à expression post-méiotique active (Tan et al., 2011) (Montellier, Rousseaux, Zhao, & Khochbin, 2012). La crotonylation des histones est réversible, les histones crotonylées peuvent être décrotonylées par l'enzyme Sirt3, qui en plus de son rôle d'histone désacétylase, joue le rôle d'histone décrotonylase (Bao et al., 2014).

### ***1.1.3.2 La phosphorylation :***

La phosphorylation consiste en l'addition du groupement phosphate ( $\text{PO}_3^{2-}$ ) au niveau des résidus sérine (S) et thréonine (T) des protéines histones. Elle est catalysée par des kinases spécifiques. Cette modification est également réversible, les histones phosphorylées peuvent être déphosphorylées par des phosphatases. La phosphorylation, tout comme l'acétylation, est associée à une activation de la transcription génique. Elle intervient également dans la réparation de l'ADN lors des cassures double brin au niveau des cellules somatiques ainsi qu'au niveau des cellules germinales mâles (Oki, Aihara, & Ito, 2007). En effet, lors de l'apparition des cassures d'ADN de type double brin, le variant de l'histone H2A appelé H2AX est phosphorylé par la kinase ATM/ATR, au niveau du résidu 139 ( $\gamma\text{H2AX}$ ). Cette phosphorylation permet le recrutement de la machinerie de réparation de l'ADN aux sites de lésions de l'ADN (Berger, 2002; Derijck et al., 2006). De ce fait, la présence de l'histone  $\gamma\text{H2AX}$  est devenue un indicateur de la survenue des cassures de l'ADN de type double brin.

### ***1.1.3.3 La méthylation :***

La méthylation affecte non seulement des séquences spécifiques de l'ADN, mais peut avoir lieu également au sein des résidus lysine et arginine des protéines histones H3 et H4. Les lysines (K) peuvent être mono, di ou tri-méthylées alors que les arginines (R) peuvent être mono ou diméthylées. Contrairement à l'acétylation, qui est toujours associée à une activation de l'expression génique, la méthylation peut être associée soit à une activation soit à une répression transcriptionnelle, selon le résidu méthylé et son degré de méthylation. Une méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est associée à un relâchement de la structure de la chromatine alors qu'une méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 ou la lysine 20 de l'histone H4, est associée à une structure non permissive de la chromatine et ainsi une extinction de la transcription. L'ajout du groupement méthyle se fait par des enzymes appelées Histone méthyle transférase (HMT). Les HMT sont regroupées en deux classes, celles qui sont responsables de la méthylation des arginines (PRMT) et celles qui sont responsables de la méthylation des lysines (HKMT) (Govin et al., 2004; Peterson & Laniel, 2004). On a longtemps cru que la méthylation des histones était non réversible contrairement à celle de l'ADN, cependant des enzymes spécifiques responsables du retrait du groupement méthyle ont été découvertes récemment. Les histones déméthylases regroupent deux familles : la famille de lysine déméthylase « KDM », de 6 membres (KDM1-KDM6), dont KDM1 ou LDS1, la première lysine déméthylase découverte en 2004, joue un rôle dans la régulation de l'expression génique au cours de la méiose, et la famille des histones déméthylases « JmjC » pour « Jumonji C-terminal domain », qui permettent l'enlèvement du groupement méthyle des lysines et des arginines (Lan, Nottke, & Shi, 2008) (Hou & Yu, 2010) (Tian & Fang, 2007).

### ***1.1.3.4 L'ubiquitinylation :***

L'ubiquitinylation consiste en l'addition d'une (mono) ou plusieurs (poly) molécules d'ubiquitine sur le résidu lysine, au niveau de l'extrémité N-ter d'une protéine cible dont les protéines histones (Weake & Workman, 2008). Elle fait intervenir un système multi-enzymatique, composé de 3 enzymes principales : E1 (ubiquitin-activating enzyme), enzyme responsable de l'activation de l'ubiquitine, synthétisée initialement sous forme inactive, E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), et E3 (ubiquitin-ligating enzyme) ou ubiquitine ligase, responsable de l'addition d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur la lysine de l'extrémité N-ter de la protéine cible (Fang & Weissman, 2004). Les principales ubiquitine-ligases qui interviennent lors de la spermatogenèse sont Huwe1 (X. Wang et al., 2014), UBR2

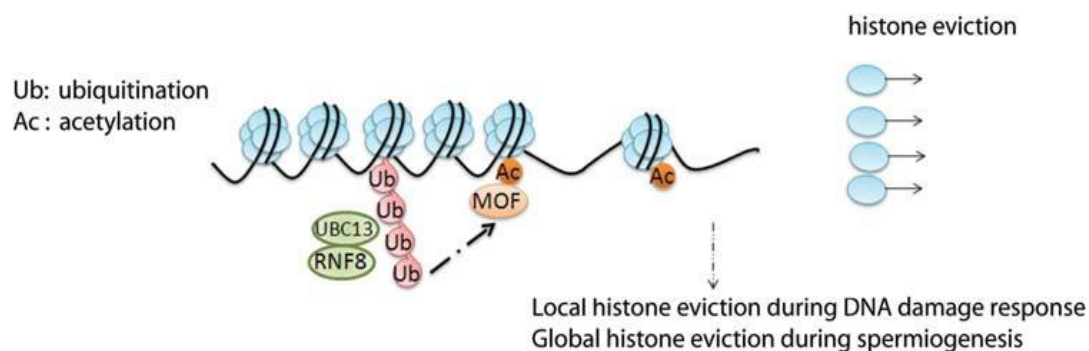
(An et al., 2010) et RNF8 (Ma, Keller, & Yu, 2011). L'ubiquitylation est réversible, comme toutes autres modifications post-traductionnelles. La ou les molécules d'ubiquitine ajoutées peuvent être enlevées par des peptidases spécifiques des ubiquitines (Ubiquitin specific peptidase) ou enzyme de désubiquitylation USP (Ubiquitin Specific Protease) (Sheng, Liang, Huang, & Xu, 2014).

L'ubiquitylation représente la plupart du temps un signal permettant la reconnaissance et la dégradation de la protéine ubiquitinée par le protéasome. Pourtant, l'ubiquitylation des protéines histones est très particulière. Elle est souvent monomérique comme l'addition d'une molécule d'ubiquitine à la lysine en position 119 de H2A et 120 de H2B (Weake & Workman, 2008). Le but de cette ubiquitylation monomérique n'est pas un signal de dégradation (Lacoste & Cote, 2003). En effet, l'ubiquitylation d'une protéine histone intervient dans de nombreux processus cellulaires, comme la transcription génique, où elle peut être associée soit à une activation, soit à une répression de l'expression génique, selon le résidu modifié (Richburg, Myers, & Bratton, 2014).

Elle joue également un rôle important dans la réponse à l'endommagement de l'ADN au niveau des cellules somatiques ainsi qu'au niveau des cellules germinales. En effet, une augmentation de l'ubiquitylation des histones H2A et H2B, est observée et associée à la réponse à l'endommagement de l'ADN (Zhou, Wang, & Rosenfeld, 2009). Les histones H2A et H2B sont également ubiquitylées lors de l'inactivation des chromosomes sexuelles X et Y lors de la prophase I de la méiose ou MSCI pour « Meiosis Sex Chromosome Inactivation » (Mulugeta Achame et al., 2010). De même, l'ubiquitylation des protéines H2A et H2B est impliquée dans le remodelage de la structure de la chromatine lors de la spermiogenèse chez l'homme et chez la souris (Lu et al., 2010). Cette modification post-traductionnelle est essentielle lors de la condensation du génome spermatique. Le gène *HR6B*, l'homologue du gène *Rad6* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, code pour une enzyme de type E2 « ubiquitin-conjugating enzyme », responsable de l'ubiquitylation de H2B chez l'homme et chez la souris. Les souris invalidées pour ce gène sont stériles, et présentent des défauts de spermiogenèse et de la condensation de la chromatine (Baarends et al., 1999) (Roest et al., 1996).

*RNF8* est également un gène qui code pour une enzyme de type E3. Il s'agit d'une ubiquitine ligase, responsable de l'ubiquitylation de H2A et H2B, au niveau des cellules germinales mâles (Ma et al., 2011). Elle intervient lors de deux processus, le premier est la

réponse à l'endommagement de l'ADN, en ubiquitinylant H2A et H2B, au niveau des sites de lésions de l'ADN. Cette ubiquitinylation va permettre le recrutement des facteurs de réparation de l'ADN tel que la protéine BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility Protein) et 53BP1 (p53 Binding Protein 1) au site de l'endommagement (Kolas et al., 2007; Mailand et al., 2007). Le deuxième processus est le remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse. L'ubiquitinylation réalisée par RNF8 est cruciale lors de la spermiogenèse. En effet, l'ubiquitinylation de H2A et H2B par RNF8, induit l'acétylation de l'histone H4 au niveau de la lysine 16 des spermatides en élongation. Cette modification constitue le signal déclencheur qui précède l'enlèvement des histones, et pourrait également contribuer à leur remplacement par les TPs (Lu et al., 2010). En absence de l'enzyme RNF8, les histones H2A et H2B ne sont pas ubiquitinylées et l'acétylation des histones H4 par l'enzyme MOF est très réduite. Ce qui est à l'origine de la rétention des histones au niveau des spermatozoïdes épидидymaires des souris *RNF8*<sup>-/-</sup> et de la stérilité des mâles. La figure 26 présente un modèle illustrant le rôle de RNF8 dans le remodelage de la structure de la chromatine et l'éviction des histones lors de deux processus : la réponse à l'endommagement de l'ADN et la spermiogenèse (**Figure 26**).



**Figure 26 :** Un modèle d'éviction des histones, RNF8 dépendant. Lors de la réponse à l'endommagement de l'ADN ou lors de la compaction du génome mâle haploïde au cours de la spermiogenèse, RNF8 interagit avec UBC13, qui est une enzyme de type E2 « ubiquitin-conjugating enzyme » afin de permettre l'ubiquitinylation des histones situées aux sites d'ADN endommagé. Cette ubiquitinylation va activer l'enzyme MOF de type HAT et induit ainsi l'acétylation des histones facilitant donc leur éviction hors du nucléosome et permettant l'accès de la machinerie de réparation de l'ADN au site endommagé ou l'accès des complexes de remodelage de la structure de la chromatine lors de la spermiogenèse. D'après (Ma et al., 2011).

D'autres rôles de l'ubiquitinylation des histones ont été montrés. Une étude récente a permis de mettre en évidence pour la première fois l'importance de l'ubiquitinylation des histones, et particulièrement la mono-ubiquitinylation de l'histone H2B, nécessaire au bon déroulement du développement préimplantatoire chez la souris. Ceci a été mis en évidence lors de la réduction de l'expression de l'enzyme RNF20, une ubiquitine ligase spécifique de l'ubiquitinylation de H2B, au niveau des embryons de souris par des petits ARN interférents

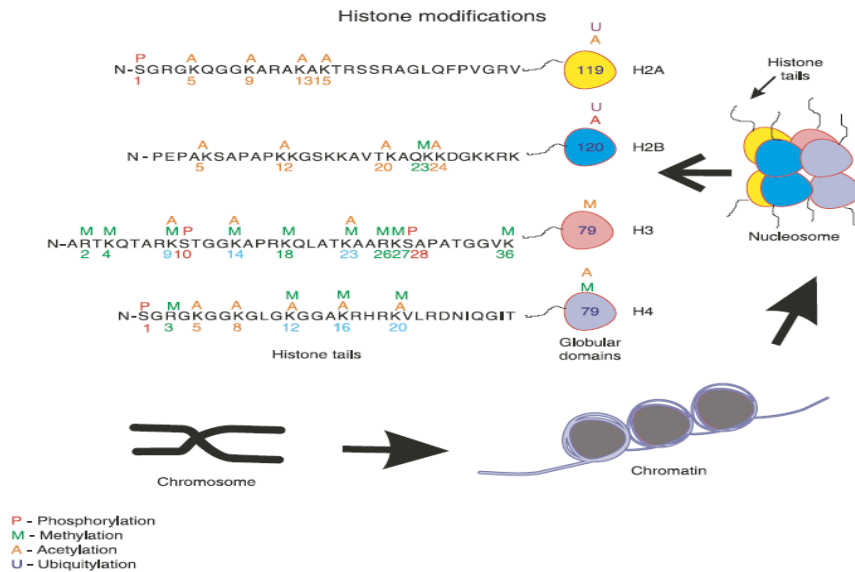
(siRNA). La plupart des embryons traités par ces petits ARNs interférents ne pouvaient plus se développer au-delà du stade morula contrairement aux embryons non traités, qui ont atteint normalement le stade blastocyste (Ooga, Suzuki, & Aoki, 2015).

#### ***1.1.3.5 La poly ADP-Ribosylation :***

La poly ADP-Ribosylation est une modification post-traductionnelle catalysée par des enzymes nucléaires spécifiques appelées Poly ADP-Ribose Polymérase ou PARPs dont les deux membres les plus connus sont les enzymes PARP1 et PARP2 (Quenet, El Ramy, Schreiber, & Dantzer, 2009). Elle consiste en l'addition de plusieurs molécules/polymères d'ADP-ribose (PAR) (Polyanion) sur l'acide aspartique ou/et l'acide glutamique d'une protéine cible, en utilisant le  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur (D'Amours, Desnoyers, D'Silva, & Poirier, 1999). La poly ADP-Ribosylation est une modification qui touche particulièrement les protéines nucléaires dont les protéines histones, les topoisomérases et les facteurs de transcription (Meyer-Ficca, Meyer, Jacobson, & Jacobson, 2005). L'activité des PARPs est régulée par des enzymes spécifiques appartenant à la famille des PARG pour « Poly ADP Ribose Glycohydrolases » (Meyer-Ficca et al., 2009). Les PARG sont principalement cytoplasmiques, mais lors de leur activation, elles transitent, du cytoplasme vers le noyau à travers le complexe du pore nucléaire afin de réguler l'activité des PARPs (Faraone-Mennella, 2005). Ces enzymes sont responsables de la dégradation du polymère d'ADP-ribose ajouté à la protéine cible, due à leur activité endo et exoglucosidase (Pascal & Ellenberger, 2015).

La poly ADP-Ribosylation des protéines nucléaires, intervient dans de nombreux processus cellulaires, tels que la régulation de l'expression génique, la réparation de l'ADN, la réplication de l'ADN et la différenciation cellulaire (Rouleau, Aubin, & Poirier, 2004). PARP1 et PARP2, sont les deux enzymes nucléaires les plus connues de la famille des Poly ADP-Ribose Polymérase. Elles sont activées par les cassures de l'ADN auxquelles elles se lient via leur domaine de liaison. Elles sont impliquées dans la réponse à l'endommagement de l'ADN au niveau des cellules somatiques ainsi qu'au niveau des cellules germinales mâles (Meyer-Ficca, Meyer, et al., 2005). Outre le domaine de liaison à l'ADN, PARP1 et PARP2, possèdent un domaine responsable de leur autorégulation. En effet, PARP1 et PARP2 peuvent être inactivées par leur propre auto-modification et l'ajout de polymère de PAR. Ce polymère possède deux fois plus de charge négatif que l'ADN et va donc permettre le détachement des enzymes PARP1 et PARP2 du site d'endommagement de l'ADN, facilitant ainsi l'accessibilité de la machinerie de réparation de l'ADN (Meyer-Ficca, Lonchar, et al., 2011; Meyer-Ficca, Meyer, et al., 2005).





### Schéma récapitulatif des principales modifications post-traductionnelles des protéines histones

**Figure 27 :** Les principales modifications post-traductionnelles des protéines histones chez les mammifères. L'extrémité N-terminale de la chaîne polypeptidique des histones qui émerge des nucléosomes subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. Acétylation (orange), méthylation (vert), phosphorylation (rouge), et ubiquitylation (violet). Les nombres sous la séquence des histones représentent la position des résidus modifiés. Le nombre en bleu indique un résidu qui porte simultanément deux modifications post-traductionnelles. Adaptée de (Zamudio et al., 2008).

Les modifications post-traductionnelles des histones peuvent avoir des effets les uns sur les autres, par exemple la phosphorylation de la lysine 10 de H3 entraîne une acétylation de la lysine 14 et inhibe la méthylation de la lysine 9 de cette histone. De même, ces modifications peuvent avoir des effets les uns sur les autres non pas nécessairement au sein de la même protéine histone. Ce phénomène est connu par « cross talk » entre les différentes protéines histones. En effet, l'ubiquitylation des histones H2A et H2B, induit l'acétylation de H4 au niveau de la lysine 16 par l'HAT MOF (Lu et al., 2010). De même, la mono-ubiquitylation de H2B au niveau de la lysine 123, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, induit la méthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 4 qui est indispensable à la répression de l'expression des gènes au niveau des télomères (Dover et al., 2002). En effet la mono-ubiquitylation de H2B, contrôle la liaison du complexe COMPASS (Complex Proteins Associated with Set1) ayant une activité méthyltransférase, à l'histone H3 (Miller et al., 2001; Z. W. Sun & Allis, 2002). Ces exemples s'ajoutent à de nombreux autres exemples augmentant ainsi la complexité du code des histones (Lacoste & Cote, 2003). Ces interférences entre les différentes modifications post-traductionnelles contribuent à la régulation de l'état chromatinien dans de nombreux processus développementaux essentiels tels que la spermatogenèse, la réparation de l'ADN, et la transcription.

## ***1.2 Organisation de la chromatine dans une cellule germinale mâle haploïde***

La structure nucléaire est organisée différemment dans une cellule germinale mâle et dans une cellule somatique (W. S. Ward & Coffey, 1991). La compaction post-méiotique du génome de la cellule germinale mâle, est un processus biologique fondamental et très conservé, mais beaucoup de ses bases moléculaires demeurent inconnues. Au cours de la spermiogenèse, et lors de la réorganisation globale de la structure chromatinienne de la spermatide ronde, deux évènements majeurs prennent lieu : d'une part, une incorporation des variants d'histones, dont certains sont à expression exclusivement testiculaire, et d'autre part une hyperacétylation massive des histones affectant la totalité du génome de la spermatide en élongation (C. Caron, Govin, Rousseaux, & Khochbin, 2005). Le but de ces deux processus est de déstabiliser les nucléosomes, puisqu'un nucléosome associé à des variants d'histones est moins stable qu'un nucléosome associé à des histones conventionnelles et de décompacter la chromatine afin de faciliter l'enlèvement des histones et leur remplacement par les protéines de transition ou « TPs » puis par les protamines ou « Prms » (Rousseaux et al., 2006) (Montellier, Rousseaux, & Khochbin, 2012).

### ***1.2.1 Les variants d'histones et leur incorporation.***

Les variants d'histones ont été découverts chez plusieurs espèces. Ils consistent en des isoformes non alléliques des protéines histones conventionnelles et possèdent la capacité de les remplacer au sein du nucléosome (Malik & Henikoff, 2003). Ils diffèrent des protéines histones canoniques par leur séquence primaire sur quelques résidus, tel que le variant H3.3 de l'histone H3 qui diffère de H3 uniquement par 4 aa supplémentaires au niveau de son extrémité N-ter, ou sur des portions plus importantes de la protéine (Rousseaux et al., 2008). Ces variations dans leur séquence en acides aminés leur donnent une structure différente des histones canoniques et leur confèrent des propriétés physico-chimiques spécifiques.

Il existe plusieurs variants pour toutes les histones de cœur ou de liaison à l'exception de l'histone H4 (Zamudio et al., 2008). Les variants d'histones jouent un rôle important au cours de la spermatogenèse, particulièrement lors de la restructuration du génome spermatique. Certains de ces variants sont à expression ubiquitaire alors que d'autres sont à expression exclusivement testiculaire (Gaucher et al., 2010). De même, certains variants sont incorporés lors de la méiose tandis que d'autres sont incorporés au cours de la spermiogenèse et persistent jusqu'au spermatozoïde épидидymaire. Parmi ces variants, TH2A et TH2B sont deux variants des histones H2A et H2B respectivement, présents chez l'homme, la souris et le rat (Govin et al., 2004). Ces deux variants sont synthétisés et incorporés à la chromatine au

stade spermatocyte I dès la méiose I, où ils contribuent à la ségrégation des chromosomes homologues (Shinagawa et al., 2015). Ils sont également présents au niveau des spermatides rondes et jouent un rôle important dans la transition nucléo-histone/nucléo-protamine lors de la spermiogenèse. Ces variants persistent au niveau d'une région d'ADN dense au DAPI, située dans la partie caudale du spermatozoïde au. Ils sont associés aux télomères et jouent un rôle important lors de la décondensation du génome spermatique qui suit la fécondation (Montellier et al., 2013). Les souris mâles double KO *Th2a*<sup>-/-</sup> et *Th2b*<sup>-/-</sup> sont stériles et possèdent une très faible concentration des spermatozoïdes. Ces derniers présentent également un défaut de compaction de leur génome, illustré par une rétention des histones au niveau des spermatozoïdes et une altération de leur substitution par les TPs et les Prms (Shinagawa et al., 2015).

H2AL1 (H2A Like 1) et H2AL2 (H2A Like 2) sont deux variants de l'histone H2A, exprimés très tardivement lors de la spermiogenèse chez la souris. Aucun orthologue de ces variants n'a été identifié chez l'homme (Govin et al., 2007). L'étude de leur localisation cellulaire montre qu'ils sont associés à des régions spécifiques du génome, sensible à l'activité des nucléases, qui sont les régions péricentriques, renfermant également des structures nucléosomales telles que les histones H4 acétylées (Govin et al., 2007). Ces régions ne sont pas organisées au hasard et peuvent porter des informations épigénétiques importantes associées aux gènes indispensables pour le développement embryonnaire (comme les gènes de totipotence) (Hammoud et al., 2009).

De même, les histones de liaison possèdent des variants dont certains sont spécifiques des testicules tel que H1t exprimé au niveau des spermatocytes I ainsi qu'au niveau des spermatides rondes et spermatides en élongation (Fantz, Hatfield, Horvath, Kistler, & Kistler, 2001). HILS1 (H1-Like protein in spermatids 1) est un autre variant de l'histone H1, à expression exclusivement testiculaire et post-méiotique, qui semble remplacer H1t au niveau des spermatides en condensation (W. Yan, Ma, Burns, & Matzuk, 2003). H1t2 est un variant de l'histone H1, exprimé au stade post-méiotique, qui occupe une localisation particulière au niveau du pôle apical de la spermatide ronde juste en dessous de l'acrosome. H1t2 joue un rôle important dans la détermination de la polarité de la spermatide ronde, nécessaire à l'initiation de la condensation du génome mâle (Martianov et al., 2005; Tanaka et al., 2005). Les souris mâles KO *H1t2*<sup>-/-</sup> sont infertiles et leurs spermatozoïdes présentent des défauts morphologiques et nucléaires (Martianov et al., 2005).

Ci-dessous un tableau représentant les différents types de variants d'histones et leur répartition selon leur expression cellulaire (somatique ou spécifique des cellules germinales mâles) à l'exception de l'histone H4 qui ne possède pas de variants.

<b>Histones</b>	<b>Variants somatiques</b>	<b>Variants spécifiques des cellules germinales mâles</b>
<b>H1</b>	<b>H1.1 à H1.5, H1°</b>	<b>H1t, HILSI, H1t2</b>
<b>H2A</b>	<b>H2A.Z, H2A.X, macroH2A, H2ABdd</b>	<b>H2AL1, H2AL2, TH2A</b>
<b>H2B</b>	<b>H2B</b>	<b>TH2B, H2BL1, H2BL2, H2BFWT, SubH2Bv, TSH2B</b>
<b>H3</b>	<b>H3.1 à H3.3, CENP-A</b>	<b>TH3, H3t</b>
<b>H4</b>	<b>H4</b>	<b>H4</b>

**Tableau 4 :** Tableau représentant les histones canoniques ainsi que leur variants divisés en deux groupes selon leur expression cellulaire en variants somatiques et variants spécifiques des cellules germinales mâles.

### ***1.2.2 Hyperacétylation des histones, signal initiateur des réorganisations génomiques***

L'hyperacétylation des histones constitue un événement clé qui déclenche la réorganisation du génome mâle. Au cours de la spermatogenèse, les histones H2A, H2B, H3 et H4 subissent une augmentation importante de l'acétylation au niveau des spermatogonies et des spermatocytes I leptotènes. Puis le niveau d'acétylation diminue progressivement au cours de la méiose au niveau des spermatocytes I pachytènes ainsi qu'au niveau des spermatides rondes, dû à l'activité des HDAC (HDAC1 et HDAC6) présents au niveau de ces cellules (Verdel & Khochbin, 1999). Au début de l'élongation du noyau spermatique, stade 8-9 de la spermiogenèse chez la souris, une augmentation globale du taux d'acétylation des histones est observée sous forme d'une vague affectant la totalité du noyau d'une façon homogène. Cette hyperacétylation apparaît en absence de toute activité de synthèse de l'ADN ou de transcription, et persiste jusqu'au stade 10-11 de la spermiogenèse au niveau des spermatides en élongation. Puis les histones acétylées sont enlevées progressivement dans un sens antéro-postérieur, sauf au niveau d'un domaine nucléaire dense au DAPI, du côté postérieur/basale du spermatozoïde (Hazzouri et al., 2000; Lahn et al., 2002). Cette région fait partie d'un territoire spécifique du génome spermatique où les histones sont conservées et ne sont pas remplacées par les protamines.

L'hyperacétylation des histones est un processus hautement conservé au cours de l'évolution observé uniquement chez les espèces dont les histones sont remplacées par les

protamines au niveau du spermatozoïde mature, comme la truite, la drosophile (Awe & Renkawitz-Pohl, 2010), le rat (Meistrich, Trostle-Weige, Lin, Bhatnagar, & Allis, 1992), la souris et l'homme (Hazzouri et al., 2000). Elle permet de neutraliser la charge positive des histones, diminuant ainsi les forces de leur attraction avec la charge négative du phosphosquelette de l'ADN (Rousseaux et al., 2009). Cela permet un relâchement de la structure de la chromatine, facilitant ainsi l'accessibilité des facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine et le remplacement des histones. Ces facteurs vont contribuer à l'enlèvement des histones et leur dégradation éventuelle pour permettre la déposition des TPs (Rousseaux et al., 2005).

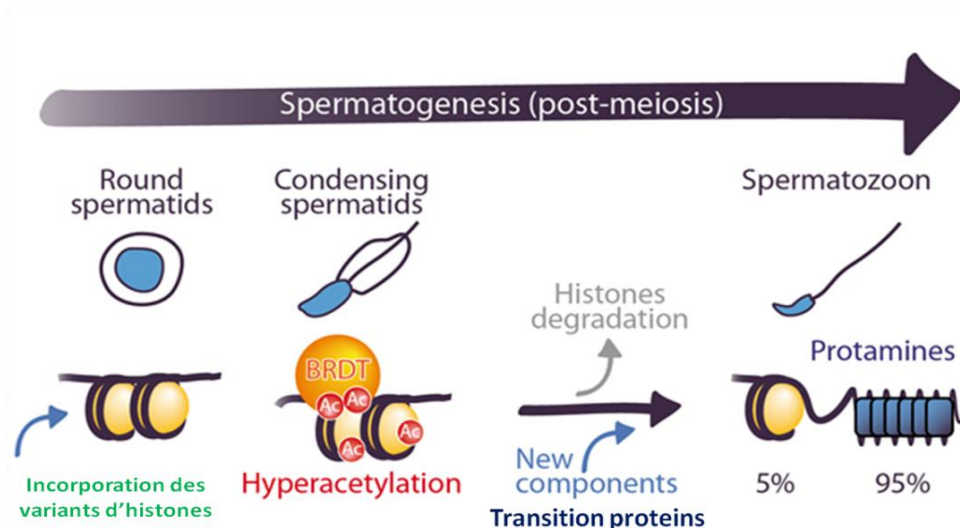
Plusieurs espèces de mammifères, comme l'homme et la souris, présentent une structure hétérogène de leur génome spermatique. Cette hétérogénéité est due à la rétention d'une double organisation nucléo-histone/nucléo-protamine dans leur noyau spermatique. En effet, 15 % du génome spermatique chez l'homme (Gatewood, Cook, Balhorn, Bradbury, & Schmid, 1987) et 3-5% chez la souris sont des régions non associées aux protamines (Pittoggi et al., 1999) et qui ont gardé à la place la structure nucléo-histone, occupée par des histones et/ou variants d'histones dont certains sont à expression exclusivement testiculaire. Ces régions ne sont pas réparties au hasard au sein du génome, au contraire elles correspondent à des territoires de la chromatine renfermant des gènes impliqués dans le développement embryonnaire précoce comme les gènes de la totipotence, les gènes Hox ainsi que des sites de liaison du facteur CTCF (Arpanahi et al., 2009; Rousseaux et al., 2006; van der Heijden et al., 2008). Ces histones retenues dans le spermatozoïde mature peuvent avoir plusieurs rôles. Outre leur contribution à une information épigénétique transmise par le génome paternel, ces histones retenues permettent de faciliter la transcription rapide des gènes nécessaires au développement embryonnaire exprimés immédiatement après la fécondation, qui ne sont pas associés à des protamines, et ne nécessitent pas donc d'être décondensés au préalable. Ces régions peuvent également constituer un site de reconnaissance par les facteurs de remodelage de la structure de la chromatine paternelle après la fusion gamétique, indispensable à la formation du pronoyau paternel (Ooi & Henikoff, 2007; van der Heijden et al., 2006).

### ***1.2.3 Reconnaissance des histones acétylées par des facteurs à bromodomaine et rôle du facteur Brdt dans la condensation du génome mâle haploïde***

Le facteur Brdt ou Bromodomaine testis-specific, est l'un des facteurs de remodelage de la chromatine les plus connus, intervenant lors de la spermiogenèse. Il appartient à la famille des protéines à double bromodomaines BET (Bromodomain and Extra Terminal) qui comprend quatre membres (BDR1 à BRD4) (Berkovits & Wolgemuth, 2013). L'expression de Brdt est spécifique des cellules germinales mâles, particulièrement les spermatocytes I pachytènes et les spermatides en début d'élongation. Il revêt une très grande importance puisqu'il possède une particularité unique de condenser la chromatine uniquement lorsque celle-ci est massivement acétylée, *in vivo* et *in vitro*, par opposition aux autres facteurs de remodelage (Pivot-Pajot et al., 2003).

Grâce à ses deux bromodomaines (BD1 et BD2), Brdt est capable de se lier spécifiquement aux lysines acétylées des histones, lors de la condensation du génome mâle haploïde (Rousseaux, Petosa, Muller, & Khochbin, 2010). En effet, le facteur Brdt ne se lie aux histones H4 que lorsqu'elles sont hyperacétylées. Sa capacité à détecter l'hyperacétylation de H4 est due à son domaine BD1. Le domaine BD1 de Brdt, possède la particularité de reconnaître simultanément deux lysines acétylées de l'histone H4 qui sont H4K5ac et H4K8ac. Cette acétylation simultanée des lysines K5 et K8, est considérée comme un indicateur de l'acétylation complète des 4 lysines de l'histone H4 (K5, K8, K12, K16) permettant au Brdt de démarrer la compaction de la chromatine (B. A. Garcia et al., 2007; Moriniere et al., 2009). Brdt, grâce à l'activité de son domaine BD1, joue un rôle crucial dans la restructuration du génome mâle haploïde, qui est également liée à l'élongation nucléaire. Les souris mâles *Brdt*<sup>ABD1/ABD1</sup> ayant une délétion à l'état homozygote du domaine BD1 de Brdt, sont stériles. Les spermatozoïdes issus de ces souris, présentent un défaut majeur de compaction et d'élongation nucléaire (Dhar, Thota, & Rao, 2012; Shang, Nickerson, Wen, Wang, & Wolgemuth, 2007). Les histones acétylées sont retenues et ne sont pas enlevées, altérant ainsi la déposition ultérieure des TPs puis des Prms. Ces deux types de protéines basiques sont synthétisées normalement et au bon moment au cours de la spermiogenèse, mais n'arrivent pas à s'incorporer à la chromatine, due à la rétention des histones. Brdt contribue ainsi à l'éviction des histones et facilite la déposition des autres protéines non histones compactant l'ADN (Gaucher et al., 2012). Il intervient après l'acétylation massive des histones, au niveau des spermatides en élongation et persiste jusqu'au stade tardif au niveau de certaines régions spécifiques du génome, denses au DAPI, où les histones acétylées sont maintenues jusqu'au spermatozoïde mature, et contribue ainsi à la régionalisation de la

chromatine spermatique (Govin et al., 2006). Si on regroupe l'ensemble des données sur la compaction post-méiotique du génome spermatique, on peut imaginer une séquence des évènements moléculaires suivants aboutissant à l'éviction des histones des nucléosomes lors de la condensation du génome spermatique. Selon ce modèle, l'ubiquitinylation des histones H2A et H2B par l'ubiquitine ligase RNF8 induit l'hyperacétylation des histones. Cette dernière est un prérequis pour le bon déroulement de la compaction post-méiotique du génome mâle haploïde. Elle représente un signal indispensable à la dégradation des histones. Ces modifications post-traductionnelles des histones, s'ajoutent à la déstabilisation des nucléosomes par l'incorporation massive des variants d'histones, permettant ensemble de décondenser la chromatine et faciliter l'accessibilité des facteurs de remodelage de sa structure comme le facteur Brdt. Les histones hyperacétylées sont reconnues par le domaine BD1 de Brdt qui recrute à la chromatine relâchée, les facteurs permettant la dégradation des histones. Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant la dégradation des histones. Une étude récente a suggéré que la dégradation des histones est acétylation-dépendante/ubiquitinylation-indépendante. Cette dégradation est assurée par la protéine PA200 du spermato-protéasome, qui possède un domaine de type bromodomaine Like, lui permettant de reconnaître et de lier les histones acétylées et de les dégrader (Qian et al., 2013). Cependant, l'hyperacétylation des histones est cruciale mais seule, n'est pas suffisante à l'induction de leur enlèvement et leur dégradation. En effet dans de nombreux modèles animaux présentant des défauts de compaction nucléaire, les histones ne sont pas dégradées malgré une hyperacétylation normale. De plus, chez les souris *PA200*<sup>-/-</sup> et chez la drosophile *Prosa6 T*<sup>-/-</sup> (une sous-unité du protéasome), seulement un retard de l'éviction des histones a été observé, mais les histones ont été ensuite normalement remplacées par les protamines au niveau des spermatides en condensation (Goudarzi, Shiota, Rousseaux, & Khochbin, 2014). Ces résultats suggèrent qu'un autre mécanisme de dégradation des histones, protéasome indépendant, devrait également être fonctionnel au niveau des spermatides en condensation pour assurer la dégradation des histones enlevées. Il existe plusieurs mécanismes qui coopèrent pour induire un désassemblage du nucléosome et une éviction des histones. Quel que soit le mécanisme de dégradation, l'acétylation des histones est un signal déclencheur pour leur enlèvement (**Figure 28**).



**Figure 28 :** Modèle décrivant les principaux mécanismes moléculaires impliqués dans la compaction post-méiotique du génome mâle haploïde chez la souris. Le relâchement de la structure de la chromatine lors de la compaction du génome spermatique est dû à l'incorporation des variants d'histones déstabilisant les nucléosomes et à l'hyperacétylation massive des histones. Les histones acétylées sont ensuite reconnues par des facteurs à bromodomaine dont le facteur Brdt, qui permet la condensation ATP-indépendante/acétylation-dépendante de la chromatine et le recrutement des facteurs indispensables à l'enlèvement des histones acétylées et leur dégradation éventuelle. La majorité des histones enlevées est ensuite remplacée par les protéines plus basiques, les protéines de transition, qui à leur tour sont remplacées par les protamines. 1-5% des histones restent associées à des régions génomiques spécifiques à la fin de la spermiogenèse, au niveau des spermatozoïdes matures. Adaptée de [http://www.epigam.fr/epigam\\_dynamics\\_chromatin.php](http://www.epigam.fr/epigam_dynamics_chromatin.php)

#### 1.2.4 Cassure transitoire de l'ADN spermatique et activation de la topoisomérase II beta

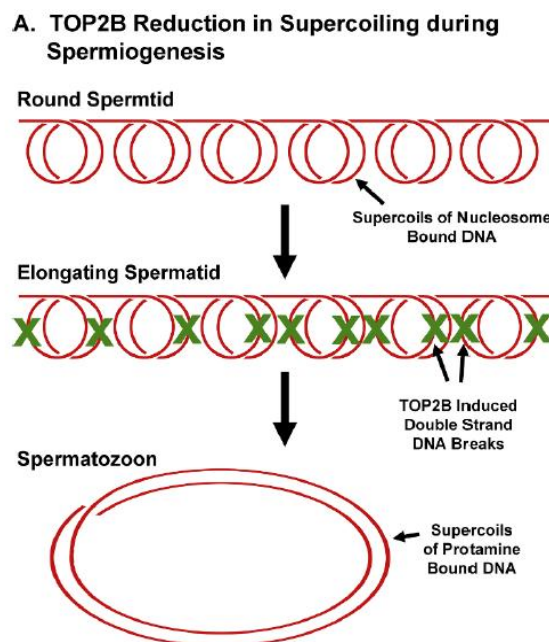
Lors de la spermiogenèse, la chromatine est fortement modifiée et remodelée. Cependant ces modifications ne sont pas limitées à des modifications post-traductionnelles des protéines histones et des échanges de protéines nucléaires. Des cassures transitoires et contrôlées, apparaissent également lors du remodelage post-méiotique de la structure de la chromatine, au niveau des spermatides en élongation, à partir du stade 9-11 de la spermiogenèse chez la souris (Marcon & Boissonneault, 2004; Meyer-Ficca, Scherthan, Burkle, & Meyer, 2005). Ces cassures endogènes, affectent la totalité du génome, et sont générées par la topoisomérase II beta (TOP2B), activée au niveau des spermatides en élongation. Leur apparition coïncide avec l'hyperacétylation massive des histones H4 (Meyer-Ficca, Ihara, et al., 2011). Il est probable que l'activation de la TOP2B soit facilitée par l'hyperacétylation préalable des protéines histones. La génération de ces cassures lors de la spermiogenèse est un phénomène hautement conservé, observé également chez l'homme, la souris (Marcon & Boissonneault, 2004) et chez le rat (Meyer-Ficca, Scherthan, et al., 2005).

#### 1.2.5 Mode d'action de la TOP2B lors de la spermiogenèse chez les mammifères

La TOP2B est une enzyme insoluble, exprimée au niveau des cellules germinales mâles et persiste jusqu'au spermatozoïde mature (Champoux, 2001). Elle intervient lors de la



restructuration du génome mâle haploïde dans le but de changer la topologie de l'ADN en générant des cassures transitoires et contrôlées (Leduc, Maquennehan, Nkoma, & Boissonneault, 2008) (**Figure 29**). Le but de ces cassures générées est d'enlever le surenroulement de l'ADN facilitant l'enlèvement des histones par l'accès des facteurs régulateurs et des protéines chaperonnes à la chromatine (Marcon & Boissonneault, 2004). Avant l'achèvement de la condensation de la chromatine, les cassures de l'ADN sont réparées et ne sont plus détectées à partir des stades 14-15 des spermatides condensées, précédant la déposition des protamines (Leduc et al., 2008). Les TP à leur tour, jouent un rôle complémentaire dans la réparation de l'ADN, puisque des défauts de réparation de l'ADN restent observables au niveau des spermatozoïdes double KO *TP1*<sup>-/-</sup> et *TP2*<sup>-/-</sup> (Zhao, Shirley, Hayashi, et al., 2004).



**Figure 29** : Mode d'action de la TOP2B lors de la spermiogénèse chez les mammifères. Dans les spermatides rondes, la structure de la chromatine est similaire à celle des cellules somatiques. Elle est organisée sous forme nucléosomale représentée par un ADN enroulé deux fois autour d'un octamère d'histones formant ainsi un nucléosome. La première figure (en haut), représente les surenroulements de six nucléosomes. Pour enlever ces surenroulements au niveau des spermatides en élancement, la topoisomérase II bêta (TOP2B), induit dix cassures de l'ADN de type double brin au niveau des six nucléosomes. Le X (en vert) illustre le nombre des cassures double brin réalisées. L'ADN résultant ainsi débouiné, forme la structure de base du toroïde formé lors du dépôt des protamines au niveau du spermatozoïde mature. Adaptée de (W. S. Ward, 2011)

Très peu d'informations sont disponibles concernant les enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN au cours de la spermiogénèse. Les cassures transitoires de l'ADN activent les deux enzymes PARP1 et PARP2, exprimées au niveau des spermatides en élancement (Meyer-Ficca, Scherthan, et al., 2005). Ces enzymes nucléaires sont donc recrutées, suite à leur activation, aux sites de lésions de l'ADN, où elles agissent en ajoutant

le polymère PAR sur les protéines histones associées à la région génomique endommagée, pour faciliter l'accessibilité de la machinerie de réparation de l'ADN au site endommagé. L'une des principales cibles des enzymes PARP1 et PARP2, est le variant de l'histone H1, H1t, associé à l'ADN inter-nucléosomale au niveau des spermatides en élongation. La poly ADP-Ribosylation de l'histone de liaison H1t augmente sa charge négative, ce qui entraîne une diminution de son interaction avec l'ADN, due aux forces de répulsion électrostatique (Atorino et al., 2000) et favorise ainsi le relâchement de la structure de la chromatine.

Outre sa participation au remodelage de la structure de la chromatine, la poly ADP-Ribosylation, intervient dans la réparation des cassures transitoires de l'ADN. PARP1 permet le recrutement de la protéine kinase ATM, responsable de l'initiation de la réparation des cassures d'ADN double brin par la phosphorylation de l'histone H2A.X au niveau du résidu sérine en position 139 ( $\gamma$ H2AX), qui, une fois phosphorylée, recrute à son tour la machinerie de réparation de l'ADN (Haince et al., 2007). PARP1 permet également la régulation de l'activité enzymatique de la TOP2B, de façon que le nombre de cassures générées soit contrôlé pour maintenir l'intégrité de l'ADN paternel (Meyer-Ficca, Lonchar, et al., 2011). En effet, PARP1 se lie à la TOP2B, quand cette dernière coupe l'ADN et provoque sa poly (ADP-ribosylation). Cette modification augmente la charge négative de TOP2B qui se dissocie alors de l'ADN par répulsion électrostatique. Ensuite, PARP1 s'automodifie, ce qui entraîne sa séparation de la TOP2B, qui devient alors libre et se lie de nouveau à l'ADN pour générer une autre cassure à un endroit différent. PARG à son tour dégrade le polymère PAR ajouté à l'enzyme PARP1, qui devient de nouveau active et le cycle de régulation de l'activité de la TOP2B recommence (W. S. Ward, 2011).

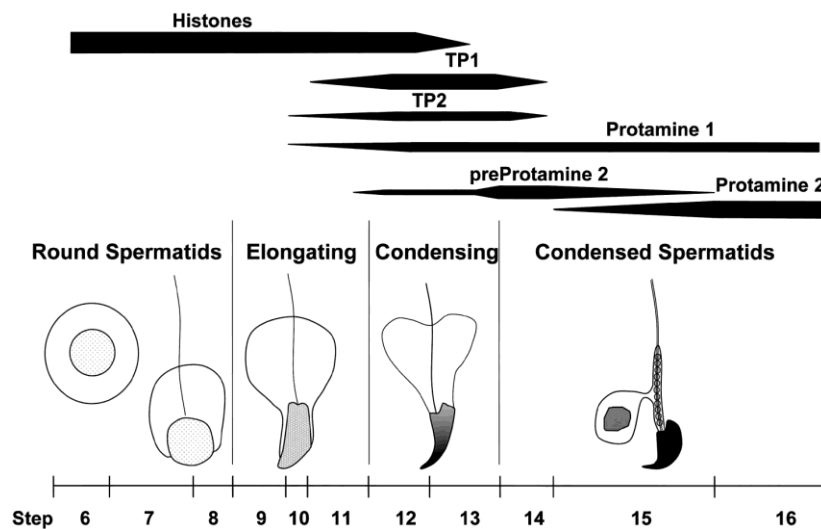
### ***1.3 Les protéines basiques liant l'ADN spermatique***

#### ***1.3.1 Les protéines de transition « TP1 et TP2 » et leur incorporation au cours de la condensation de la chromatine***

La spermiogenèse chez la souris est subdivisée en 16 étapes. Les étapes 1-8 comprennent les spermatides rondes qui ont une activité transcriptionnelle réduite et qui concerne particulièrement les gènes impliqués dans les stades tardifs de la spermiogenèse comme les protéines de transition et les protamines. Les étapes 9-11 comprennent les spermatides en élongation et à ce stade la transcription s'arrête complètement car la chromatine commence à se condenser. Les étapes 12-13 comprennent les spermatides en condensation et 14-16 les spermatides condensées jusqu'aux spermatozoïdes allongés (stade 16) ayant une chromatine bien structurée et compacte (**Figure 30**). Ces derniers seront

finalement libérés dans la lumière du tubule séminifère (W. Yan, 2009). Au cours de la condensation de la chromatine, lors de la spermiogenèse, différents types de protéines basiques se lient à l'ADN dans un ordre spatio-temporel bien déterminé. La figure 30 résume le profil d'expression de ces différentes protéines compactant l'ADN, selon leur ordre d'apparition lors de la spermiogenèse chez la souris.

Les protéines de transition ou TPs sont les premières protéines basiques qui se lient à l'ADN après l'éviction de la majorité des protéines histones (Govin & Khochbin, 2013). Elles apparaissent entre les étapes 10-12 de la spermiogenèse chez la souris (**Figure 30**).



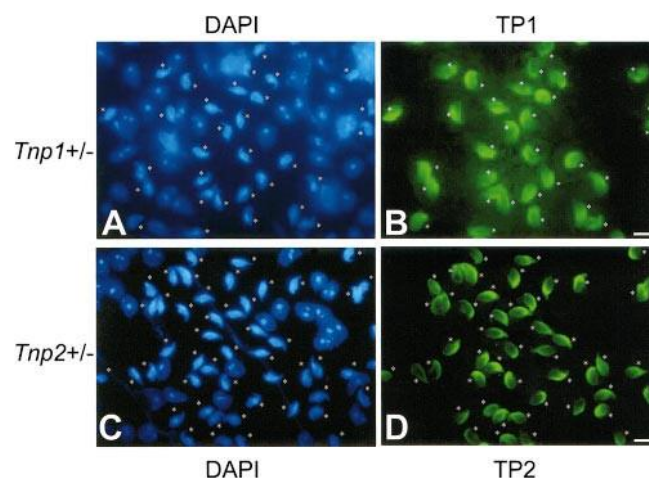
**Figure 30** : Profil d'expression des différentes protéines basiques liées à l'ADN selon leur ordre d'apparition lors de la spermiogenèse chez la souris. La spermiogenèse chez la souris est divisée en 16 étapes classées selon la forme du noyau et l'état de condensation de sa chromatine, en spermatis ronds (6-8), spermatis en élongation (9-11), spermatis en condensation (12-13), et spermatis condensées (14-15) jusqu'au spermatozoïde allongé (16). La barre noire solide représente la présence des protéines. D'après (Zhao, Shirley, Mounsey, & Meistrich, 2004).

### 1.3.1.1 Synthèse et incorporation des protéines de transition lors de la spermiogenèse

Les protéines de transition présentes chez l'homme et chez la souris sont de deux types : protéine de transition 1 ou TP1 et protéine de transition 2 ou TP2 (Brewer et al., 2002). D'autres protéines de transition ont été identifiées chez le rat, nommée TP3 et TP4 mais elles sont moins étudiées (Alfonso & Kistler, 1993). Les TPs sont à expression post-méiotique, leurs gènes correspondants *TP1* et *TP2* sont situés sur deux chromosomes différents, le chromosome 1 pour *TP1* et le chromosome 16 pour *TP2*, chez la souris. Cependant, le gène codant pour TP2 fait partie d'un cluster de gènes renfermant dans l'ordre suivant les gènes *Protamine1-Protamine2-Protéine de transition2* et *Protamine3*. Bien que leur localisation soit différente, les gènes *TP1*, *TP2*, *PRM1*, *PRM2* sont transcrits au même moment au stade

spermatide ronde mais traduits au niveau des spermatides en élongation (Heidaran, Showman, & Kistler, 1988) (Schluter et al., 1996) (Martins & Krawetz, 2007).

Les TPs sont indispensables au bon déroulement de la compaction du génome mâle haploïde. Elles apparaissent dans le noyau de la spermatide dès le stade 10 de la spermiogenèse chez la souris, mais atteignent un niveau d'expression maximale au stade 12-13 chez la souris et 13-15 chez le rat (Alfonso & Kistler, 1993). Elles constituent 90% des protéines basiques qui s'incorporent transitoirement à la place des histones au niveau des spermatides en condensation (Meistrich, Mohapatra, Shirley, & Zhao, 2003) (**Figure 31**).



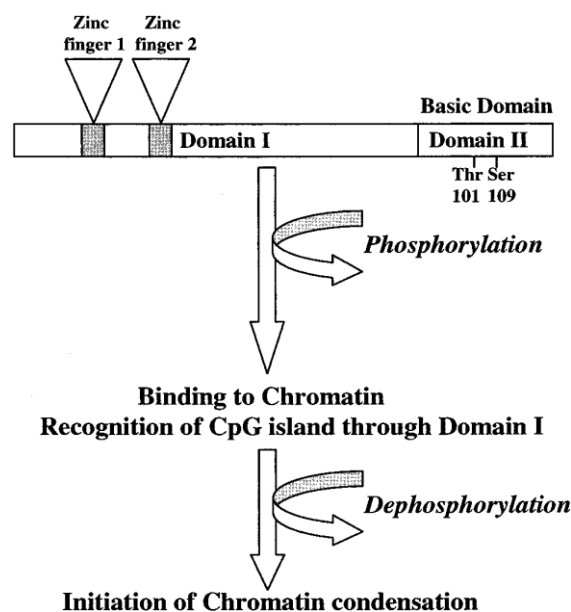
**Figure 31** : Distribution des protéines de transition TP1 et TP2 dans les noyaux des spermatides en condensation. Les noyaux des spermatides correspondants à l'étape 13 de la spermiogenèse chez deux souris hétérozygotes *Tnp1*<sup>+/-</sup> et *Tnp2*<sup>+/-</sup> (A et C respectivement) sont colorés au DAPI (bleu). TP1 et TP2 (B et D respectivement) sont mises en évidence par immunofluorescence en utilisant deux anticorps différents anti-TP1 et anti-TP2 (vert), échelle 10 µm. D'après (Zhao, Shirley, Mounsey, et al., 2004)

### 1.3.1.2 Caractéristiques des protéines de transition

Les protéines de transition sont des protéines de faible poids moléculaire (6.2 KDa pour TP1 et 13 KDa pour TP2), d'une basicité intermédiaire entre celle des histones et celle des protamines (Grimes, Meistrich, Platz, & Hnilica, 1977). L'analyse de la composition de la séquence peptidique de TP1, montre qu'elle renferme environ 20% de lysine, 20 % d'arginine, la sérine est également présente par opposition à la cystéine qui est absente chez la plupart des mammifères, à l'exception du sanglier, du bélier et du taureau (Dadoune, 2003). Par contre, la même analyse réalisée sur la séquence peptidique de TP2 a montré qu'elle renferme environ 10% de lysine, 10% d'arginine, 5 % de cystéine ainsi que de la sérine et de la proline. TP2 possède également deux domaines à doigt de zinc au niveau de son extrémité N-ter, permettant sa liaison à l'ADN (Grimes et al., 1977; Zhao et al., 2001). TP1 est plus conservée que TP2, elle présente 90% d'homologie de séquence nucléotidique et peptidique

entre les espèces (Kremling et al., 1989). De même, son expression est 2.5 fois celle de TP2 (Y. E. Yu et al., 2000).

Après leur traduction, les protéines de transition sont phosphorylées au niveau de leur extrémité C-ter. Cette phosphorylation est indispensable à leur liaison à l'ADN. Cependant une fois liée à l'ADN, les protéines de transition doivent être déphosphorylées pour permettre aux résidus basiques chargés positivement d'interagir avec le phosphosquelette de l'ADN chargé négativement et ainsi d'assurer la condensation de la chromatine (Kremling et al., 1989) (**Figure 32**). La phosphorylation de TP2 a été mise en évidence chez le rat et chez la souris. En effet, « Meetei et ses collègues », ont montré, par des études réalisées *in vitro* et *in vivo*, que TP2 est phosphorylée au niveau de son extrémité C-ter sur la thréonine en position 101 et la sérine en position 109 qui sont les sites majeurs de la phosphorylation de TP2. La phosphorylation de TP2 est catalysée par une protéine kinase A, spécifique des cellules germinales, appelée Cs-PKA pour condensing spermatid-Protein Kinase A (Meetei, Ullas, Vasupradha, & Rao, 2002) (Ullas & Rao, 2003). De même, TP2 se lie préférentiellement à des séquences d'ADN riches en CpG grâce à ses deux domaines à doigts de zinc présents au niveau de son extrémité N-ter (Kundu & Rao, 1996). Cette liaison peut servir comme un locus spécifique pour l'initiation de la condensation de la chromatine par TP2 pendant les derniers stades de la spermiogenèse (Kundu & Rao, 1996; Pradeepa & Rao, 2007). Ci-dessous un modèle représentant la séquence d'évènements probable de la condensation de l'ADN médiée par TP2 (**Figure 32**).



**Figure 32 :** Modèle illustrant la séquence d'évènements probables de la condensation de l'ADN par TP2. D'après (Meetei et al., 2002).

Les TPs sont des cibles pour des modifications post-traductionnelles autres que la phosphorylation. En effet, lors de la spermiogenèse chez le rat, 16 et 19 modifications post-traductionnelles affectant respectivement TP1 et TP2, ont été identifiées par spectrométrie de masse. L'arginine méthyltransférase PRMT4 catalyse la méthylation de TP2 au niveau de l'arginine en position 71, 75, 92. De même, la lysine méthyltransférase KMT7 catalyse la méthylation de TP2 au niveau de la lysine en position 88 (TP2K88me1) et 91. Parmi ces modifications post-traductionnelles affectant TP2 et mise en évidence *in vitro*, deux ont été mise en évidence *in vivo*, au niveau des spermatides en élongation et les spermatides en condensation. Il s'agit de la monométhylation de la lysine 88 (TP2K88me1) et de l'arginine 92 (TP2R92me1). Ces modifications peuvent avoir des significations fonctionnelles importantes lors de la condensation du génome via les TPs (Gupta, Madapura, Bhat, & Rao, 2015).

### ***1.3.1.3 Rôle des protéines de transition dans la restructuration du génome mâle haploïde***

De nombreuses questions ont été posées afin de comprendre le rôle des TPs au cours de la maturation post-méiotique de la chromatine, surtout que chez certaines espèces comme les poissons et les oiseaux, la compaction du génome spermatique ne passe pas par une étape intermédiaire et les histones sont donc directement remplacées par les protamines sans passer par les TPs (Oliva & Dixon, 1991). Est-ce que ces protéines sont responsables de l'enlèvement des histones facilitant ainsi la transformation structurale du génome ? Sinon quelle est la fonction précise de ces deux protéines ?

Plusieurs rôles ont été décrits dans la littérature pour les TPs, parmi ces rôles, certains ont proposé que les TPs et particulièrement TP1, sont impliquées dans la réparation des cassures d'ADN générées au sein de la spermatide (Boissonneault, 2002; Kierszenbaum, 2001). Selon ce modèle, la protéine TP1 stimule la réparation des cassures de l'ADN en se liant à l'ADN chargé négativement au site endommagé due à sa charge positive. Après sa liaison à l'ADN, TP1 recrute une ligase dont la nature n'est pas encore connue pour relier les fragments d'ADN brisés. Une fois la réparation terminée, la condensation de la chromatine peut se poursuivre normalement. Ainsi TP1 prévient la persistance des fragmentations d'ADN au niveau des spermatozoïdes matures (N. Caron, Veilleux, & Boissonneault, 2001).

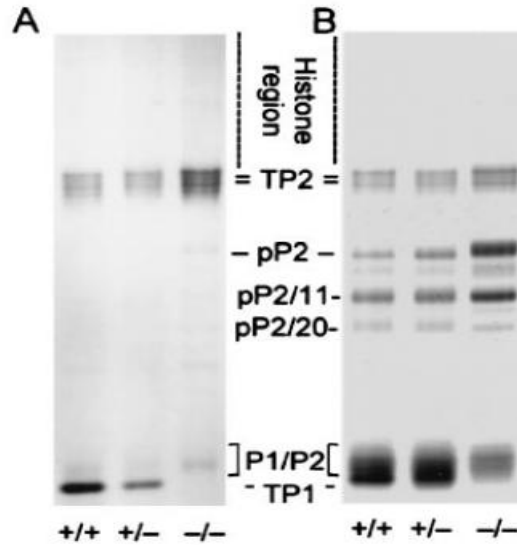
Quant au rôle de TP2, certains ont proposé que cette dernière pourrait être impliquée dans la régulation de l'expression génique et surtout dans la répression de la transcription qui accompagne la condensation de la chromatine lors de la spermiogenèse (Kundu & Rao, 1996). Des études réalisées *in vitro* et *in vivo*, ont montré que TP2 se lie préférentiellement au niveau

des îlots CpG situés en amont des régions promotrices (Kundu & Rao, 1996) (Kolthur-Seetharam, Pradeepa, Gupta, Narayanaswamy, & Rao, 2009). Cette liaison a été mise en évidence *in vivo*, au niveau des spermatides en condensation chez le rat, par une colocalisation entre TP2 et la chromomycine A3 (CMA3) ainsi que le 7-aminoactinomycine D (7-AAD), qui sont deux composés chimiques fluorescents qui possèdent une grande affinité pour l'ADN et particulièrement les régions riches en paires de bases G-C (Kolthur-Seetharam et al., 2009).

#### **1.3.1.4 Création des souris KO $TPI^{-/-}$ , $TP2^{-/-}$ et $TPI^{-/-} + TP2^{-/-}$**

Des souris invalidées pour l'un des deux gènes  $TPI^{-/-}$  ou  $TP2^{-/-}$  ont été créées afin de comprendre la fonction de ces protéines et d'étudier les conséquences de leur absence sur la spermatogenèse et particulièrement la compaction du génome spermatique.

Les souris mâles  $TPI^{-/-}$  étaient fertiles mais leur fertilité était réduite par rapport aux souris mâles  $TPI^{+/+}$  et  $TPI^{+/-}$ . Le nombre de portée issue de la mise en accouplement des souris mâles  $TPI^{-/-}$  avec des souris femelles B6D2F1, était réduit par rapport à celui obtenu dans le cas des souris mâles  $TPI^{+/+}$  et  $TPI^{+/-}$ . La spermatogenèse et la concentration des spermatozoïdes étaient normales mais ces derniers avaient des défauts morphologiques de la tête ainsi qu'une mobilité réduite d'une façon très marquée. Les souris mâles  $TPI^{-/-}$  avaient également une surexpression de la protéine TP2 afin de combler l'absence de TP1. L'étude de la compaction des spermatozoïdes  $TPI^{-/-}$  montre un défaut de maturation de Prm2 (Y. E. Yu et al., 2000). En effet, les protéines de transition sont remplacées dans les étapes tardives de la spermiogenèse (14-16 chez la souris) par des protéines plus basiques qui sont les protamines. Chez les mammifères, il existe deux types de protamines, Prm1 et Prm2 (**Figure 30**). Contrairement à Prm1 qui est synthétisée sous forme mature, Prm2 est synthétisée initialement sous forme d'un précurseur pré-Prm2 de 106 aa chez la souris. Elle subit ensuite un clivage protéolytique séquentiel au niveau de son extrémité N-terminal, donnant naissance à au moins six précurseurs intermédiaires de tailles différentes, avant d'atteindre sa forme mature qui est Prm2 de 63 aa (Chauviere, Martinage, Debarle, Sautiere, & Chevaillier, 1992; Martins & Krawetz, 2007; Yelick et al., 1987) (**Figure 33**).



**Figure 33** : Gel urée-acide acétique représentant le profil d'expression des différentes protéines nucléaires TP1, TP2, Prm1 (P1), Prm2 (P2) au niveau d'une population enrichie en spermatides 12 et 13 (A) et spermatides 12-16 (B) des souris WT, hétérozygote  $TP1^{+/-}$  et KO  $TP1^{-/-}$ . Prm2 existe sous plusieurs formes : pré-Prm2 (pP2) de 106 aa, qui représente le produit primaire du gène *Prm2*, et pP2/11, pP2/20, qui représentent les formes intermédiaires résultant du clivage protéolytique avant les acides aminés 11 et 20 respectivement. D'après (Y. E. Yu et al., 2000)

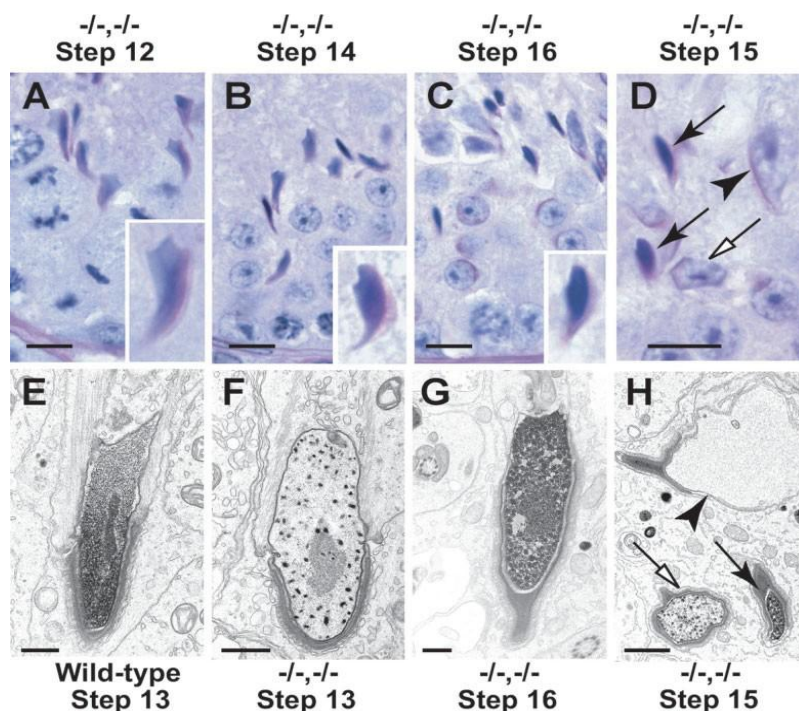
Les souris mâles  $TP2^{-/-}$  étaient également fertiles mais leur fertilité était réduite par rapport aux souris mâles  $TP2^{+/+}$  et  $TP2^{+/-}$ . Le nombre de portée issue de la mise en accouplement des souris mâles  $TP2^{-/-}$  avec des souris femelles B6D2F1 était réduit par rapport à celui obtenu dans le cas des souris mâles  $TP2^{+/+}$  et  $TP2^{+/-}$ . Les tubules séminifères présentaient une histologie normale, la spermatogenèse était normale (concentration normale des spermatozoïdes, mais présence de quelques défauts morphologiques non pas de leur tête mais de leur flagelle). Les souris mâles  $TP2^{-/-}$  avaient également une surexpression de la protéine TP1 afin de combler l'absence de TP2. L'étude de la compaction des spermatozoïdes  $TP2^{-/-}$  montrent un défaut de maturation de Prm2. Ce défaut est illustré par une accumulation des formes intermédiaires de Prm2 au niveau des spermatozoïdes épидидymaires, permettant ainsi d'expliquer en partie, la condensation incomplète de la chromatine au sein de ces spermatozoïdes (Zhao et al., 2001). De même, la répression de la transcription des gènes lors de la compaction de la chromatine était normale au niveau des souris  $TP2^{-/-}$  éliminant ainsi un rôle de TP2 dans l'extinction transcriptionnelle des gènes au fur et à mesure de la progression de la compaction (Zhao, Shirley, Hayashi, et al., 2004; Zhao et al., 2001).

Vu l'effet de compensation des deux protéines TP1 et TP2, il était indispensable de générer des souris double KO déficientes pour les deux protéines, afin de mieux évaluer leur rôle au cours de la spermiogenèse.



Les souris mâles double KO *TP1*<sup>-/-</sup> et *TP2*<sup>-/-</sup> étaient stériles. Elles avaient une spermatogenèse normale, une structure normale des tubules séminifères mais présentaient une rétention prolongée des spermatozoïdes au niveau des testicules. Plus de 80 % des spermatozoïdes épидидymaires étaient morts. Le peu de spermatozoïdes qui était présent dans la queue de l'épididyme avait plusieurs défauts plus sévères que ceux observés lorsqu'une des deux TPs n'était pas présente. Les spermatozoïdes avaient des défauts morphologiques multiples, un défaut de l'ancrage de l'acrosome à l'enveloppe nucléaire, une mobilité extrêmement réduite et une désorganisation du manchon mitochondrial au niveau de la pièce intermédiaire. La compaction de la chromatine chez ces souris était défectueuse et des anomalies majeures sont apparues particulièrement aux étapes 12-13. La condensation de la chromatine à ces étapes débute normalement par un épaississement de la chromatine fibrillaire, qui se fait uniformément selon un sens antéro-postérieur, puis aux étapes 13-16 les fibres s'agrègent et forment une structure dense et homogène. Au niveau des souris déficientes pour TP1 et TP2, la structure fibrillaire de la chromatine était anormale et des points focaux denses, en forme de bâtonnets étaient présents à la place dans le noyau de la spermatide (**Figure 34**). Ces points focaux ont disparu aux stades tardifs de la spermiogenèse, mais la condensation de la chromatine était incomplète et discontinue, avec la formation des lacunes dans le noyau au stade 16 de la spermiogenèse. Il y avait également certaines spermatides qui n'étaient pas du tout condensées (**Figure 34**). En absence des deux TPs, le clivage protéolytique de pré-Prm2 en Prm2 mature était affecté, entraînant une persistance de cette dernière sous forme pré-Prm2 non clivée au niveau des spermatozoïdes épидидymaires. La maturation de Prm2 est donc dépendante de la déposition correcte des deux protéines de transition. De même, l'absence des TPs au niveau des souris invalidées pour les deux gènes *TP1* et *TP2*, n'a pas affecté le déplacement de la majorité des histones et leur enlèvement de la chromatine. Ces dernières ont été enlevées et remplacées au stade tardif par les protamines Prm1 et Prm2.

Ces résultats montrent alors que le déplacement des histones est un processus actif indépendant de la présence des TPs, éliminant ainsi le rôle proposé des TPs dans le déplacement des histones (Zhao, Shirley, Hayashi, et al., 2004).



**Figure 34 :** Morphologie et condensation de la chromatine des spermatides en condensation chez les souris déficientes pour les deux protéines de transition. A-C spermatides en condensation à différentes étapes de développement au niveau des tubules séminifères des souris  $TP1^{-/-}$  et  $TP2^{-/-}$  observées en microscopie optique. D-noyaux de diverses spermatides en condensation, flèche noire noyau d'une spermatide ayant une condensation normale, flèche blanche noyau d'une spermatide moins condensée, pointe de flèche noyau d'une spermatide non condensée. E-H : Noyaux des spermatides à différentes étapes de condensation observées en microscopie électronique. E- condensation normale du noyau de la spermatide chez une souris WT avec un épaissement de la chromatine fibrillaire selon un sens antéro-postérieur, F-condensation irrégulière du noyau de la spermatide des souris  $TP1^{-/-}$  et  $TP2^{-/-}$  avec formation des points focaux dans le noyau, G condensation incomplète du noyau de la spermatide avec formation des lacunes, H-différentes formes de condensation. D'après (Zhao, Shirley, Hayashi, et al., 2004)

Lorsque les noyaux des spermatozoïdes testiculaires  $TP1^{-/-}$  et  $TP2^{-/-}$  sont injectés dans des ovocytes de souris WT, les ovocytes fécondés qui ont survécu suite à l'injection avaient un développement embryonnaire normal jusqu'au stade blastocyste, similaire à celui des ovocytes injectés en utilisant des spermatozoïdes testiculaires WT. Cependant, lorsque les noyaux des spermatozoïdes épидидymaires  $TP1^{-/-}$  et  $TP2^{-/-}$  sont injectés dans des ovocytes de souris WT, le taux de réussite de la fécondation par ICSI était très bas (31% vs 99%) par rapport à celui obtenu en injectant des spermatozoïdes épидидymaires WT. Quelques ovocytes ont été fécondés par ces spermatozoïdes et très peu ont dépassé le stade 2 cellules et ont aboutit à des descendants normaux et fertiles. Ce taux de réussite très bas était associé à une altération du développement embryonnaire et la formation des proniaux materel et paternel anormaux dans la majorité des cas (69%) (Zhao, Shirley, Hayashi, et al., 2004). Certains ovocytes avaient également un défaut d'activation ovocytaire mais ce problème a été comblé en activant les ovocytes artificiellement par le strontium  $Sr^{2+}$ . Cependant, malgré ce traitement le taux de fécondation et du développement embryonnaire sont restés très bas. Ces résultats

montrent que l'altération des spermatozoïdes a été accentuée lors de leur transit épидидymaire et que la stérilité observée des mâles *TP1*<sup>-/-</sup> et *TP2*<sup>-/-</sup> est due à un endommagement de l'ADN résultant de la compaction incorrecte de la chromatine.

TP1 et TP2 ne sont pas donc indispensables au déplacement des histones. Elles ne sont pas également responsables de l'initiation de la condensation de la chromatine, mais sont indispensables au bon déroulement de cette dernière. Leur présence est également nécessaire à la maturation correcte de Prm2 et par conséquent la réalisation d'une condensation complète de la chromatine (Zhao, Shirley, Hayashi, et al., 2004). Elles sont également impliquées soit dans la réparation des cassures transitoires de l'ADN soit dans la prévention des défauts de structure de la chromatine de l'ADN spermatique.

La compaction du génome spermatique nécessite une expression spatiotemporelle correcte des gènes codant pour les protéines basiques dont les protéines de transition TP1 et TP2. Ainsi toute dérégulation de cette expression aboutit à la production des spermatozoïdes défectueux ayant un génome mal compacté, sujet à de nombreuses altérations génétiques. Ces altérations affectent le pouvoir fécondant de ces spermatozoïdes, ce qui peut être à l'origine d'une infertilité.

Récemment des mutations touchant les gènes *TP1* et *TP2* ont été liées à des infertilités masculines chez l'homme, telle que la mutation du gène *TP1*, qui a été identifiée chez 15 patients infertiles atteints de varicocèle parmi une cohorte de 82 patients iraniens. Cette mutation est localisée au niveau d'un intron dans la séquence du gène codant pour TP1. Elle suggère qu'il existe une association entre la mutation du gène *TP1* et la survenue d'un phénotype tel que la varicocèle, cependant l'effet de cette mutation et sa conséquence sur l'expression de TP1 restent encore à déterminer (Heidari, Khatami, Talebi, & Moezzi, 2014). En analysant une autre cohorte de patients infertiles, Miyagawa et al. ont trouvé deux mutations affectant le gène *TP1* et le gène *TP2*. Cependant, la mutation du gène *TP1* affecte le site de liaison du facteur de transcription reconnaissant la séquence CRE (*cAMP response element*) du promoteur du gène *TP1* et aboutit ainsi à une diminution de l'expression de TP1 chez ces patients infertiles. Ces mutations n'étaient pas présentes chez les patients fertiles contrôles (Miyagawa et al., 2005).

### 1.3.2 Les protamines

Les protamines sont des protéines très basiques, de faible poids moléculaires, riches en arginine et cystéine qui se localisent dans le petit sillon de l'ADN. Elles constituent les protéines majeures liées à l'ADN du spermatozoïde mature (Dadoune, 2003).

La plupart des mammifères possèdent un seul type de protamines appelé Prm1, néanmoins l'homme et la souris en possèdent deux types Prm1 et Prm2, exprimées en quantité équimolaire (Yoshii et al., 2005).

#### 1.3.2.1 Organisation structurale, localisation chromosomique et expression cellulaire des gènes *Prms*

Les gènes *Prm1* et *Prm2* qui codent pour les protamines sont composés de deux exons et d'un intron (Dadoune, 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, ils font partie d'un cluster de gènes avec *TP2* au niveau du chromosome 16 chez l'homme et chez la souris (Wykes & Krawetz, 2003). Ce cluster a la particularité d'être encadré de deux séquences S/MAR importantes pour la régulation de la transcription (Martins & Krawetz, 2007) (**Figure 35**). Les gènes codant pour les protamines sont transcrits en même temps que ceux des protéines de transition, au stade spermatide ronde chez la souris. Leurs transcrits restent dans le cytoplasme dans un état quiescent, associés à des ribonucléoprotéines (Choi, Aizawa, & Hecht, 1997). En outre, dans le but de retarder leur traduction, les transcrits de ces protéines basiques sont polyadénylés par l'addition de 160 à 180 résidus d'adénine au niveau de leur extrémité 3'. Ces deux phénomènes permettent de maintenir l'ARNm dans un état inactif. Une fois la traduction de ces transcrits est activée dans les stades tardifs de la spermiogenèse, les ribonucléoprotéines répressives se détachent de l'ARNm et la queue poly A sera dégradée par l'action des nucléases spécifiques (Oliva, 2006).

Chez l'homme et chez la souris, le cluster des gènes codant pour les protéines Prm1, Prm2 et TP2 contient également un quatrième gène « *Prm3* », conservé chez les mammifères, et situé entre les gènes *Prm2* et *TP2* (Nelson & Krawetz, 1994). La protéine Prm3 codée par ce gène, a un poids moléculaire similaire à celui Prm2 mais une composition d'acides aminés complètement différente de celles de Prm1 et Prm2 (Grznil et al., 2008). La régulation de l'expression spatiotemporelle des protamines est très importante puisqu'une expression prématurée de Prm1 aboutit à une condensation précoce de la chromatine et une stérilité des mâles (K. Lee, Haugen, Clegg, & Braun, 1995).

### 1.3.2.2 Synthèse et incorporation de Prm1 et Prm2

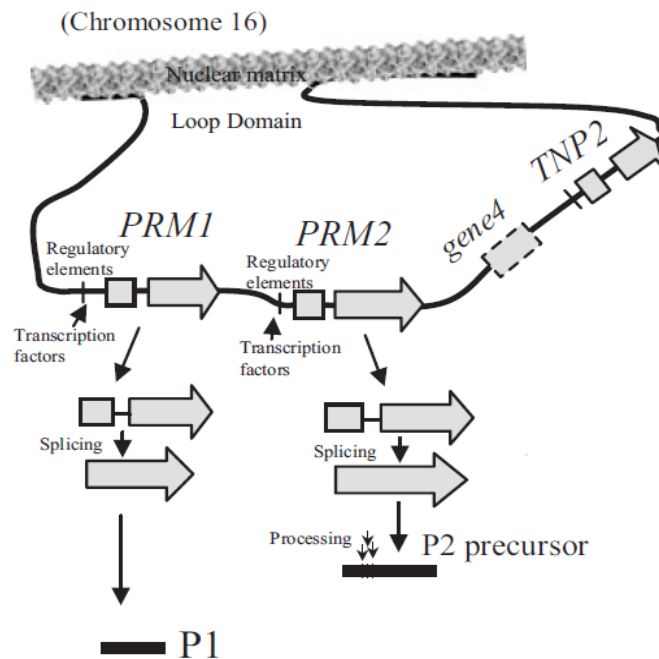
Prm1 est une protéine de 50 aa, riche en arginine et cystéine, dont la séquence est conservée au cours de l'évolution. Prm2 est également riche en arginine et cystéine, par contre elle est moins conservée que Prm1. La principale différence entre Prm1 et Prm2 est la biosynthèse de ces deux protéines. Contrairement à Prm1, qui est synthétisée sous forme mature, Prm2 est synthétisée sous forme d'un large précurseur pré-Prm2 de 106 et 101 aa chez la souris et chez l'homme respectivement (Balhorn, 2007). Le précurseur de Prm2 subit une maturation qui consiste en de nombreux clivages protéolytiques séquentiels avant de donner la forme mature de Prm2 de 63 et 54 aa chez la souris et chez l'homme respectivement (de Mateo, Ramos, de Boer, Meistrich, & Oliva, 2011; Yelick et al., 1987) (**Figure 35**). La maturation de Prm2 prend lieu au niveau des testicules ainsi qu'au niveau de l'épididyme chez la souris (Debarle, Martinage, Sautiere, & Chevillier, 1995).

Le clivage protéolytique séquentiel de la forme pré-Prm2 a lieu au niveau de son extrémité N-ter. Il aboutit à la formation de six protéines intermédiaires issues du clivage. Cette excision a lieu au niveau des résidus 4, 10, 15, 19, 25 et 31 et aboutit aux six formes intermédiaires suivantes Prm2/5, Prm2/11, Prm2/16, Prm2/20, Prm2/26 et Prm2/32 (Elsevier, Noiran, & Carre-Eusebe, 1991). Ces protéines ont été isolées à partir des noyaux purifiés des testicules de souris. Elles sont caractérisées par la composition de leur séquence peptidique riche en arginine, cystéine et histidine. L'analyse de leur séquence montre que la séquence N-terminale de chaque protéine chevauche une région distincte de la partie N-terminale de pré-Prm2 alors que la partie C-terminale est commune à toutes les formes intermédiaires et elle est strictement identique à celle du précurseur principal pré-Prm2.

Bien que, la plupart de la forme précurseur de Prm2 soit convertie en forme mature Prm2, les produits intermédiaires de la maturation persistent au niveau du spermatozoïde épидидymaire chez l'homme et chez la souris mais à un taux très bas légèrement détectable (Gusse et al., 1986) (Debarle et al., 1995). Cependant, une accumulation anormale de ces formes intermédiaires a été trouvée chez de nombreux patients infertiles, indiquant un défaut de maturation de Prm2 (de Mateo et al., 2011). Cette accumulation anormale était corrélée à la présence de fragmentation élevée de leurs génomes due à la compaction défectueuse de la chromatine (Jodar & Oliva, 2014).

À l'heure actuelle, la voie protéolytique impliquée dans la maturation de Prm2 n'a pas été élucidée. Pourtant, la présence des différents groupes de six intermédiaires dans le

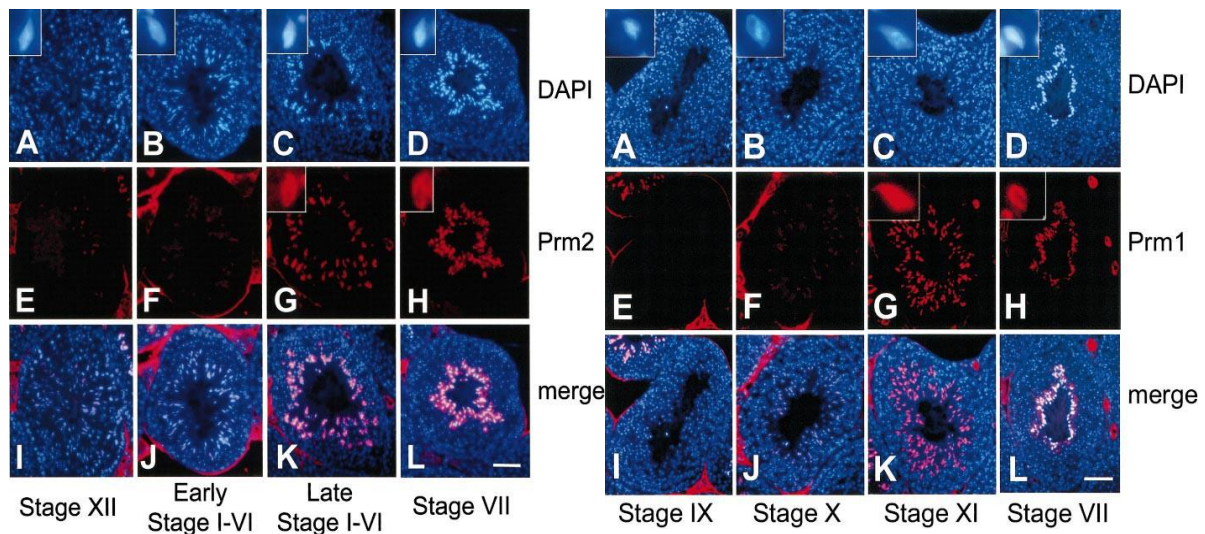
testicule, suggère que certaines étapes de maturation sont plus rapides que les autres ou que certains sites de clivage sont préférés (Y. E. Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001).



**Figure 35 :** Schéma illustrant la transcription des gènes codants pour les protamines, leur traduction et la maturation de Prm2. Le schéma montre la structure génomique des gènes *Prm1*, *Prm2*, *Prm3* (gène4) et *TP2* et comment ils sont transcrits et traduits lors de la spermiogénèse. Prm1 est synthétisée sous forme mature, par contre Prm2 est synthétisée sous forme d'un précurseur puis subit une série de clivage au niveau de son extrémité N-ter pour donner la forme mature Prm2. Adaptée de (Oliva, 2006)

### 1.3.2.3 Localisation subcellulaire des protamines au cours de la spermiogénèse

Une première apparition de Prm1 est observée dès le stade 10 de la spermiogénèse chez la souris puis son expression augmente à partir du stade 11, alors que Prm2 est observée pour la première fois au stade 12. Malgré leur apparition aux stades 10 et 12, les protamines ne sont pas liées à l'ADN. Elles ne s'incorporent qu'à partir du stade 14 après l'enlèvement des TPs (Zhao, Shirley, Mounsey, et al., 2004). Elles constituent les protéines basiques majeures liant l'ADN spermatique à la fin de la spermiogénèse (**Figure 36**).



**Figure 36 :** Localisation cellulaire des protamines 1 et 2 à différents stades des tubules séminifères d'une souris WT. Les noyaux des cellules spermatogéniques à différents stades sont colorés au DAPI (bleu). (A-D) la distribution nucléaire des protamines (signal rouge) est identifiée par un anti-Prm1 (E-H à droite) et anti-Prm2 (E-H à gauche). (I-L) représente la superposition des deux marquages. (à droite) Prm1 (signal rouge) commence à apparaître au niveau des spermatides en élongation (étape 10-11 de la spermiogenèse) au stade XI du cycle de l'épithélium germinale puis son expression augmente pour atteindre un niveau maximal au niveau des spermatozoïdes condensés (étape 16 de la spermiogenèse) où elle occupe un marquage homogène recouvrant la totalité du noyau au stade VII. (à gauche) Prm2 (signal rouge) commence à apparaître au niveau des spermatides en élongation (étape 12 de la spermiogenèse) au stade I-VI du cycle de l'épithélium germinale puis son expression augmente pour atteindre un niveau maximal au niveau des spermatozoïdes condensés (étape 16 de la spermiogenèse) où elle occupe un marquage homogène recouvrant la totalité du noyau au stade VII. D'après (Zhao, Shirley, Mounsey, et al., 2004).

#### 1.3.2.4 Les caractéristiques des protamines

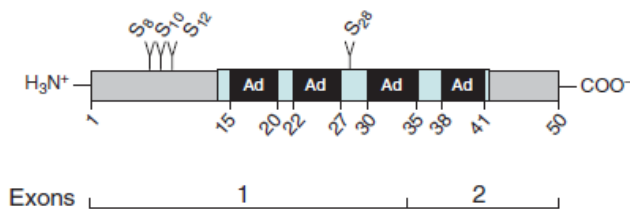
Les protamines possèdent des caractéristiques communes chez tous les mammifères. Parmi ces caractéristiques, deux sont les plus importantes. Les protamines possèdent plusieurs domaines de liaison à l'ADN appelés « Anchoring domain », contenant une série de plusieurs résidus d'arginine (cluster de 3 à 11 résidus d'arginine) chargés positivement, qui se lient au phosphosquelette de l'ADN chargé négativement, par interaction électrostatique. Ce domaine forme le domaine central des Prms responsable de leur liaison à l'ADN. La deuxième caractéristique des protamines est la présence de plusieurs résidus sérine et thréonine qui constituent des sites de phosphorylation des Prms, tel que les résidus sérine en position 8, 10 et 12 pour Prm1 et en position 55, 68 et 76 pour Prm2 (Balhorn, 2007; Dadoune, 2003) (**Figure 37**).

Les protamines des mammifères contiennent également plusieurs résidus de cystéine au niveau de leur extrémité N et C-ter (Vilfan, Conwell, & Hud, 2004). Ces cystéines sont oxydées au cours du transit épидидymaire (de la tête vers la queue de l'épididyme), pour

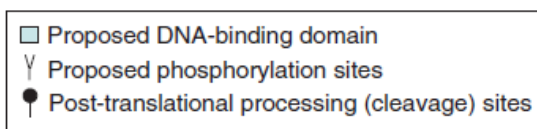
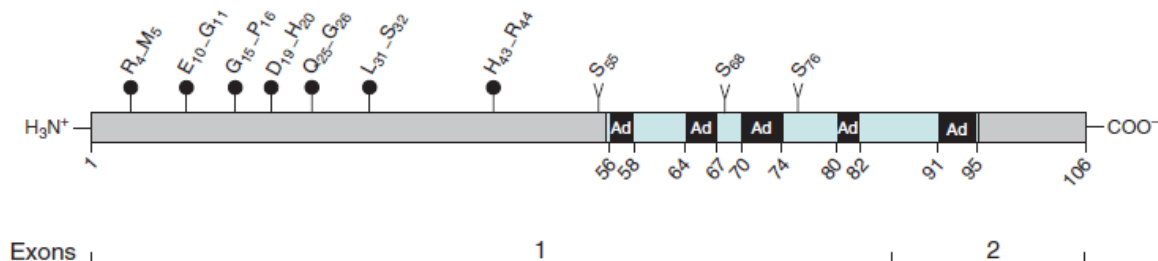
former des ponts disulfures intra et inter moléculaires, qui relient les protamines ensemble et empêchent leur élimination ou leur dissociation de l'ADN (Carrell et al., 2007). Le noyau spermatique contient une sélénoprotéine nucléaire, à expression spécifique des testicules, appelée « nGPx4 », située au niveau de la matrice nucléaire du spermatozoïde (Puglisi et al., 2012). Elle joue le rôle d'une protamine thiol peroxydase, en oxydant les groupements thiols des cystéines constitutives des protamines, permettant une meilleure compaction de l'ADN (Puglisi, Maccari, Pipolo, Mangia, & Boitani, 2014).

Ces ponts disulfure S-S augmentent la stabilité du complexe ADN-Protamines, toutefois ils vont être réduits ultérieurement dans le cytoplasme de l'ovocyte juste après la fécondation, afin de permettre la décondensation du génome paternel et l'initiation du développement embryonnaire (Nobranc, Kocer, & Drevet, 2012).

(a) Mouse protamine P1



(b) Mouse protamine P2



**Figure 37 :** Représentation de la structure primaire des gènes et des protéines Prm1 et Prm2 chez la souris. Représentation schématique de Prm1(a) et Prm2 (b) chez la souris. Les numéros indiquent la position des résidus d'acides aminés, les deux exons constitutifs de la séquence nucléotidique de chacun des deux gènes *Prm1* et *Prm2* sont indiqués en dessous de la structure primaire de chaque protéine. Ad « Anchoring domain » ou domaine de liaison, contenant 3 ou plus résidus d'arginine consécutifs. D'après (Balhorn, 2007)

Chez l'homme, la souris et le hamster, Prm2 diffère également de Prm1, par sa capacité à lier le zinc pour former un domaine à doigt de zinc composé de 2 cystéines et 2



histidines. Ce motif à doigt de zinc peut être impliqué dans la stabilisation de la structure de la chromatine et dans l'inhibition de la transcription génique à la fin de la spermiogenèse (Bianchi, Rousseaux-Prevost, Sautiere, & Rousseaux, 1992). Le zinc est suffisamment abondant à l'intérieur des noyaux des spermatozoïdes de mammifères, permettant la fixation du Zinc sur toutes les molécules de Prm2 (Bench, Corzett, Kramer, Grant, & Balhorn, 2000).

Prm3 contient des clusters d'acides aminés basiques chargés positivement similaires en nombres et en répartition aux domaines de liaison caractéristiques de Prm1 et Prm2. Toutefois, les domaines de Prm3 diffèrent du point de vue composition de ceux de Prm1 et Prm2. Ils sont riches en acides aminés acides, tel que l'acide glutamique et l'acide aspartique, qui sont chargés négativement, éliminant donc la possibilité d'une interaction de Prm3 avec l'ADN (Balhorn, 2007). En plus, Prm3 est une protéine cytoplasmique, localisée au niveau du cytoplasme des spermatides en élongation, et non pas nucléaire, comme Prm1 et Prm2. Prm3 est même absente au niveau du spermatozoïde mature (Grzmil et al., 2008). L'étude des souris mâles invalidées pour le gène *Prm3*, montre que ces dernières sont fertiles avec une spermatogenèse normale et une concentration normale de spermatozoïdes épидидymaires (Grzmil et al., 2008). Cependant, les spermatozoïdes *Prm3*<sup>-/-</sup> avaient une mobilité légèrement réduite par rapport aux spermatozoïdes WT. Le rôle de Prm3 est donc complètement différent de celui de Prm1 et Prm2, non pas lié à la condensation de la chromatine mais plutôt à la régulation de la mobilité spermatique (Martin-Coello, Gomendio, & Roldan, 2011).

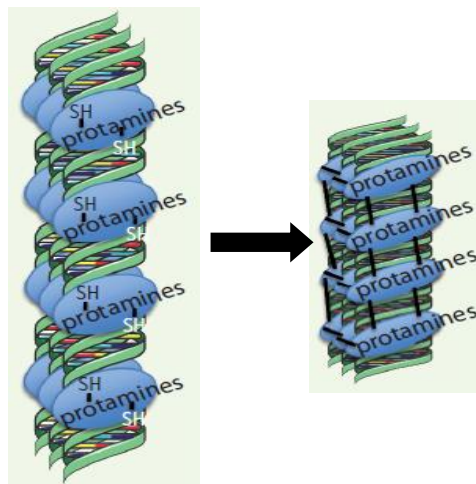
### ***1.3.2.5 Les modifications post-traductionnelles des protamines***

Les protamines subissent des modifications post-traductionnelles, principalement des phosphorylations, chez la truite (Sung & Dixon, 1970) et chez les mammifères (Pirhonen, Linnala-Kankkunen, & Maenpaa, 1994; Pirhonen, Valtonen, Linnala-Kankkunen, & Maenpaa, 1993). En effet, juste après leur synthèse, les protamines sont phosphorylées chacune par une kinase spécifique puis elles sont transportées au noyau (Green, Balhorn, Poccia, & Hecht, 1994). Prm1 est phosphorylée au niveau des résidus sérine et thréonine de son extrémité N-ter, par une kinase appelée SRPK1 pour « Serine/Arginine specific-protein kinase 1 ». Cette enzyme est fortement exprimée au niveau des testicules et permet la phosphorylation de Prm1 au niveau des résidus sérine situés dans des domaines riches en sérine/arginine (Papoutsopoulou et al., 1999). Quant à Prm2, le principal précurseur de Prm2 (pré-Prm2) ainsi que les formes intermédiaires sont également phosphorylées à différents niveaux par la Camk4 (Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline-dependant kinase IV) (Carrell et al., 2007).

La phosphorylation des protamines est indispensable à leur dépôt sur l'ADN. Toutefois, une fois liées à l'ADN les protamines deviennent déphosphorylées pour permettre aux résidus d'acides aminés basiques d'interagir avec le phosphosquelette de l'ADN et assurer la condensation de la chromatine (Rathke, Baarends, Awe, & Renkawitz-Pohl, 2014).

### 1.3.2.6 Fonction des protamines

Plusieurs rôles ont été proposés pour les protamines. Le rôle majeur de ces protéines est d'assurer la condensation de la chromatine, à un très haut degré de densité. L'interaction entre les protamines et l'ADN est due à des forces d'attraction électrostatique entre les domaines de liaison des Prms à l'ADN qui sont chargés positivement et le phosphosquelette de l'ADN chargé négativement (W. S. Ward & Coffey, 1991). Cette interaction, permet en neutralisant la charge négative de l'ADN, de rapprocher étroitement les brins d'ADN adjacents de manière à condenser le génome mâle haploïde dans un volume cellulaire minimal. Cette structure est encore stabilisée par la formation des ponts disulfures intra et inter moléculaires entre les protamines, qui prend lieu durant le transit épидидymaire (Noblanc et al., 2012) (**Figure 38**).



**Figure 38** : Condensation post-testiculaire du noyau spermatique. La condensation de la chromatine du génome mâle haploïde débute au niveau des testicules lors de la spermiogenèse et se poursuit au niveau de l'épididyme. Lors du transit épидидymaire, de la tête vers la queue de l'épididyme, les spermatozoïdes complètent la compaction de leur génome par la formation des ponts disulfure S-S suite à l'oxydation des groupements thiols libres portés par les résidus cystéine des extrémité N-ter et C-ter des protamines. Adaptée de (Noblanc et al., 2012)

Prm1 et Prm2 sont synthétisées en quantité égale (ratio Prm1/Prm2 =1). Toute altération de ce ratio se traduit par une perturbation de la compaction du génome spermatique, puisque les deux protéines, ensemble, sont indispensables à la maturation complète des spermatozoïdes

(Carrell et al., 2007). Cette organisation assez spécifique de la chromatine permet de protéger l'information génétique et épigénétique portée par le génome paternel contre l'activité des endonucléases et des agents mutagènes, lors du stockage des spermatozoïdes et de leur transit dans les voies génitales mâles et femelles.

L'haplo insuffisance d'un des deux gènes *Prm1* ou *Prm2* chez la souris, provoque une réduction de l'expression de l'une des deux protéines et se traduit par une stérilité complète des mâles et la production des spermatozoïdes ayant une forme anormale, une mobilité réduite et un défaut de compaction de leur ADN ainsi qu'un taux de fragmentation élevé (Cho et al., 2001). Une déficience en *Prm2*, chez la souris a été associée à une condensation incomplète de la chromatine et un taux élevé de fragmentation de l'ADN associé à un échec du développement embryonnaire (Cho et al., 2003).

De nombreuses études, ont montré l'importance de l'intégrité du génome paternel comme critère fondamental pour la réussite de la fécondation et la poursuite du développement embryonnaire à terme (Acharyya, Kanjilal, & Bhattacharyya, 2005). De nombreux cas cliniques ont montré l'effet négatif que possède la mauvaise compaction du génome spermatique, chez certains patients infertiles, sur le taux de réussite de la fécondation en utilisant les techniques d'AMP (FIV ou ICSI), et les échecs du développement embryonnaire et d'implantation utérine associés (Cebesoy, Aydos, & Unlu, 2006; Garcia, Noriega-Hoces, & Gonzales, 2007; Tarozzi, Bizzaro, Flamigni, & Borini, 2007). Les techniques d'AMP ne se focalisent plus, uniquement, sur l'étude des paramètres spermatiques tels que la concentration, la mobilité et la viabilité. D'autres méthodes comme le marquage TUNEL, la coloration des noyaux spermatiques au bleu d'aniline ou à la chromomycine A3 (CMA3), ont été développées comme outils permettant d'évaluer la maturité nucléaire des spermatozoïdes avant leur utilisation en AMP (Sharma, Said, & Agarwal, 2004; Spano, Seli, Bizzaro, Manicardi, & Sakkas, 2005).

### ***1.3.3 L'organisation finale de la chromatine dans le noyau spermatique***

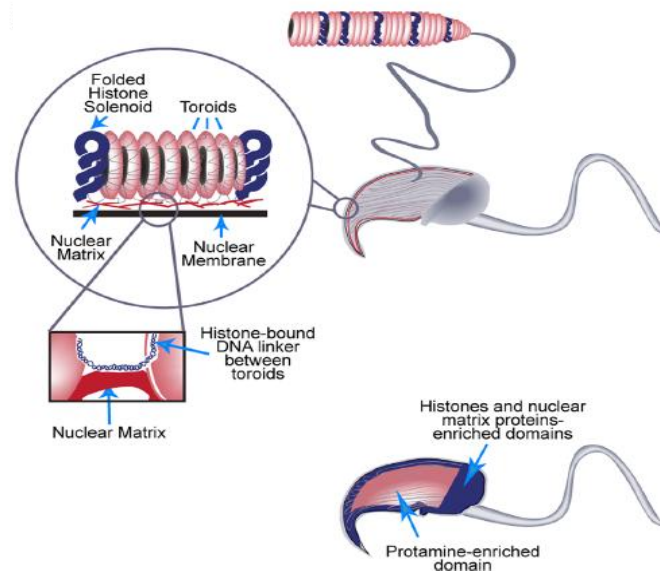
Le génome spermatique chez la souris est six fois plus condensé que celui d'une cellule somatique (W. S. Ward & Coffey, 1991). L'organisation structurale particulière du génome spermatique a été l'objet de nombreuses études, qui visaient à comprendre comment l'ADN spermatique est fortement empaqueté dans un volume assez minimal, et à caractériser les composants nucléaires qui sont importants pour cette organisation.

La chromatine spermatique est divisée en 2 parties : la majeure partie de l'ADN est associée aux protamines (98%) alors qu'une partie mineure de l'ADN garde une structure nucléosomale et reste donc associée aux histones/variants d'histones (2-15% chez l'homme et 3 à 5% chez la souris). Elle diffère de la partie associée aux protamines par sa sensibilité à la DNASE I. Le troisième composant nucléaire qui joue le rôle le plus important dans l'organisation particulière du noyau spermatique, est la matrice nucléaire (W. S. Ward, 2010).

La matrice nucléaire du spermatozoïde est une structure, qui apparaît en microscopie électronique, sous forme d'un réseau protéique fibreux composé de la lamina nucléaire et de protéines agrégées ensemble liées à l'ENI du côté du nucléoplasme (Johnson et al., 2011). Parmi ces protéines, certaines sont structurales telles que l'actine, la myosine, cytokératine, spectrine et la lamine B (Ocampo et al., 2005) et d'autres sont fonctionnelles telles que les facteurs de transcription, les ribonucléoprotéines et la TOP2B (Arpanahi et al., 2009). La matrice nucléaire est également associée à de l'ARN qui joue un rôle important dans la stabilisation de sa structure (Mika & Rost, 2005). Elle joue un rôle crucial dans l'organisation de la chromatine dans le noyau spermatique, en se liant à des régions spécifiques de la chromatine indispensable à la réplication du génome paternel après la fécondation (Wilson & Coverley, 2013) et à la transcription des gènes nécessaires à l'initiation du développement embryonnaire (Mika & Rost, 2005).

Dans le spermatozoïde, la chromatine est organisée de la manière suivante : Les protamines permettent de condenser l'ADN spermatique sous forme de toroïdes ou beignets (Hud, Allen, Downing, Lee, & Balhorn, 1993). En se liant à l'ADN au niveau du petit sillon, les protamines forment des complexes ADN-protamines, empilés de façon lamellaire. Ces lamelles s'organisent ensuite sous forme de beignet et forment ainsi une structure dense et compacte (W. S. Ward & Coffey, 1991). Chaque toroïde est lié à la matrice nucléaire par une séquence d'ADN spécifique de 20-50 kb (par opposition aux cellules somatiques, où cette séquence est de 200 kb), appelée S/MAR. Ces séquences sont organisées sous forme de boucles de tailles régulières, attachées par leur base à la matrice nucléaire du spermatozoïde. Ces boucles séparent les différents toroïdes l'un de l'autre, elles sont donc appelées « toroïde linker region » (Fuentes-Mascorro, Serrano, & Rosado, 2000). Elles ne sont pas protégées par les protamines, et sont donc sensibles à la DNASE I, par rapport aux autres régions du génome (W. S. Ward, 2010). Elles constituent le domaine actif du génome spermatique indispensable à la formation du pronoyau mâle puisqu'elles renferment des origines de réplication du génome paternel et des gènes impliqués dans l'initiation du développement

embryonnaire après la fécondation (Brykczynska et al., 2010; Shaman, Yamauchi, & Ward, 2007c). Ci-dessous, une figure représentant l'organisation de la chromatine dans le spermatozoïde au stade final de la spermiogenèse, juste avant la spermiation (**Figure 39**).

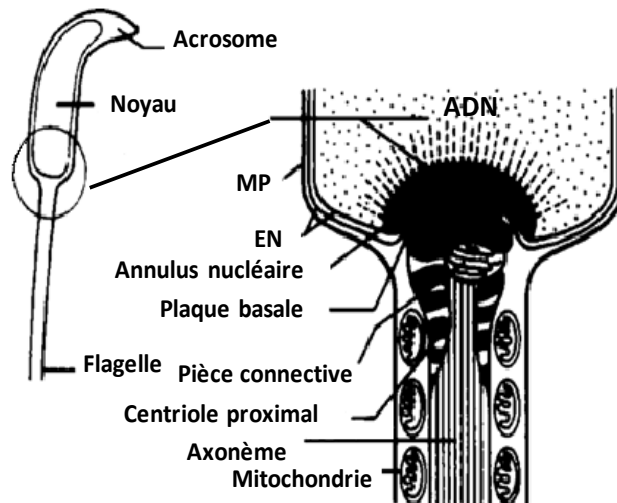


**Figure 39:** Modèle représentant la structure finale de la chromatine dans le noyau spermatique. Adaptée de (Noblanc et al., 2013).

L'intégrité de la matrice nucléaire et les séquences d'ADN (MAR), à laquelle elles sont attachées, est un prérequis pour l'initiation du développement embryonnaire, la formation d'un pronoyau mâle et la réplication de l'ADN paternel après la fécondation (W. S. Ward, Kimura, & Yanagimachi, 1999). Les spermatozoïdes ayant une matrice nucléaire déstabilisée, ne supportent pas le développement embryonnaire après l'ICSI, par opposition aux spermatozoïdes ayant une matrice nucléaire intacte (Shaman, Yamauchi, & Ward, 2007b). En effet, la réplication du génome paternel chez les mammifères après la fécondation, se fait au niveau de la matrice nucléaire. cette dernière est transmise du noyau spermatozoïde à l'ovocyte, où elle contribue à la structure du pronoyau mâle (Shaman et al., 2007c). Le spermatozoïde fournit donc à l'embryon en développement non seulement du matériel génétique/épigénétique, mais également des éléments structuraux tels que la matrice nucléaire et ses séquences MAR indispensables au développement de l'embryon (Yamauchi, Shaman, & Ward, 2011).

Outre ces 3 composants nucléaires, le spermatozoïde du hamster (W. S. Ward & Coffey, 1989) ainsi que celui de l'homme (Farrington, Patel, & Ward, 1991), contient une structure assez particulière située du côté basal à l'intérieur du noyau spermatique au niveau de la fossette d'implantation. En effet, en 1989 Ward et al. ont pu caractériser une structure

nucléaire du spermatozoïde du hamster syrien, (W. S. Ward & Coffey, 1989). Cette structure a été identifiée ensuite dans le spermatozoïde humain (Farrington et al., 1991). Ils ont montré que lorsque le noyau spermatique est complètement décondensé de façon que même les boucles ne sont plus attachées à la matrice nucléaire, l'ADN spermatique était toujours ancré à une structure spécifique du spermatozoïde appelée « annulus nucléaire ou nuclear annulus » (**Figure 40**).



**Spermatozoïde de hamster**

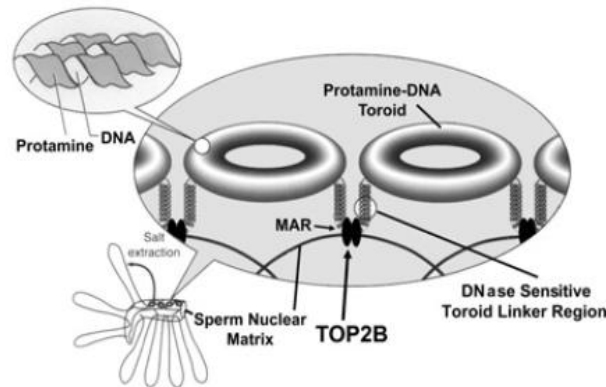
**Figure 40** : L'annulus nucléaire est situé à la base du noyau spermatique chez le hamster. Il est localisé au niveau de la jonction reliant la tête au flagelle. Adaptée de (W. S. Ward & Coffey, 1989).

#### **1.3.4 Rôle de la topoisomérase II beta (TOP2B) au niveau du spermatozoïde mature**

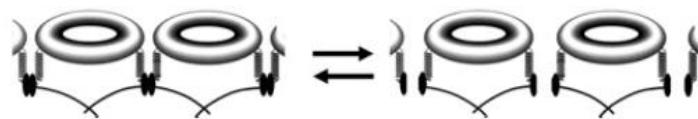
Les spermatozoïdes des mammifères possèdent un mécanisme qui leur permet d'induire une dégradation de leur propre génome d'une manière similaire à l'apoptose des cellules somatiques, lorsqu'ils sont exposés à un environnement stressant. Ce mécanisme est assuré par la TOP2B qui agit en synergie avec une nucléase dont la nature reste encore inconnue (Shaman et al., 2007b; Sotolongo, Lino, & Ward, 2003). La première étape de ce mécanisme est connue par fragmentation de la chromatine du spermatozoïde ou SCF pour « Sperm Chromatin Fragmentation » (Sotolongo et al., 2003). Cette étape fait intervenir la TOP2B, associée à la matrice nucléaire du spermatozoïde au niveau des séquences MAR (W. S. Ward, 2011). Une fois activée, la TOP2B clive l'ADN au niveau des régions MAR et aboutit à la formation des fragments d'ADN de tailles régulières de 50 Kb, qui correspondent aux toroïdes détachés de la matrice nucléaire (Sotolongo, Huang, Isenberger, & Ward, 2005) (**Figure 41**). Suite à l'action de la TOP2B, une nucléase dont la nature n'est pas encore

identifiée, s'active dans le spermatozoïde et provoque la dégradation du génome entier. Ce processus est appelé dégradation de la chromatine spermatique ou SDD pour « Sperm DNA Degradation » (Shaman et al., 2007b). L'activité enzymatique de cette nucléase est similaire à celle d'une DNASE I par sa dépendance aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  (Shaman, Yamauchi, & Ward, 2007a). La figure 41 montre un modèle, illustrant le mécanisme de la dégradation de l'ADN par la TOP2B.

### A. Donut-Loop Model for Sperm Chromatin



### B. Topoisomerase II Mediated DNA Cleavage in SCF



**Figure 41 :** Localisation cellulaire et mode d'action de la topoisomérase II beta au niveau du spermatozoïde. A. Modèle décrivant l'organisation finale de la chromatine dans le spermatozoïde chez les mammifères. Le schéma montre l'ADN spermatique condensé par les protamines et enroulé sous forme de beignet ou toroïde. Ces toroïdes sont reliés entre eux par une région d'ADN non liée aux protamines et qui renferme les séquences MAR appelée toroïde Linker region qui elle-même est liée à la matrice nucléaire. La topoisomérase II beta est associée à la matrice nucléaire au niveau de cette région. B. La topoisomérase II beta, une fois activée, clive l'ADN au niveau de sites d'attachement à la matrice nucléaire, formant ainsi plusieurs fragments d'ADN de taille régulière qui correspondent aux toroïdes qui ne sont plus attachés à la matrice nucléaire. D'après (Shaman et al., 2007b)

Bien que les mécanismes moléculaires qui contrôlent la relation entre la TOP2B et la nucléase, restent encore inconnus, il semble que la fragmentation de l'ADN induite par la TOP2B, est un prérequis à la digestion complète, ultérieure par la nucléase. Le spermatozoïde suit ce mécanisme lorsque son ADN est trop endommagé. Cette dégradation peut avoir lieu au sein du spermatozoïde lui-même ou dans le cytoplasme de l'ovocyte fécondé (M. A. Ward & Ward, 2004). Elle est considérée comme un moyen de prévention, utilisé par le spermatozoïde pour empêcher la fécondation et ainsi la transmission d'une information génétique erronée au futur embryon.

### ***Fin de la spermiogenèse***

Après tous ces remaniements, les spermatozoïdes tombent dans la lumière des tubes séminifères après avoir perdu la majorité du cytoplasme ainsi que des organites cellulaires inutiles comme le RE, l'appareil de Golgi et le ribosome, sous forme de corps résiduel, phagocyté ultérieurement par les cellules de Sertoli (Moreno et al., 2006). Les spermatozoïdes vont être ensuite transiter dans l'épididyme, où ils vont terminer leur maturation (O'Donnell, Nicholls, O'Bryan, McLachlan, & Stanton, 2011) et attendre une éventuelle éjaculation dans l'épididyme caudal.





## **Chapitre III. Fécondation et fusion gamétique**

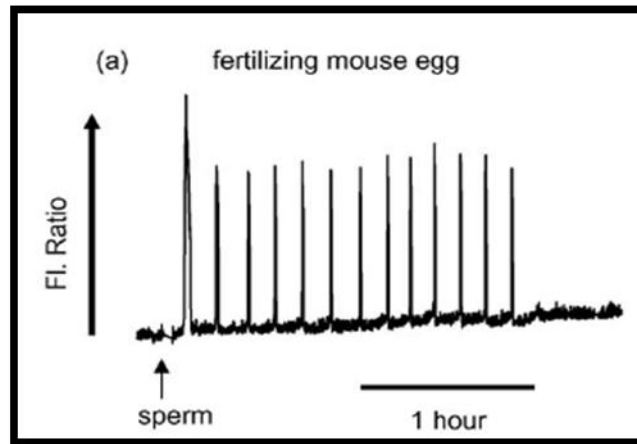
Les spermatozoïdes déposés dans les voies génitales femelles vont subir une deuxième étape de maturation, appelée capacitation, leur permettant de réaliser la réaction acrosomique et la fusion intergamétique. Cette fusion déclenche l'activation ovocytaire, première étape du développement de l'embryon. Je vais plus particulièrement m'intéresser à cette étape car celle-ci a été décrite comme défectueuse lors de fécondation avec des spermatozoïdes globozoospermiques.



## *Chapitre IV. L'activation ovocytaire chez les mammifères*

Juste après l'ovulation, l'ovocyte des mammifères est bloqué en métaphase de seconde division méiotique (MII). Le cycle cellulaire ainsi que l'activité métabolique sont bloqués. La fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte déclenche une activation ovocytaire, qui se traduit par une série d'évènements qui prennent lieu au sein de l'ovocyte, et qui se déroulent selon un ordre bien précis (Ben-Yosef & Shalgi, 2001). Ces évènements consistent entre autre à la réaction corticale qui permet l'exocytose des granules corticaux et ainsi le blocage de la polyspermie, l'achèvement de la deuxième division méiotique et l'expulsion du deuxième globule polaire et finalement l'initiation du développement embryonnaire par la formation des deux pronoyaux mâle et femelle (Swann & Yu, 2008; Wakai & Fissore, 2013).

L'activation ovocytaire est une étape cruciale qui a lieu chez la plupart des espèces animales juste après la fécondation (Dale, Wilding, Coppola, & Tosti, 2010). Elle se traduit par une augmentation rapide et transitoire de la concentration intracellulaire en calcium libre  $[Ca^{2+}]_i$ , due à la libération du calcium par le RE, le principal réservoir des ions calciques (Ducibella, Schultz, & Ozil, 2006). Ce signal calcique est observé chez un grand nombre d'espèces, cependant sa fréquence, son amplitude et sa durée varient d'une espèce à une autre. Il consiste en un seul pic calcique chez l'oursin et chez la grenouille, contre une série d'oscillations calciques répétitives, espacées d'un intervalle de temps régulier dont la durée peut aller d'une augmentation toutes les deux minutes à une augmentation chaque heure chez les mammifères (Swann, Saunders, Rogers, & Lai, 2006) (Kashir, Nomikos, Lai, & Swann, 2014; Wakai, Vanderheyden, & Fissore, 2011) (**Figure 42**).



**Figure 42 :** Schéma représentant les oscillations calciques générées au sein de l'ovocyte de souris au moment de la fécondation. L'axe des ordonnées est exprimé en unité arbitraire, il représente une mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  en utilisant le fura 2 dextran. Adaptée de (Swann et al., 2006)

De nombreuses études ont été menées afin de comprendre le mécanisme à l'origine de ce signal, pour ce faire il était nécessaire de savoir comment le spermatozoïde génère le changement de  $Ca^{2+}$  dans l'ovocyte.

Plusieurs hypothèses ont été proposées parmi lesquelles : l'hypothèse de la bombe à calcium, l'hypothèse du pore à calcium, l'hypothèse du contact ou hypothèse ligand spermatique/récepteur ovocytaire, et finalement l'hypothèse du facteur spermatique activant une voie de signalisation intra-ovocytaire responsable du réveil de l'ovocyte.

### ***1. Les différentes hypothèses proposées, expliquant l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au sein de l'ooplasmе au moment de la fécondation***

#### ***1.1 L'hypothèse de la bombe à calcium***

Dans cette hypothèse le spermatozoïde fournit à l'ovocyte, juste après la fusion des deux gamètes, du calcium qui induit les vagues calciques observées par le mécanisme de la libération du calcium induite par le calcium (CICR) pour «  $Ca^{2+}$  induced  $Ca^{2+}$  release ». Néanmoins, les mesures du taux du  $Ca^{2+}$  au niveau du spermatozoïde et de l'ovocyte juste après la fusion membranaire, ont montré que le spermatozoïde a une faible concentration de  $Ca^{2+}$ , identique à celle des ovocytes MII non fécondés. Par conséquent, l'idée que le spermatozoïde amène des ions  $Ca^{2+}$  pour aider à déclencher les oscillations calciques générées dans l'ovocyte a été abandonnée (Wakai et al., 2011).

### **1.2 L'hypothèse du pore à calcium**

Dans cette hypothèse l'origine du calcium est extracellulaire. Elle suggère que le calcium extracellulaire pourrait passer plus facilement dans l'ovocyte après la fusion des deux gamètes. Toutefois, les vagues calciques sont normales et ne sont pas inhibées après fécondation dans un milieu extracellulaire dépourvu du calcium, éliminant ainsi cette hypothèse (Nomikos, Swann, & Lai, 2012).

### **1.3 Hypothèse ligand spermatique/récepteur ovocytaire : Récepteur couplé aux protéines G/PLC $\beta$ , Récepteur à activité tyrosine kinase/PLC $\gamma$ .**

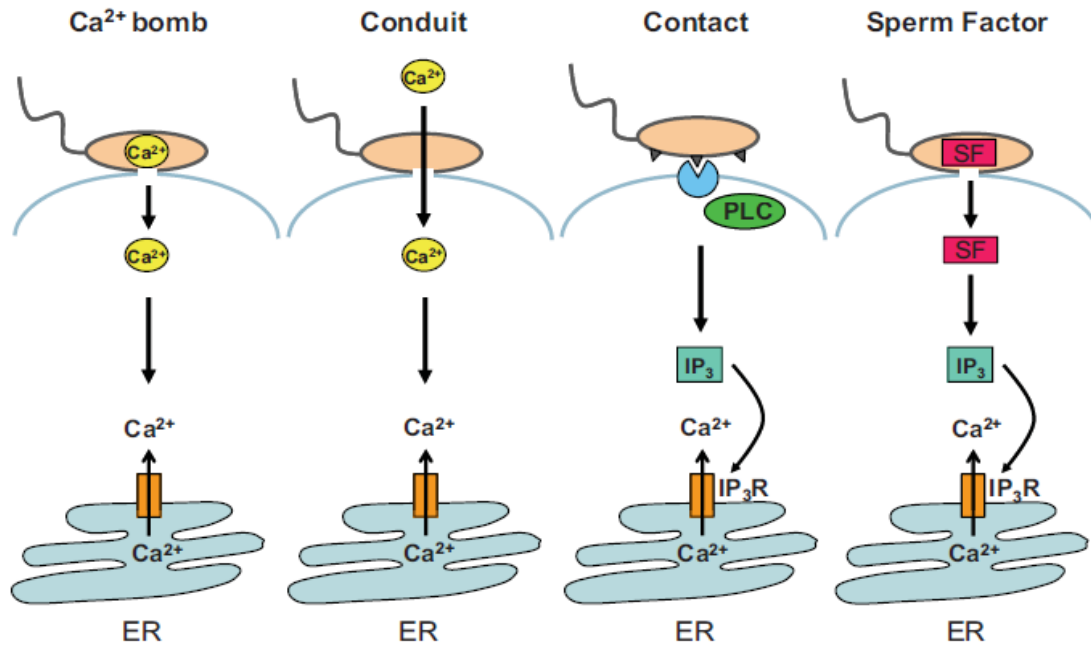
Cette hypothèse suggère que l'augmentation du taux du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est due à la stimulation par des protéines spermatiques, soit d'un récepteur transmembranaire couplé aux protéines G/PLC $\beta$ , soit d'un récepteur à activité tyrosine/kinase exprimé à la surface de l'ovocyte. Toutefois, des expériences réalisées ont montré que l'injection d'un analogue non hydrolysable du GTP dans le cytoplasme de l'ovocyte chez le hamster et chez la souris induit une augmentation du taux  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transitoire sans oscillation (Carroll, Swann, Whittingham, & Whitaker, 1994; Williams, Mehlmann, Jaffe, Kopf, & Schultz, 1998). De plus, des inhibiteurs fonctionnels et spécifiques des récepteurs couplés aux protéines G n'ont pas bloqué l'activation ovocytaire lors de la fécondation chez les mammifères (Swann, 1990). L'activation de récepteur n'est donc pas compatible avec la signalisation calcique observée.

Quant à la voie récepteur à activité tyrosine/kinase /PLC $\gamma$ , l'hypothèse suggère dans ce cas que la famille des protéines Src active une PLC $\gamma$  présente dans le cytoplasme de l'ovocyte, qui va à son tour aboutir à la production du second messager inositol trisphosphate (IP3) et la libération du calcium du RE. L'inhibition de l'activation de la PLC $\gamma$ , par la surexpression du domaine SH2, a aboli le signal calcique chez l'oursin mais n'avait aucun effet sur l'activation ovocytaire chez les mammifères (Mehlmann, Carpenter, Rhee, & Jaffe, 1998). De même, l'injection de la protéine recombinante de la PLC $\gamma$ , dans le cytoplasme de l'ovocyte de souris, n'a pas induit une augmentation du signal calcique intracellulaire, suggérant que l'apparition des vagues calciques suite à la fécondation, ne passe pas par la voie PLC $\gamma$ , du moins chez les mammifères (Mehlmann, Chattopadhyay, Carpenter, & Jaffe, 2001).

### **1.4 L'hypothèse du facteur spermatique activateur**

La quatrième hypothèse proposée était que le signal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induit par le spermatozoïde, est dû à un facteur spermatique activateur appelé SF pour « Sperm Factor », délivré du spermatozoïde à l'ovocyte après la fusion des deux gamètes. Ce facteur provoque une augmentation de la production d'IP3 qui à son tour se fixe sur son récepteur IP3R1,

présent à la surface du RE, provoquant ainsi son ouverture et la libération des ions calciques à l'origine des oscillations transitoires et répétitives (Swann, 1996; Swann, Parrington, & Jones, 2001) (**Figure 43**).



**Figure 43 :** Les différentes hypothèses proposées sur le mécanisme moléculaire potentiel de l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans le cytoplasme de l'ovocyte, déclenchant l'activation ovocytaire au moment de la fécondation. (De gauche à la droite) l'hypothèse de la bombe à calcium, l'hypothèse du pore à  $Ca^{2+}$ , l'hypothèse du ligand spermatique/récepteur ovocytaire (hypothèse du contact) et l'hypothèse du facteur spermatique SF. D'après (Nomikos et al., 2012).

De nombreuses protéines candidates ont été testées dans le but d'identifier la nature de ce facteur d'après leur capacité à générer des vagues calciques dans le cytoplasme de l'ovocyte, similaires à celles observées au moment de la fécondation normale. Afin de comprendre comment le spermatozoïde active l'ovocyte, il était indispensable de comprendre le mécanisme moléculaire de la libération du calcium par le RE et aboutissant à l'élévation de sa concentration dans le cytoplasme de l'ovocyte. Deux canaux calciques du RE sont susceptibles d'être activés au moment de la fécondation. Ceux qui sont sensibles à la ryanodine, stimulés par le  $Ca^{2+}$  et l'ADP ribose cyclique et ceux qui sont sensibles à l'IP<sub>3</sub> et appelé IP<sub>3</sub>-R1 (Nomikos et al., 2012; Swann et al., 2006). Selon les espèces, l'un ou les deux récepteurs peuvent être impliqués dans la génération de ce signal calcique. Cependant chez les mammifères et particulièrement chez la souris, l'utilisation des bloqueurs des canaux sensibles à la ryanodine n'a pas affecté l'activation ovocytaire. Par contre, l'utilisation des bloqueurs des canaux sensibles à l'IP<sub>3</sub> ou la réduction de leur expression par injection de petits ARN interférents (siARN), abolissent complètement le signal calcique (S. Miyazaki et

al., 1992). En outre, de nombreuses études ont démontré que l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  au moment de la fécondation est due à une production accrue d'IP3 (S. Miyazaki et al., 1992; H. Wu et al., 2001).

## **2. Facteur spermatique : une PLC spécifique des spermatozoïdes, PLC zêta**

L'hypothèse la plus simple qui permet d'expliquer l'origine de ces oscillations calciques, était que la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte permet la diffusion d'un facteur spermatique activateur désigné par « SOAF » pour « Sperm Oocyte Activating Factor » (Swann, 1994) dans l'ooplasm. En effet, l'injection des extraits de protéines spermatiques solubles ou l'injection du spermatozoïde entier dans l'ovocyte (ICSI) provoque une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  similaire au signal calcique observé au moment de la fécondation normale (Tesarik, Sousa, & Testart, 1994). Ceci suggère donc que le spermatozoïde délivre au moment de la fusion des deux gamètes un facteur spermatique spécifique dont la nature était encore inconnue.

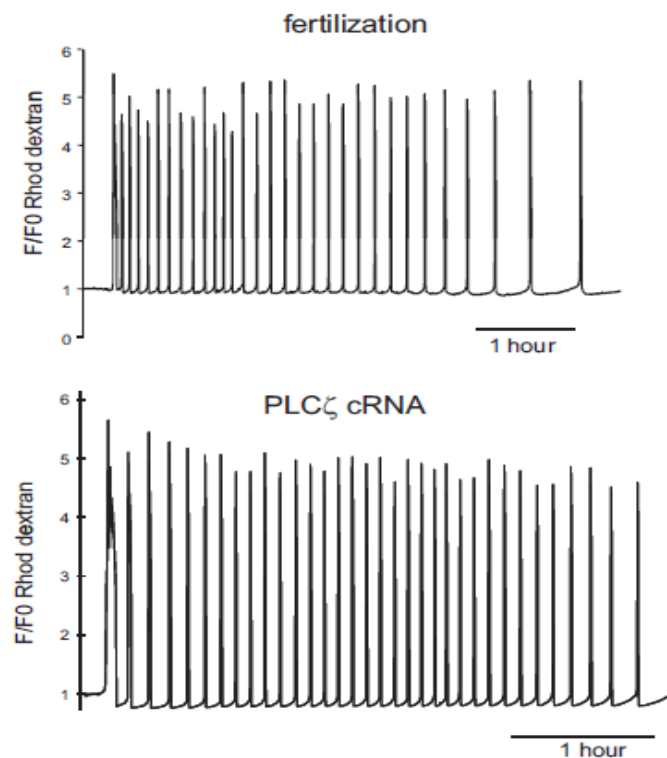
Une explication possible de la production élevée d'IP3 suite à la fusion gamétique était que le spermatozoïde contient une phospholipase C (PLC), qui hydrolyse du phosphatidylinositol bisphosphate membranaire (PIP2) pour générer l'inositol trisphosphate (IP3) comme second messager. Ce dernier va activer à son tour les récepteurs à l'IP3 ou IP3R1, présents à la surface du RE et libérer par la suite du calcium dans l'ooplasm (Malcuit, Kurokawa, & Fissore, 2006) (Ramadan, Kashir, Jones, & Coward, 2012).

Par conséquent, plusieurs isoformes de PLC, exprimées au niveau du spermatozoïde chez les mammifères ont été des candidats potentiels pour le facteur spermatique activateur. Toutefois, l'injection des protéines recombinantes, représentant la majorité de ces isoformes, n'a pas réussi à initier les oscillations calciques. Pour certaines, des oscillations ont été observées mais à des concentrations non physiologiques (Parrington et al., 2002).

Un nouveau type de PLC a été isolé pour la première fois après examen de courtes séquences d'ADNc EST, dérivées des testicules de souris. L'analyse de ces séquences a permis de mettre en évidence la présence d'un ADNc codant pour une protéine à expression exclusivement testiculaire appartenant à la famille des PLC et qui a été nommée PLC zêta (PLC  $\zeta$ ) (Saunders et al., 2002). Des séquences homologues ont été également clonées chez l'homme et chez les primates (Cox et al., 2002) ainsi que chez d'autres espèces telles que le bovin et le porc (Yoneda et al., 2006). Le défi le plus important après la découverte de cette PLC, était de tester s'il s'agissait du facteur spermatique d'après sa capacité à générer des



oscillations calciques suffisantes pour activer l'ovocyte, une fois injectée dans le cytoplasme de ce dernier. Pour ce faire Saunders et al. (2002) ont injecté l'ARN codant pour la protéine PLC  $\zeta$  murine dans le cytoplasme d'ovocytes de souris et ont trouvé que cette injection a conduit à l'apparition d'une série prolongée de vagues calciques, similaires du point de vue fréquence et amplitude à celles observées au moment de la fécondation normale (**Figure 44**). L'inhibition de la synthèse de la PLC  $\zeta$  par l'addition du cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, au milieu de culture des ovocytes, a aboli l'apparition de ces vagues (Saunders et al., 2002).



**Figure 44 :** Représentation des oscillations calciques générées au sein de l'ovocyte de souris au moment de la fécondation normale ou suite à l'injection de l'ARNc de la PLC  $\zeta$ . L'axe des ordonnées est exprimé en unité arbitraire, il représente une mesure de la  $[Ca^{2+}]_i$  en utilisant le Rhod dextran. D'après (Nomikos et al., 2012)

L'injection de l'ARNm de la PLC  $\zeta$  ou bien de la protéine recombinante provoque, non seulement une augmentation du taux du calcium intracellulaire suivie par une activation ovocytaire mais aboutit également au développement embryonnaire jusqu'au stade blastocyste (Fujimoto et al., 2004; Saunders et al., 2002) (Kouchi et al., 2004). Cette capacité de la PLC  $\zeta$  à induire une activation ovocytaire et un développement embryonnaire n'est pas cependant spécifique de l'espèce (Ramadan et al., 2012). En effet, l'injection de l'ARN de la PLC  $\zeta$  de l'homme ou du singe dans le cytoplasme de l'ovocyte de souris est capable d'activer ces

derniers d'une manière similaire à celle observée au moment de la fécondation. De même, l'injection de l'ARN de la PLC  $\zeta$  de l'homme dans les ovocytes de porc était également capable d'induire ce signal calcique activateur (Cox et al., 2002; Swann, Larman, Saunders, & Lai, 2004). Ces résultats ont permis de proposer qu'un nouveau type de PLC appelée PLC  $\zeta$  correspondait au facteur spermatique activateur de l'activation ovocytaire.

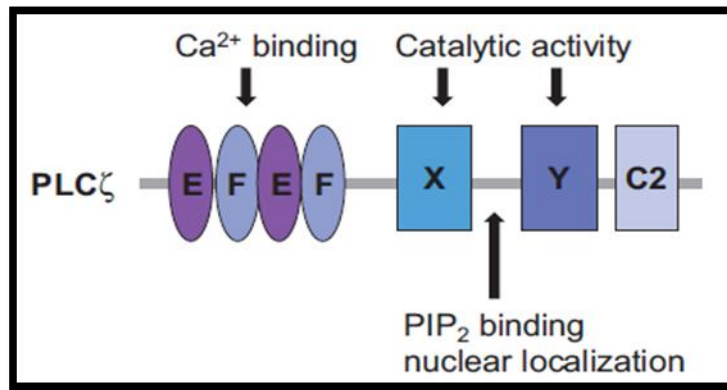
L'inhibition de l'expression de la PLC  $\zeta$ , suite à l'utilisation de petits ARN interférents (siARN), aboutit à la production des spermatozoïdes ayant une expression fortement réduite de la PLC  $\zeta$  et qui possèdent un pouvoir activateur altéré représenté par un signal calcique qui ne dure pas longtemps, insuffisant pour activer l'ovocyte (Knott, Kurokawa, Fissore, Schultz, & Williams, 2005).

Le gène qui code pour la protéine PLC  $\zeta$  est présent chez au moins 8 espèces différentes de mammifères : humain, porc, macaque, lapin, hamster, souris, cheval et bovin. De même, la PLC  $\zeta$  a été identifiée récemment chez deux espèces n'appartenant pas aux mammifères qui sont le poulet et un poisson (Kashir et al., 2014; Swann et al., 2006). Il s'agit d'une protéine à expression exclusivement testiculaire et post-méiotique, qui s'exprime à partir des spermatides rondes chez l'homme et spermatides en élongation chez la souris et persiste jusqu'au spermatozoïde épидидymaire (C. Young, Grasa, Coward, Davis, & Parrington, 2009).

### ***2.1 Structure/fonction de la PLC $\zeta$***

La PLC  $\zeta$  est une enzyme appartenant à la famille des PLC. Elle constitue une nouvelle classe de phospholipase, spécifique au spermatozoïde (Ramadan et al., 2012).

La PLC  $\zeta$  possède le prototype minimum des PLC somatiques, représenté par les domaines structuraux suivants: deux domaines EF hand du côté N-terminal, un domaine catalytique XY et un domaine C2 du côté C-terminal (**Figure 45**).



**Figure 45** : Les domaines structuraux de la PLC  $\zeta$ . La PLC  $\zeta$  est formée de deux domaines EF, un domaine catalytique réparti en deux régions X et Y, séparées par une région appelée XY linker, qui joue un rôle important dans la liaison de la PLC  $\zeta$  à son substrat PIP<sub>2</sub> et qui contient également le signal de localisation nucléaire et finalement un domaine C2 au niveau de son extrémité C-terminal. D'après (Swann & Lai, 2013)

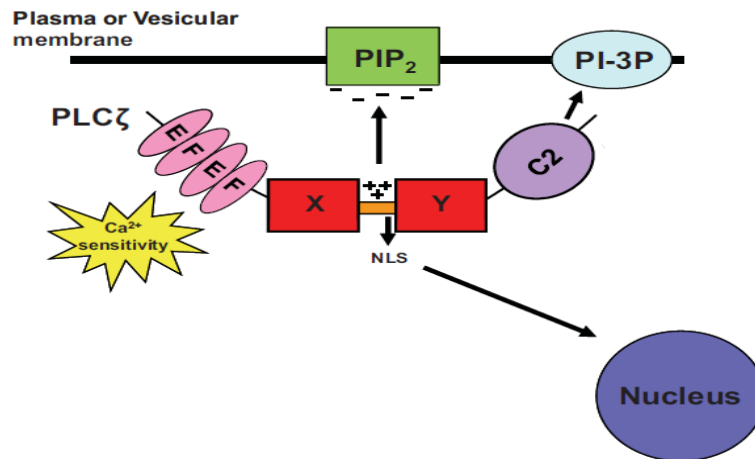
- **Un domaine EF-hand (Elongation-Factor hand domain)**, liant le calcium, indispensable à l'activation de la PLC  $\zeta$ , une fois libérée dans le cytoplasme de l'ovocyte. Ce domaine contient des résidus capables de lier les ions calciques d'une manière spécifique. La PLC  $\zeta$  est formée de deux paires de domaines EF-Hand organisés en tandem, sous quatre motifs hélice-boucle-hélice, et situé du côté N-terminal de la protéine. La délétion de l'un de ces motifs ou bien la mutation de la région responsable de la liaison au calcium aboutit à la perte totale de la sensibilité de la PLC  $\zeta$  aux ions Ca<sup>2+</sup> et la perte de sa capacité à induire des oscillations calciques une fois injectée dans l'ooplasmme chez la souris (Kouchi et al., 2005). Ce domaine joue donc un rôle important dans la régulation de l'activité catalytique de la PLC  $\zeta$  stimulée par le calcium (Nomikos, Kashir, Swann, & Lai, 2013). Il est responsable de la sensibilité élevée de la PLC  $\zeta$  aux ions calciques par rapport aux autres isoformes de PLC. En effet, la PLC  $\zeta$  est 100 fois plus sensible au calcium que la PLC $\delta$ 1 (Nomikos et al., 2005). Grâce à cette sensibilité élevée, la PLC  $\zeta$  a la particularité d'induire des oscillations calciques dans le cytoplasme de l'ovocyte, à partir d'une faible concentration des ions Ca<sup>2+</sup> qui correspond à la concentration basale de 0.1  $\mu$ M (Saunders et al., 2002; Theodoridou et al., 2013).

- **Un domaine catalytique** renfermant le site actif de cette enzyme, repartie en deux parties X et Y, séparées par une région appelée « **X-Y linker region** » et dont la longueur est extrêmement variable d'une espèce à une autre. Cette région renferme également un cluster d'acides aminés chargés positivement, spécifique à la PLC  $\zeta$ , qui n'est pas présent au niveau des autres isoformes de PLC (Nomikos et al., 2007). Ce cluster contribue à l'ancrage de la PLC  $\zeta$  à la membrane cellulaire et ainsi au rapprochement de son domaine catalytique avec son substrat PIP<sub>2</sub> chargé négativement, par interaction électrostatique (Nomikos, Elgmami,

Theodoridou, Calver, Nounesis, et al., 2011) (**Figure 46**). Il faut noter que dans les autres isoformes somatiques de PLC, le linker a un rôle opposé et régule négativement l'activité catalytique de la PLC par répulsion électrostatique entre les acides aminés chargés négativement de ce domaine et le substrat PIP2 portant également une charge négative (Hicks et al., 2008). La délétion de la région liant les deux domaines X et Y, ou « XY linker region », aboutit à une perte totale de la capacité de la PLC  $\zeta$  à induire des oscillations calciques *in vivo* et une réduction de son activité d'hydrolyse du PIP2 *in vitro* (Theodoridou et al., 2013).

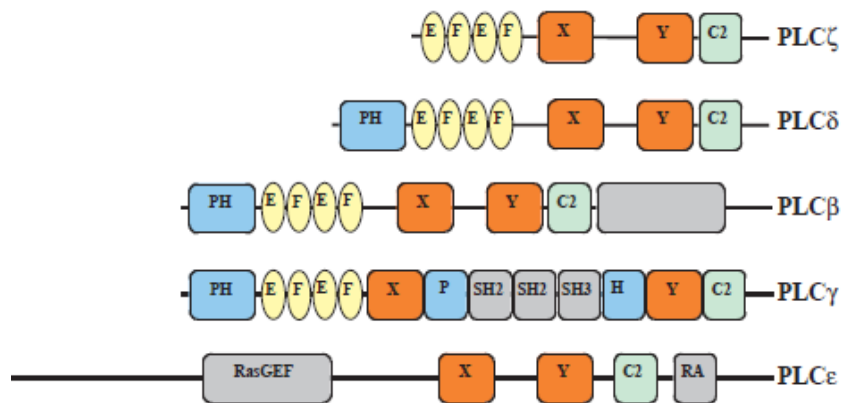
Cette région renferme également **un signal de localisation nucléaire** (NLS pour Nuclear Localisation Signal), permettant à la PLC  $\zeta$  de subir une translocation entre le noyau et le cytoplasme dans les embryons préimplantatoires (Sone et al., 2005). Les acides aminés constitutifs du site actif sont très conservés et possèdent 60% de similarité avec le domaine catalytique des autres PLC somatiques. Toute mutation affectant l'un de ces acides aminés rend la PLC  $\zeta$  non fonctionnelle incapable d'hydrolyser le PIP2 pour produire l'IP3 et par la suite incapable de générer les oscillations calciques dans le cytoplasme de l'ovocyte (Swann & Lai, 2013; Theodoridou et al., 2013).

- **Un domaine C2** d'environ 120 aa est situé du côté C-terminal de PLC  $\zeta$ , comme pour de nombreuses protéines interagissant d'une manière réversible avec les lipides membranaires (Nalefski & Falke, 1996). Cette liaison est généralement dépendante du calcium mais peut se faire également en son absence (Nomikos et al., 2013). Le domaine C2 joue un rôle primordial dans la régulation du mécanisme d'action de la PLC  $\zeta$ . Sa délétion abolit complètement la capacité de la PLC  $\zeta$  tronquée, à induire des oscillations calciques, une fois injectée dans le cytoplasme d'un ovocyte MII mature, sachant que son activité catalytique (hydrolyse du PIP2 *in vitro*) et sa sensibilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  ne sont pas affectées par la délétion (Nomikos et al., 2005). Le domaine C2 joue donc un rôle crucial dans la liaison de la PLC  $\zeta$  avec son substrat, le PIP2 membranaire. Des études ont montré que le domaine C2 de la PLC  $\zeta$  peut se lier également mais à faible affinité au PI-3P et au PI-5P (Nomikos et al., 2012) (**Figure 46**).



**Figure 46 :** Les différents domaines structuraux de la PLC  $\zeta$  et leur rôle dans la régulation de son activité catalytique. Grâce à ses domaines EF, la PLC  $\zeta$  possède une sensibilité très élevée aux ions  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui lui permet de s'activer à de très faibles concentrations de calcium intracellulaire. Une fois activée, elle se lie d'une manière spécifique à son substrat PIP<sub>2</sub>, présent au niveau de la membrane des vésicules intracellulaires. La liaison de la PLC  $\zeta$  à son substrat PIP<sub>2</sub>, se fait par des interactions électrostatiques entre le cluster d'acides aminés chargés positivement de la région liant les deux domaines catalytiques X et Y et le PIP<sub>2</sub> chargé négativement. Des données suggèrent que le domaine C2, contribue également à l'association de la PLC  $\zeta$  au PIP<sub>2</sub>. Le domaine C2, en se liant au PI-3P situé juste à côté du PIP<sub>2</sub>, rapproche le domaine catalytique de la PLC  $\zeta$  à son substrat PIP<sub>2</sub>. D'après (Nomikos et al., 2012)

L'une des principales différences entre la PLC  $\zeta$  et les autres isoformes de PLC somatiques, est l'absence du domaine PH (pleckstrin homology domain) au niveau de son extrémité N-terminal (**Figure 47**) (Nomikos et al., 2005). Le domaine PH est un domaine de 120 aa, présent chez la majorité des PLC, ainsi que chez d'autres protéines cytosoliques, dont le rôle est de permettre le recrutement de ces protéines à la bicouche lipidique et de favoriser leur liaison aux phospholipides (Theodoridou et al., 2013). L'absence de ce domaine au niveau de la PLC  $\zeta$  signifie que le mécanisme de son recrutement à la bicouche lipidique, qui est indispensable à son activité catalytique, est différent des autres PLC et requiert peut être une coopération entre des régions de plusieurs domaines (Nomikos et al., 2013). De ce fait, la PLC  $\zeta$  constitue la plus petite isoforme, parmi les autres PLC, ayant un poids moléculaire qui varie selon les espèces, entre 70 KDa (608 aa) chez l'homme et 74 KDa (647 aa) chez la souris (Kashir et al., 2014; Ramadan et al., 2012).



**Figure 47** : Les domaines structuraux des différentes PLC ( $\zeta$ ,  $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ) chez la souris et chez les mammifères. La PLC  $\zeta$  constitue la plus petite isoforme et ne possède pas un domaine PH. D'après (Saunders et al., 2002)

La PLC  $\zeta$  est plus proche du point de vue structure et séquence primaire de la PLC  $\delta$  et particulièrement de l'isoforme PLC  $\delta 1$ , à l'exception de la présence du domaine PH au niveau de son extrémité N-terminal (Saunders et al., 2002) (**Figure 47**). Le domaine catalytique de la PLC  $\zeta$  possède 64% de similarité (homologie) avec celui de PLC  $\delta 1$ . Cinq acides aminés qui constituent les sites actifs du domaine catalytique PLC  $\delta 1$  (His<sup>311</sup>, Glu<sup>341</sup>, ASP<sup>343</sup>, His<sup>356</sup>, Glu<sup>390</sup>), sont hautement conservés au niveau du domaine catalytique de PLC  $\zeta$  (Suh et al., 2008).

## 2.2 Localisation cellulaire de la PLC $\zeta$ au niveau du spermatozoïde épидидymaire

De nombreuses études ont été menées chez plusieurs espèces de mammifères tel que le hamster, la souris, le porc, et l'homme, afin de mettre en évidence la présence de la PLC  $\zeta$  *in vivo* et de déterminer sa localisation cellulaire.

La PLC  $\zeta$  est située dans la région post-acrosomale de la tête du spermatozoïde chez la souris au niveau de la thèque périnucléaire (Fujimoto et al., 2004), alors que chez l'homme, elle se situe au niveau de la région équatoriale décrivant un anneau entourant le noyau spermatique (C. Young et al., 2009). Ces régions constituent les premières régions du spermatozoïde, qui entrent en contact direct avec le cytoplasme de l'ovocyte après la fusion gamétique.

Cependant chez le cheval, la PLC  $\zeta$  est localisée non seulement au niveau de la région équatoriale mais elle se trouve également au niveau de la pièce intermédiaire du flagelle, ce qui explique les oscillations calciques générées dans le cytoplasme de l'ovocyte de cheval, suite à l'injection des extraits de protéines solubles issues du flagelle (Bedford-Guaus et al., 2011). Dans le spermatozoïde, la PLC  $\zeta$  est maintenue sous forme inactive jusqu'au moment

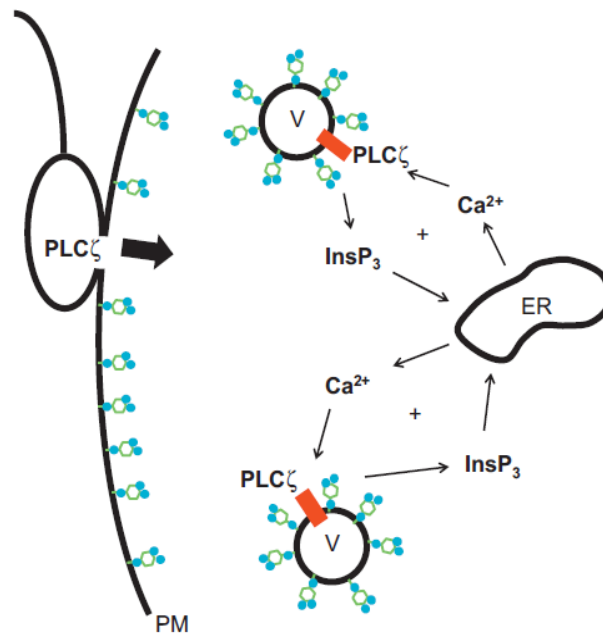
où elle sera libérée dans le cytoplasme de l'ovocyte, où elle atteint son activité optimale (Swann et al., 2004)

### **2.3 Mécanisme d'action de la PLC $\zeta$**

Lors de la fécondation, le spermatozoïde ayant subi la réaction acrosomique arrive au contact de la membrane plasmique de l'ovocyte. A ce moment, il y aura une fusion cellulaire entre la membrane plasmique du spermatozoïde avec celle de l'ovocyte. Suite à cette fusion gamétique, les protéines de la thèque périnucléaire comme la PLC  $\zeta$  seront au contact du cytoplasme de l'ovocyte. Une fois délivrée dans l'ovocyte, la PLC  $\zeta$  est activée par un mécanisme encore inconnu, mais qui dépend de sa sensibilité élevée au  $\text{Ca}^{2+}$ , présent à une concentration basale de  $0.1\mu\text{M}$  dans le cytoplasme de l'ovocyte MII.

Elle va ensuite cliver le PIP2 membranaire en 1,2 diacylglycérol DAG et inositol 1, 4,5 trisphosphate IP3. La présence du PIP2, au niveau de la membrane plasmique des ovocytes MII non fécondés chez la souris, a été mise en évidence, en utilisant le domaine PH de la PLC  $\delta 1$  fusionné à la GFP (Halet, Tunwell, Balla, Swann, & Carroll, 2002).

Cependant, par opposition au mode d'action conventionnel des autres PLC, où le PIP2 cible est localisé vers la face cytosolique de la bicouche lipidique de la membrane plasmique, la PLC  $\zeta$  possède un mode d'action unique, puisqu'elle cible le PIP2 intracellulaire situé au niveau des vésicules cytoplasmiques de l'ovocyte, dont la nature n'est pas encore connue (Y. Yu et al., 2012) (**Figure 48**).



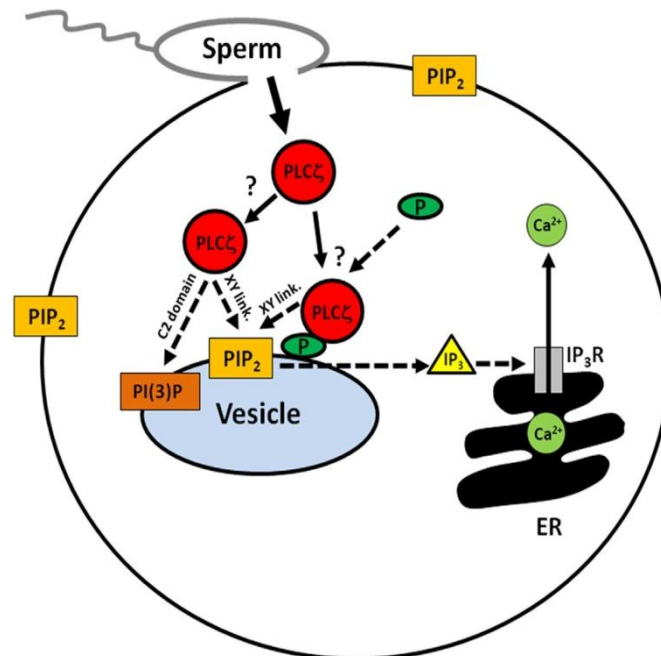
**Figure 48 :** Représentation des différentes localisations intracellulaires du PIP2 dans les ovocytes MII de mammifères. Après la fusion membranaire des deux gamètes, la PLC  $\zeta$  présente au niveau du spermatozoïde (grande flèche noire) diffuse dans le cytoplasme de l'ovocyte où elle se lie à des petites vésicules intracellulaires (V) contenant du PIP2 (représenté par des icônes vert et bleu) et distribués à travers le cytoplasme. D'après (Swann & Lai, 2013)

La question reste donc comment la PLC  $\zeta$  est recrutée vers le PIP2 présent au niveau de la membrane de ces vésicules cytoplasmiques. Plusieurs hypothèses ont été donc proposées. Une des hypothèses sur le mode d'action de la PLC  $\zeta$ , suggère que l'association de la PLC  $\zeta$  et son substrat PIP2, est due à la liaison du domaine C2, situé au niveau de son extrémité C-ter, au PI-3P membranaire, situé au même niveau que le PIP2 au niveau de la membrane des vésicules intracellulaires de l'ovocyte. L'association de la PLC  $\zeta$  avec le PIP2 membranaire peut être également due à l'interaction électrostatique entre le cluster d'acides aminés chargés positivement, situé au niveau de la région liant les domaines catalytiques X et Y, juste en amont du domaine Y et le PIP2 chargé négativement. De même, un autre mécanisme suggère que la PLC  $\zeta$  pourrait interagir avec une protéine spécifique exprimée au niveau de la membrane des vésicules intracellulaires riches en PIP2. Tout ces mécanismes, ensemble ou séparés, contribuent au rapprochement du site catalytique X et Y de la PLC  $\zeta$  et son substrat PIP2 (Nomikos, Elgmati, Theodoridou, Calver, Nounesis, et al., 2011; Nomikos et al., 2012).

La PLC  $\zeta$  clive ainsi le PIP2 et donne naissance à deux produits qui sont l'IP3 et le DAG. L'IP3 hydrosoluble diffuse rapidement dans le cytoplasme, où il va activer à son tour les récepteurs sensibles à l'IP3 (IP3R1) qui sont des canaux calciques transmembranaires exprimés à la surface du RE, le principal réservoir des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . La fixation de l'IP3 sur ces



canaux induit leur ouverture provoquant ainsi une augmentation rapide et transitoire de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  sous forme de vagues ou oscillations calciques répétitives (Heytens et al., 2009). Il s'agit donc d'une libération du calcium induite par l'IP3 ou IICR (IP3 Induced Calcium Release) (Nomikos et al., 2013) (**Figure 49**).



**Figure 49 :** Représentation schématique du mécanisme d'action de la PLC  $\zeta$  dans les ovocytes de mammifères. Après la fusion membranaire des deux gamètes, la PLC  $\zeta$  présente au niveau du spermatozoïde (grande flèche noire), diffuse dans le cytoplasme de l'ovocyte où elle se lie à des petites vésicules intracellulaires (Vesicle) contenant le PIP<sub>2</sub> et distribuées à travers le cytoplasme. La liaison de la PLC  $\zeta$  à son substrat PIP<sub>2</sub> peut se faire soit via son domaine C2, soit via le cluster d'acides aminés chargés positivement, situé au niveau de la région liant les deux domaines catalytiques X et Y, ou via une interaction entre la PLC  $\zeta$  et une protéine (P, vert), présente également au niveau de la membrane des vésicules intracellulaires mais dont la nature n'est pas encore identifiée. L'IP<sub>3</sub> généré par l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> vésiculaire, se lie ensuite à son récepteur IP<sub>3</sub>R1 exprimé à la surface du réticulum endoplasmique (RE) provoquant ainsi la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE. D'après (Nomikos et al., 2013)

Ce signal calcique entraîne l'activation de diverses protéines calcium dépendantes comme la calmoduline kinase II, elles-mêmes capables d'activer des protéines kinases qui induisent divers effets cellulaires par des cascades de phosphorylations. Les principaux évènements cellulaires qui prennent lieu suite à cette activation sont classés en évènements précoces et évènements tardifs (Ducibella et al., 2006) :

**Les évènements précoces :**

- Le blocage de la polyspermie suite à la réaction corticale.
- La reprise de la deuxième division méiotique de l'ovocyte suite à l'inactivation du facteur MFP (Maturation Promoting Factor) bloquant la méiose, permettant ainsi le rétablissement de l'haploïdie et l'expulsion du deuxième globule polaire.

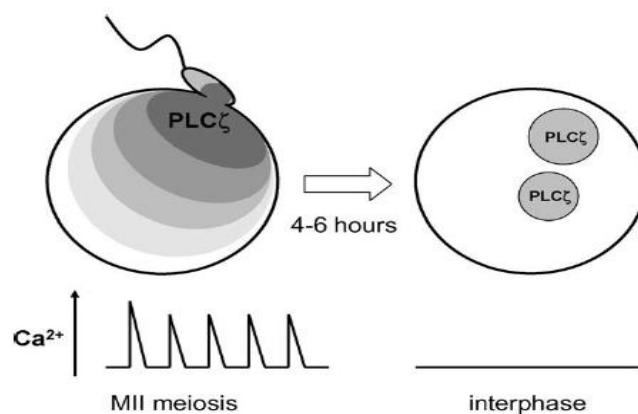
- Activation des enzymes ayant une activation calcium dépendante.

**Les événements tardifs :**

- Recrutement des ARNs maternels et synthèse des protéines.
- Remodelage de la structure de la chromatine maternelle et paternelle (reprogrammation épigénétique), décondensation des chromosomes.
- Initiation du développement embryonnaire illustré par la formation des deux pronoyaux mâle et femelle.

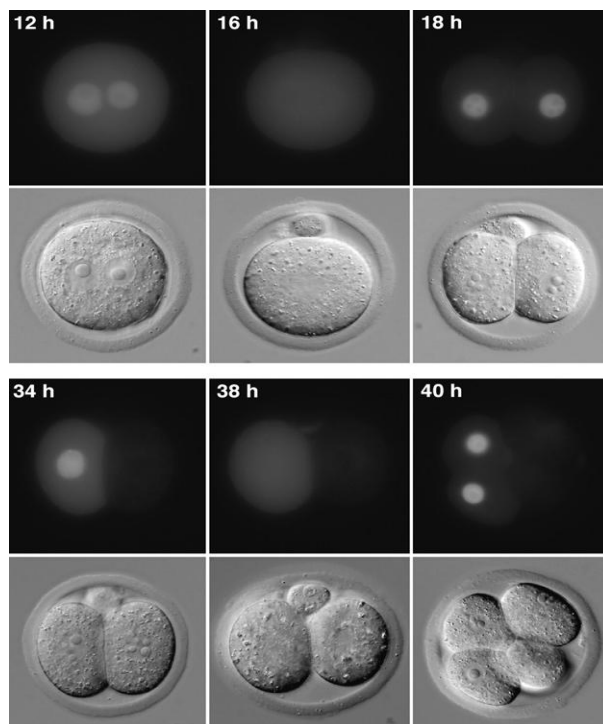
**2.4 Localisation de la PLC  $\zeta$  dans l'ovocyte et translocation nucléaire chez la souris**

Les oscillations calciques générées par la PLC  $\zeta$  suite à la fusion gamétique, durent pendant quelques heures avant de s'arrêter au moment de la formation des deux pronoyaux mâle et femelle (M. Ito, Shikano, Kuroda, & Miyazaki, 2008) (**Figure 50**).



**Figure 50 :** Schéma représentant la localisation de la PLC  $\zeta$  lors de la fécondation. Lorsque le spermatozoïde fusionne avec l'ovocyte II bloqué en métaphase de deuxième division méiotique, la PLC  $\zeta$  se libère dans le cytoplasme de ce dernier et déclenche une série d'oscillations calciques transitoires. Ces oscillations durent pendant quelques heures avant de s'arrêter au moment de la formation des deux pronoyaux. Cette cessation est due à la séquestration de la PLC  $\zeta$  dans les pronoyaux. Adaptée de (Swann et al., 2006)

Cette variation du signal calcique peut être expliquée par une translocation et une séquestration de la PLC  $\zeta$  dans les pronoyaux ainsi formés, provoquant une cessation des oscillations calciques (Larman, Saunders, Carroll, Lai, & Swann, 2004). Une augmentation du taux du calcium intracellulaire est observée de nouveau au moment de la première division mitotique du zygote, correspondant à la libération de la PLC  $\zeta$  dans le cytoplasme lorsque la membrane nucléaire se rompt lors de la première division mitotique du futur embryon (Sone et al., 2005) (**Figure 51**).



**Figure 51:** La translocation nucléo-cytoplasmique de la PLC  $\zeta$  au sein de l'ovocyte II de souris, est dépendante du cycle cellulaire. La distribution intracellulaire de la PLC  $\zeta$ -Venus injectée dans des ovocytes de souris, a été étudiée lors de la première (12 à 16h) et la deuxième division cellulaire (34 à 40h) d'après la fluorescence verte émise par la protéine Venus fusionnée à PLC  $\zeta$ . D'après (Sone et al., 2005).

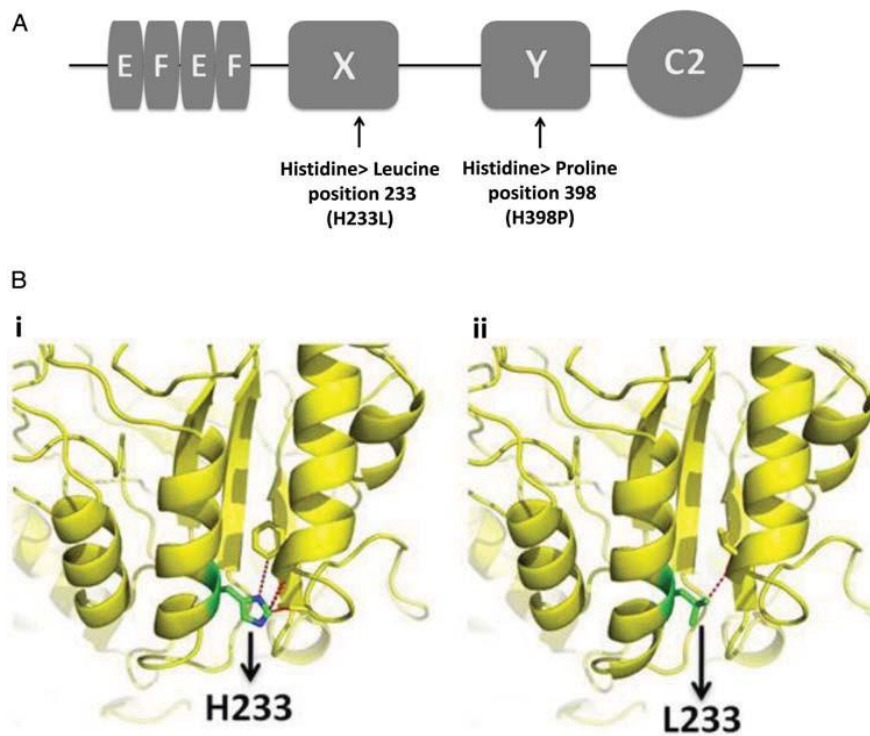
Le transport nucléo-cytoplasmique de la PLC  $\zeta$ , au sein de l'ovocyte fécondé persiste jusqu'au stade blastocyste. Ce transport est dû à la présence du signal de localisation nucléaire. La substitution des acides aminés basiques de ce signal, par des acides aminés acides ou sa délétion totale, aboutit à une abolition de la séquestration de la PLC  $\zeta$  dans le noyau chez la souris, sans affecter son activité catalytique ni sa capacité à induire des oscillations calciques dans le cytoplasme de l'ovocyte MII (Larman et al., 2004). L'altération de la séquestration nucléaire de la PLC  $\zeta$  est accompagnée d'une persistance des oscillations calciques au-delà de la formation des pronoyaux. A noter que la translocation nucléaire de la PLC  $\zeta$  a été observée uniquement chez la souris. La cause de la cessation des oscillations calciques chez d'autres espèces tels que l'homme, le bovin et le rat n'est pas encore connue puisque la PLC  $\zeta$  chez ces espèces ne subit pas de transition nucléo-cytoplasmique (M. Ito et al., 2008).

## **2.5 PLC $\zeta$ et fertilité masculine chez l'homme**

L'un des progrès majeur de l'assistance médicale à la procréation est l'ICSI pour « Intra Cytoplasmic Sperm Injection » correspondant à la micro-injection directe de la tête du spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte II (Palermo et al., 1992). Ce type de traitement a permis de pallier plusieurs infertilités masculines liées à une mobilité réduite des spermatozoïdes ou une malformation altérant leur pouvoir fécondant. Cependant, il existe dans 1-3% des cas un échec de fécondation après ICSI, dû à une absence de l'activation de l'ovocyte (Vanden Meerschaut et al., 2013).

Les analyses par immunofluorescence et par Western blot de l'expression de la PLC  $\zeta$  ont révélé que chez les patients infertiles dont les spermatozoïdes avaient échoué dans l'ICSI, il y avait une absence ou réduction très importante de l'expression de la PLC  $\zeta$  au niveau de la tête de ces spermatozoïdes. Ces données suggèrent que l'absence relative de PLC  $\zeta$  peut expliquer certains cas d'infertilité masculine. Deux études récentes ont fourni le premier lien génétique entre les défauts de l'expression de la PLC  $\zeta$  et l'infertilité masculine, en identifiant deux mutations hétérozygotes au niveau de la séquence codante pour la protéine PLC  $\zeta$  chez un patient infertile présentant un échec de fécondation après plusieurs tentatives d'ICSI, due à un défaut d'activation ovocytaire. La première mutation d'origine paternel, correspond à la substitution de l'acide aminé Histidine présent à la position 398 (H398) au niveau du domaine catalytique Y, par l'acide aminé proline (H398P) (Heytens et al., 2009; Kashir et al., 2010). Cet acide aminé muté est un résidu hautement conservé entre les différentes isoformes de la PLC  $\zeta$  chez les mammifères, confirmant l'importance de son rôle au sein de la protéine.

La seconde mutation retrouvée également chez le même patient, qui est d'origine maternel cette fois, consiste à la substitution de l'acide aminé Histidine présent à la position 233 au niveau du domaine catalytique X par l'acide aminé leucine (H233L) (Nomikos, Elgmati, Theodoridou, Calver, Cumbes, et al., 2011) (Kashir, Konstantinidis, et al., 2012). L'étude de ces mutations chez la souris et chez l'homme a révélé que les deux mutations perturbent le repliement du site actif de la PLC  $\zeta$  (**Figure 52**). Il en résulte par la suite une altération de la structure de la PLC  $\zeta$  et une réduction considérable de son activité catalytique ainsi que de sa capacité à induire une activation ovocytaire, ce qui pourrait être à l'origine de l'infertilité observée chez le patient.



**Figure 52 :** (A) Représentation de la structure de la PLC  $\zeta$  ainsi que la localisation de chacun des deux résidus histidine affectés par les mutations (H233L et H398P) au niveau des domaines catalytiques X et Y respectivement. (B) Représentation de la structure tridimensionnelle des deux formes de la PLC  $\zeta$  WT (H233) et mutée (L233). Cette mutation affecte l'interaction du résidu Phénylalanine en position 268 (Phe 268) avec le résidu Leucine en position 233 (L233) qui à son tour interagit avec le résidu Thréonine en position 267 (Thr 267) D'après (Kashir, Konstantinidis, et al., 2012)

## 2.6 PLC $\zeta$ et infertilité masculine : la globozoospermie

Dans le cas de la globozoospermie, l'ICSI est le traitement le plus utilisé pour surmonter l'absence de l'acrosome. Ce traitement est justifié étant donné que les spermatozoïdes des patients globozoospermiques ne présentent pas d'anomalie chromosomique ou aneuploïdie (Rybouchkin et al., 1997) (Kuentz et al., 2013).

De nombreuses tentatives de fécondation *in vitro* par ICSI, ont été décrites chez les patients globozoospermiques. Malheureusement, le taux de réussite était très bas, dû au faible pouvoir fécondant des spermatozoïdes de ces patients (Rybouchkin et al., 1997) (Kilani et al., 2004). Ce défaut de fécondance est lié à l'absence secondaire de PLC  $\zeta$  ou à une réduction significative de son expression au niveau des spermatozoïdes globozoocéphales (Heindryckx et al., 2005) (Heytens et al., 2009; Kashir, Konstantinidis, et al., 2012). Cependant les mécanismes moléculaires aboutissant à la perte de la PLC  $\zeta$  dans les spermatozoïdes globozoocéphales ne sont pas encore décrit. Une meilleure compréhension de la physiopathogénie moléculaire de cette maladie permettrait une meilleure prise en charge en AMP des couples atteints, augmentant ainsi leurs chances de concevoir.



## Problématique de ma thèse

L'infertilité est une pathologie courante et 1 couple sur 7 aura besoin d'une aide médicale pour procréer. Parmi ces couples, 1 sur 2 sortira de ce parcours éprouvant sans enfant, avec des conséquences importantes en termes de bien être pour les couples impliqués. Deux raisons majeures expliquent ces échecs : 1/ notre mauvaise compréhension des pathogénies moléculaires de très nombreuses infertilités et 2/ Ces techniques ne sont que palliatives, et ne restaurent pas les fonctions déficientes des gamètes ou de l'appareil reproducteur des patients.

L'équipe GETI « Génétique, Epigénétique et Thérapies de l'Infertilité » s'est focalisée sur la recherche des causes génétiques d'une tératozoospermie particulière qu'est la globozoospermie de type I. L'absence de l'acrosome est le défaut majeur associé à cette pathologie. Les spermatozoïdes globocéphales ayant perdu leur acrosome ne peuvent plus traverser les enveloppes protectrices de l'ovocyte et perdent ainsi leur pouvoir fécondant. Pour surmonter le défaut de fécondance, les spermatozoïdes globocéphales sont injectés directement dans le cytoplasme de l'ovocyte par une technique nommée ICSI pour Intra Cytoplasmic Sperm Injection. Toutefois, malgré les nombreux efforts pour féconder l'ovocyte le taux de réussite de la fécondation par ICSI reste très bas dans le cadre de la globozoospermie. Afin de mieux comprendre la pathogénie moléculaire de cette infertilité et parce que des cas familiaux ont été décrits dans cette pathologie, plusieurs équipes ont recherché une cause génétique. En 2007, il a été montré qu'une mutation dans le gène *SPATA16* pouvait entraîner une forme familiale de la globozoospermie humaine (Dam *et al.*, 2007b). Cependant et malgré des recherches actives, ce gène n'a pas été retrouvé muté chez les autres patients atteints de globozoospermie jusqu'à présent. Récemment l'équipe a montré qu'un autre gène était impliqué dans cette pathologie, le gène *DPY19L2* (Harbuz *et al.* 2011) et que ce gène était délété à l'état homozygote chez 70% des patients testés. La fonction de la protéine correspondante n'était pas connue au moment de la découverte du gène *DPY19L2* et ne permettait pas une compréhension facile des défauts observés par les cliniciens. Il est alors apparu important de posséder un modèle animal de cette pathologie, afin d'améliorer la compréhension de cette pathologie. Pour cette raison l'équipe a produit un modèle de souris invalidées pour le gène *Dpy19l2*. Cette souris est particulièrement intéressante car le phénotype de cette souris est en tout point identique à celui des patients atteints de globozoospermie, avec 100% de spermatozoïdes avec une tête ronde dépourvue d'acrosome et représente donc un modèle pertinent et unique d'étude de la globozoospermie de type I

humaine. L'objet de mon travail de thèse a consisté, en utilisant le modèle de souris KO, de préciser la fonction de la protéine Dpy19l2 et à comprendre la pathogénie moléculaire de la globozoospermie dépendante du gène Dpy19l2.

## **Objectifs de ma thèse**

Mes objectifs étaient donc d'apporter de nouveaux éléments permettant la compréhension du mécanisme moléculaire de la globozoospermie de type I, dépendante du gène *DPY19L2* et ainsi de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la fonction de la protéine DPY19L2 ? Afin de mieux appréhender cette question deux types de recherches ont été entrepris
- Quelle est la localisation subcellulaire de la protéine ?
- Quels sont les partenaires fonctionnels de Dpy19l2 ? L'identification de tel (s) partenaire (s), apporte non seulement des informations sur la biogenèse de l'acrosome et son attachement au noyau, qui sont à ce jour encore très peu connus, mais permet également de caractériser de nouveaux acteurs dans la spermatogenèse, dont l'altération pourrait être de nouvelles causes de la globozoospermie.
- A quoi est dû le faible taux de réussite de la fécondation par ICSI ? Plusieurs hypothèses ont été explorées :
  - Est-ce que l'échec du développement embryonnaire dans le cadre de la globozoospermie dépendante du gène *Dpy19l2* est dû à un défaut d'activation ovocytaire ? Cette hypothèse est basée sur des études qui ont été réalisées en absence de caractérisation génétique, et qui montrent une absence de la PLC  $\zeta$ , le facteur spermatique responsable de l'activation ovocytaire, au niveau des spermatozoïdes des patients globozoospermiques.
  - Est-ce que l'échec du développement embryonnaire dans le cadre de la globozoospermie dépendante du gène *Dpy19l2* est dû à un défaut de compaction du génome spermatique des spermatozoïdes globozoocéphales ? Si oui, à quel moment de la spermiogenèse survient t-il et quel est son impact sur le pouvoir fécondant des spermatozoïdes et l'intégrité de l'information génétique et épigénétique transmise par le génome paternel ?

La caractérisation des événements moléculaires aboutissant à l'absence d'acrosome dans le spermatozoïde mature, ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires entraînant l'incapacité des spermatozoïdes globozoocéphales à assurer un bon développement



embryonnaire, devrait permettre la proposition de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer le traitement de ces patients par les cliniciens.



# **Partie 2:**

# **RESULTATS**



**Article 1:** «Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus».

*Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Guillaume Martinez<sup>1, 2,3</sup>, Charles Coutton<sup>1,2,4</sup>, Julie Delaroche<sup>1,5</sup>, **Sandra Yassine<sup>1,2</sup>**, Caroline Novella<sup>1,2</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1,5</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>1,2,3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,6,\*</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*,#</sup>*

**Résumé :**

La globozoospermie de type I est une infertilité masculine rare, caractérisée par la présence exclusive des spermatozoïdes, présentant une tête ronde et dépourvue d'acrosome. Une étude génétique des patients globozoocéphales réalisée au laboratoire, a permis d'identifier le gène *DPY19L2*, comme le gène le plus fréquemment impliqué dans cette maladie. La fonction de cette protéine était inconnue au moment de la découverte du gène et le but de cette étude était de mieux caractériser la localisation subcellulaire ainsi que la fonction de Dpy19l2 chez la souris afin de comprendre pourquoi son absence est responsable de la survenue d'un tel phénotype sévère. En étudiant le profil d'expression de Dpy19l2 au cours de la spermatogenèse, nous montrons qu'il s'agit d'une protéine à expression quasi-exclusivement testiculaire et post-méiotique, principalement exprimée au stade spermatide ronde. En analysant sa localisation cellulaire par immunofluorescence et par microscopie électronique, nous montrons que Dpy19l2 occupe une localisation très précise, au niveau de la membrane nucléaire interne en regard de l'acrosome. Nous montrons également que l'absence de Dpy19l2 aboutit à la déstabilisation de lamina nucléaire dense (NDL), qui elle-même entraîne une altération de la jonction entre l'acroplaxome et l'enveloppe nucléaire. Par conséquent, l'acrosome en développement, faiblement lié au noyau, finit par se détacher. A son tour, l'anneau marginal de la manchette ne parvient plus à se positionner en dessous de l'anneau périnucléaire de l'acroplaxome, conduisant ainsi à un échec de la mise en forme du noyau spermatique. Finalement, Nous montrons pour la première fois, que les protéines Dpy19l3 sont également situées dans l'enveloppe nucléaire interne, ce qui implique que la famille des protéines Dpy19l est une nouvelle famille de protéines transmembranaires de l'enveloppe nucléaire.



# Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus

Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Guillaume Martinez<sup>1,2,3</sup>, Charles Coutton<sup>1,2,4</sup>, Julie Delaroche<sup>1,5</sup>, Sandra Yassine<sup>1,2</sup>, Caroline Novella<sup>1,2</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1,5</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>1,2,3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,6,\*</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*‡</sup>

## SUMMARY

Sperm-head elongation and acrosome formation, which take place during the last stages of spermatogenesis, are essential to produce competent spermatozoa that are able to cross the oocyte zona pellucida and to achieve fertilization. During acrosome biogenesis, acrosome attachment and spreading over the nucleus are still poorly understood and to date no proteins have been described to link the acrosome to the nucleus. We recently demonstrated that a deletion of *DPY19L2*, a gene coding for an uncharacterized protein, was responsible for a majority of cases of type I globozoospermia, a rare cause of male infertility that is characterized by the exclusive production of round-headed acrosomeless spermatozoa. Here, using *Dpy19l2* knockout mice, we describe the cellular function of the Dpy19l2 protein. We demonstrate that the protein is expressed predominantly in spermatids with a very specific localization restricted to the inner nuclear membrane facing the acrosomal vesicle. We show that the absence of Dpy19l2 leads to the destabilization of both the nuclear dense lamina (NDL) and the junction between the acroplaxome and the nuclear envelope. Consequently, the acrosome and the manchette fail to be linked to the nucleus leading to the disruption of vesicular trafficking, failure of sperm nuclear shaping and eventually to the elimination of the unbound acrosomal vesicle. Finally, we show for the first time that Dpy19l3 proteins are also located in the inner nuclear envelope, therefore implying that the Dpy19 proteins constitute a new family of structural transmembrane proteins of the nuclear envelope.

**KEY WORDS:** Dpy19l2, Acrosome biogenesis, Globozoospermia, Nuclear envelope, Nuclear lamina, Spermiogenesis, Mouse

## INTRODUCTION

Spermatozoon is doubtless one of the most specialized cells in mammals and the description and understanding of the molecular aspects of spermiogenesis represents a very challenging task. The acrosome, a giant vesicle of secretion tightly bound to the nucleus via the acroplaxome (a network of proteins including keratin 5 and  $\beta$ -actin) (Kierszenbaum et al., 2003), is a highly specialized organelle found only in sperm. The molecular basis of acrosome biogenesis, and particularly its attachment and spreading over the nucleus, are poorly understood at molecular level; to date, there has been no report of any protein of the nuclear envelope (NE) anchoring the acroplaxome to the nuclear dense lamina (NDL) (Kierszenbaum et al., 2011). Knockout animal models presenting with spermiogenesis defects are interesting tools with which to characterize new actors of spermatid differentiation. Among teratozoospermia, globozoospermia is characterized by the production of round-headed acrosomeless spermatozoa and mouse strains presenting with such a defect represent very valuable models to decipher acrosome biogenesis. Globozoospermia was first described in human (Schirren

et al., 1971), and familial cases rapidly pointed to a genetic pathogenesis. In recent years *SPATA16* (Dam et al., 2007b) and *DPY19L2* were described to be involved in globozoospermia (Harbuz et al., 2011; Kosciński et al., 2011). *SPATA16* located in the Golgi apparatus is likely to be involved in vesicular trafficking necessary for acrosome biogenesis but its precise function remains uncharacterized (Lu et al., 2006; Xu et al., 2003). *DPY19L2* is a testis-specific member of an uncharacterized gene family, including four genes in mammals: *DPY19L1* to *L4* (Carson et al., 2006). The inactivation of *DPY19*, the ortholog of *DPY19L2* in *C. elegans*, was showed to block neuroblasts migration during the worm organogenesis (Honigberg and Kenyon, 2000). Its cellular localization and its physiological role have, however, remained elusive so far. We therefore decided to study *Dpy19l2* knockout mice (*Dpy19l2*<sup>-/-</sup>) to unravel the function of Dpy19l2. In mice, a total of eight genes has been described to trigger globozoospermia. The first group of four proteins – Pick1 (Xiao et al., 2009), Gopc (Yao et al., 2002), Vps54 (Paiardi et al., 2011) and Hrb (Kang-Decker et al., 2001), as *SPATA16* – controls Golgi vesicles fusion necessary for acrosome formation. The second set of globozoospermia-inducing proteins comprises Zpbp1 (Lin et al., 2007), Ck2 $\alpha'$  (Xu et al., 1999), Hsp90b1 (Audouard and Christians, 2011) and Gba2 (Yildiz et al., 2006), which have more diverse cellular localizations and functions: Zpbp1 and Ck2 $\alpha'$  are proteins of the acrosomal matrix, whereas Hsp90b1 is expressed in the reticulum and Gba2 is expressed in both germ and Sertoli cells. Table S1 in the supplementary material summarizes the main characteristics of these mouse mutants. None perfectly mirrors the round-shaped acrosomeless spermatozoa observed in human type I globozoospermia, suggesting that Dpy19l2 has an original cellular function during spermiogenesis.

<sup>1</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble F-38000, France. <sup>2</sup>Equipe 'Génétique, Infertilité et Thérapeutiques' Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405, La Tronche F-38700, France.

<sup>3</sup>CHU de Grenoble, Centre d'AMP-CECOS, BP217, Grenoble cedex 9 F-38043, France.

<sup>4</sup>CHU de Grenoble, UF de Génétique Chromosomique, Grenoble F-38000, France. <sup>5</sup>Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U.836, Grenoble F-38000, France.

<sup>6</sup>CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble F-38000, France.

\*Joint co-authors

‡Author for correspondence ([christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr))

The goal of this study was to characterize the cellular location of Dpy19l2 and to elucidate its function during spermiogenesis. We demonstrate here that Dpy19l2 is a transmembrane protein expressed specifically in spermatids and that it is localized only in the inner nuclear membrane (INM) of the nucleus facing the acrosome. In *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males, we observed a progressive fragmentation of the NDL facing the acroplaxome, which was concomitant with a detachment of the acrosome. We propose that Dpy19l2 participates in the anchoring of the acrosome to the nucleus, bridging the NE to both the NDL and the acroplaxome. Our results therefore indicate that in mouse *Dpy19l2*-induced globozoospermia is due to a defect in the attachment of the NE to the acroplaxome and to the NDL. Such a defect has never been described in any species so far. We furthermore showed that DPY19 proteins constitute a new family of membrane nuclear proteins, therefore opening a new field of research in proteins involved in nucleus-cytoplasm interactions.

## MATERIALS AND METHODS

### Biological preparations

#### Human

Sperm were obtained from the fertility department of Grenoble Hospital (France), following approval by the ethical committee and informed consent from the patient.

#### Animals

All animal procedures were run according to the French guidelines on the use of animals in scientific investigations with the approval of the local Ethical Committee. *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Mutant Mouse Regional Resource Center (University of California, Davis, CA, USA). Although gene knockout had been checked by PCR/Southern ([http://mmrrc.mousebiology.org/doc/di\\_032274PCR\\_Protocol.pdf](http://mmrrc.mousebiology.org/doc/di_032274PCR_Protocol.pdf)), we confirmed by RT-PCR that *Dpy19l2* transcripts were absent (not shown).

### Spermatogenic cells dissociation

Detunicated testes were incubated in 5 ml of collagenase solution (1 mg/ml in EKR) for 30 minutes at room temperature. The dispersed seminiferous tubules were washed with PBS and cut thinly. Cells were dissociated by gently pipetting and pelleted by centrifugation at 500 g for 10 minutes. Cells were suspended in 1 ml PBS and fixed in 4% PFA solution, washed with PBS and finally layered onto polylysine-coated slides.

For EM experiments, cell suspensions were loaded into a sedimentation chamber according to procedures developed for murine spermatogenic cells for velocity sedimentation under unit gravity separation (Romrell et al., 1976).

### Sperm analysis

Sperm was displayed over a slide and dried at room temperature, then fixed in Ether/Ethanol 1:1 for Harris-Schorr stain or in methanol for lectin staining [10 µg/ml PSA-Rhodamin (Vector Laboratories)].

### Antibodies

Mouse sperm protein sp56 monoclonal antibodies were from QED Bioscience; lamin B1 antibodies were from Abcam (Ab16048); acetyl histone H4 antibodies (06-598) were from Millipore; and DDK-tag antibodies were from Origene. Dpy19l2 antibodies were produced in rabbit as polyclonal antibodies raised against RSKLREGSSDRPQSSC and CTGQARRRWSAATMEP peptides corresponding to amino acids 6-21 and 21-36 of the N terminus of mouse Dpy19l2.

### Histology and immunohistochemistry

Testes were fixed for 24 hours in 4% PFA. Tissue was dehydrated in a graded ethanol series, embedded in paraffin and sectioned at 4 µm onto slides. For histology studies, sections were stained via automated slides stainer (Leica Autostainer XL V2.2). For immunohistochemistry, heat antigen retrieval was performed by boiling slides immersed in 0.01 M sodium citrate buffer, 0.05% Tween 20 (pH 6.0) for ~25 min. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4°C in PBS with 2%

goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100. Slides were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and counterstained with Hoechst. Images were taken by confocal microscopy (Zeiss LSM 710) and processed using Zen 2009.

### Electron microscopy (EM)

#### Immunogold labeling

Purified spermatids were fixed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.3) containing 2% PFA and 0.2% glutaraldehyde. Cells were then washed twice in 0.1 M phosphate buffer and once in 0.1 M (pH 7.2) phosphate buffer/50 mM glycine before being centrifuged and embedded in 10% gelatin diluted in the same buffer at 37°C. After solidification on ice, this cell pellet was incubated for 4 hours in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Cryosections of these samples were made at -120°C using an ultra-cryo-microtome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose according to Liou et al. (Liou et al., 1996). For labeling, cryosections were first incubated with primary α-Dpy19l2 antibody and revealed with protein A-gold conjugated (CMC, Utrecht, The Netherlands).

#### Morphological analysis

Spermatids were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). Cells were then embedded in 10% gelatin diluted in 0.1 M cacodylate. After solidification, samples were post fixed with 1% osmium tetroxide and 0.1 M cacodylate (pH 7.2) for 1 h at 4°C. After washing, cells were further stained with 1% uranyl acetate (pH 4) for 1 hour at 4°C before being dehydrated through graded alcohol and infiltrated with a mix of 1/1 epon/alcohol (100%) for 1 hour and several baths of fresh epon (Sigma) for 3 hours. Finally, samples were included in a capsule full of resin that was let to polymerize for 72 hours at 60°C. Ultra thin sections of the cell samples were cut with an ultramicrotome (Leica), sections were post-stained with 5% uranyl acetate and 0.4% lead citrate and observed in an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX).

### Cell culture, transfection and nuclei preparation

HEK-293 and NH3T3 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS (Invitrogen, France) and transiently transfected with pEGFP and human orthologs of Cter-iGFP-tagged-DPY19L2, Cter-DDK-tagged DPY19L3 and Cter-DDK-tagged SUN5 containing pCMV6 plasmids (from Origene, Rockville, MD, US) alone or in combination, using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, transfected cells were fixed with 4% PFA before immunocytochemistry experiments.

Nuclei were prepared in cold hypotonic buffer and obtained after loose dounce homogenizer according to Zhong et al. (Zhong et al., 2010). Nuclei were pelleted at 2000 g for 20 minutes at 4°C and fixed in 4% PFA.

### Statistical analyses

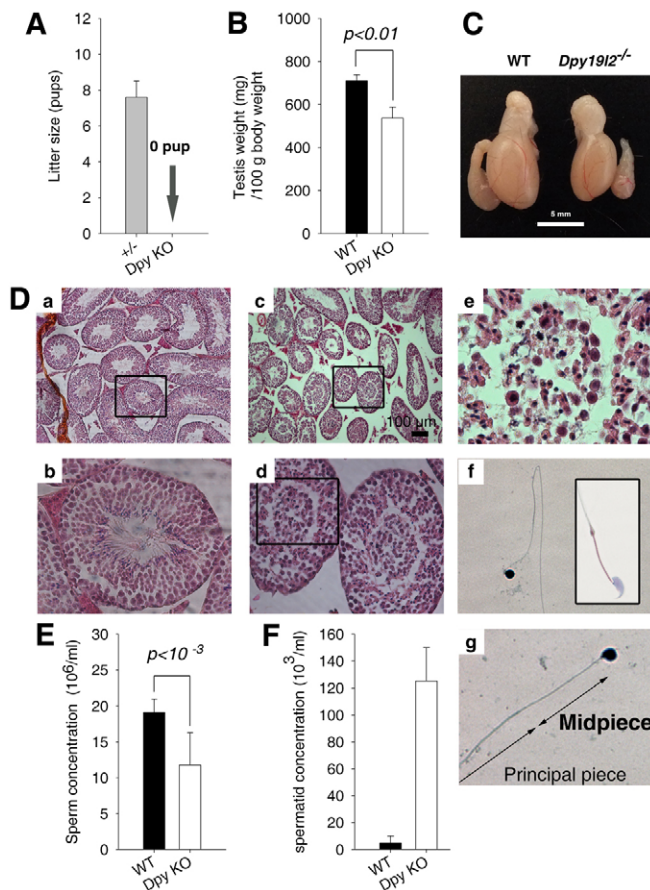
Statistical analyses were performed with SigmaPlot. A *t*-test was used to compare wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> samples. Data presented represent mean ± s.e.m. Two-tailed statistical tests with *P* ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

## RESULTS

### *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice are sterile and sperm present a round shaped head with multiple defects

*Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice were very succinctly described as infertile in a mouse knockout library established for transmembrane proteins (Tang et al., 2010). This was consistent with our result concerning the impact of *DPY19L2* deletion in human fertility (Harbuz et al., 2011). Here, we performed a much finer reproductive phenotyping. First, *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males were sterile, whereas *Dpy19l2*<sup>+/-</sup> males were perfectly fertile (Fig. 1A). The only anatomical defect observed was a decrease of the weight and size of the *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> testis in comparison with wild-type male siblings (Fig. 1B,C). In testis sections stained with Eosin/Hematoxylin, the lumens of





**Fig. 1. Spermiogenesis is abnormal in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males and they are sterile.** (A) No pup was born when *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males were mated with wild-type females ( $n=10$ ). (B) *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males had a smaller testes than wild-type males ( $n=6$ ). (C) Typical size of wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> testes of male siblings. Scale bar: 5 mm. (D) Contrary to what is observed in wild-type testis (sections stained with Eosin-Hematoxylin) (a) (b is the enlargement of the black box in a), a mass of cells characterized by different sizes and different condensation states of their nucleus is present in some lumens of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> tubules (c) (d is the enlargement of the black box in c; e is the enlargement of the black box in d). (f,g) Most of the spermatozoa (>70%) presented with a round-shaped head. Inset shows a wild-type mouse sperm. (E) *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males presented a smaller concentration of epididymal sperm than did wild-type males ( $n=4$ ). (F) In sperm obtained from *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> epididymides extracts, large cells similar to those observed in the tubule sections were present at a concentration of around  $1.25 \times 10^5$  cells. These cells were not observed in wild-type epididymides extracts ( $n=4$ ). Data are mean  $\pm$  s.e.m.

tubules from wild-type males were large and many flagella were observed (Fig. 1Da,Db). By comparison, the structure of the tubules from a *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> littermate was clearly disorganized: the most striking difference was the presence of numerous large cells in some lumens (Fig. 1Dc, Dd). When stained with Hematoxylin, the nucleus of these cells appeared dark blue (Fig. 1De), indicating that these cells are probably male germ cells. Spermiogenesis arrest usually leads to spermatid apoptosis, which could explain the observed decreased testicular weight (Romero et al., 2011; Xiao et al., 2009). Thus, we measured the number of apoptotic cells in testis slices with a TUNEL test, but we observed no apoptotic cells from controls nor *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males tubules sections (data not

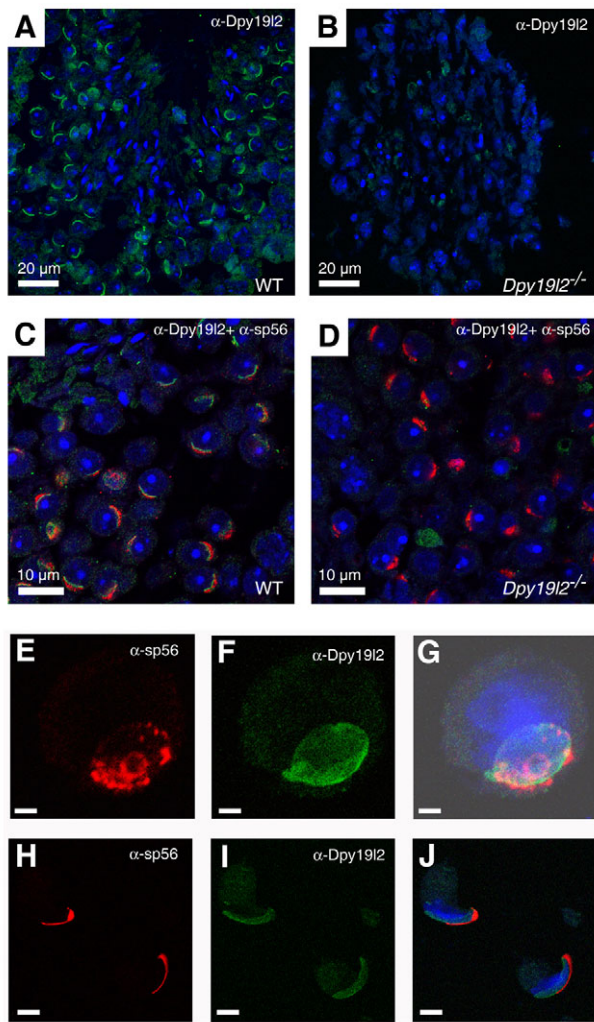
shown). In epididymis, *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> sperm were globozoospermic with the canonical round-shaped sperm heads (Fig. 1Df, Dg). The small decrease of testis size was associated with a decrease in sperm concentration in the cauda epididymides, which was almost halved ( $19 \times 10^6 \pm 3$ /ml and  $11 \times 10^6 \pm 9$ /ml in wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> sperm, respectively) (Fig. 1E). Interestingly, large cells, which correspond to the aborted spermatids observed in the lumens of the tubules, were present among epididymal sperm at a concentration of  $\sim 1.25 \times 10^5$  per ml (Fig. 1F). This type of cell was not present in wild-type sperm.

At the cellular level, the morphological aspect of spermatozoa from *DPY19L2* homozygously deleted men and knockout mice was remarkably similar (supplementary material Fig. S1B), with round-shaped sperm heads. Harris-Shorr stained spermatozoa presented various morphological defects. First  $\sim 99\%$  of the sperm population presented an important defect in the midpiece, with  $\sim 70\%$  sperm presenting a complete absence of the mitochondrial sheath (Fig. 1Dg; supplementary material Fig. S1A, B) and 29% a partial and disorganized sheath (supplementary material Fig. S1C, D). Defects were also observed in the principal piece with  $\sim 20\%$  of sperm presenting coiled tails (supplementary material Fig. S1E, F) and  $\sim 9\%$  presenting several flagella (supplementary material Fig. S1G, H). Finally,  $\sim 1\%$  of sperm presented incomplete individualization between spermatozoa (supplementary material Fig. S1I, J).

### Dpy19l2 is a polarized protein facing acrosome

In order to understand why the absence of Dpy19l2 leads to the formation of round headed acrosomeless spermatozoa, we first determined the cellular location of the protein by performing immunohistochemistry experiments with an antibody raised against Dpy19l2. In wild-type tubule sections, a strong polarized staining was observed in round spermatids (Fig. 2A). However, this staining was absent in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids (Fig. 2B). We also performed staining with another antibody targeting a different peptide of the N-ter and an identical staining was observed (data not shown). Finally, triple staining with Dpy19l2 antibody, sp56 antibody [to visualize the acrosome: sp56 is a protein of the acrosomal matrix in spermatids and incapacitated sperm (Kim et al., 2001)] and Hoechst was performed to demonstrate the antigenicity of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> sections (Fig. 2C, D). Altogether, these results demonstrate the specificity of the staining.

In order to obtain a more accurate localization of the protein in the different germ cell types, testis cells were fractionated by sedimentation in a BSA gradient and triple stained ( $\alpha$ -Dpy19l2,  $\alpha$ -sp56 and Hoechst). No specific staining was observed in pachytene spermatocytes (data not shown). However, in round spermatids, Dpy19l2 staining is organized as a cap over the nucleus facing the acrosome (Fig. 2E-G). In condensed spermatids, Dpy19l2 covers the whole acrosomal area, including the equatorial and dorsal segments, contrary to sp56, which at this stage is restricted to the dorsal segment of the acrosome (Fig. 2H-J). Interestingly, we did not observe any Dpy19l2 staining in epididymal sperms, suggesting that the protein had been remodeled at this stage (supplementary material Fig. S2A-F). This result confirms our previous results obtained by western blot showing the absence of Dpy19l2 protein in human and mouse mature sperm (Harbuz et al., 2011). Lamina-associated polypeptide 2 (LAP2), lamin B1 and B3 are also remodeled during epididymal transit and are absent in mature sperm cells (Alzheimer et al., 1998; Schutz et al., 2005). The remodeling of NE is probably related to the deep modifications of the nucleus during epididymal transit.



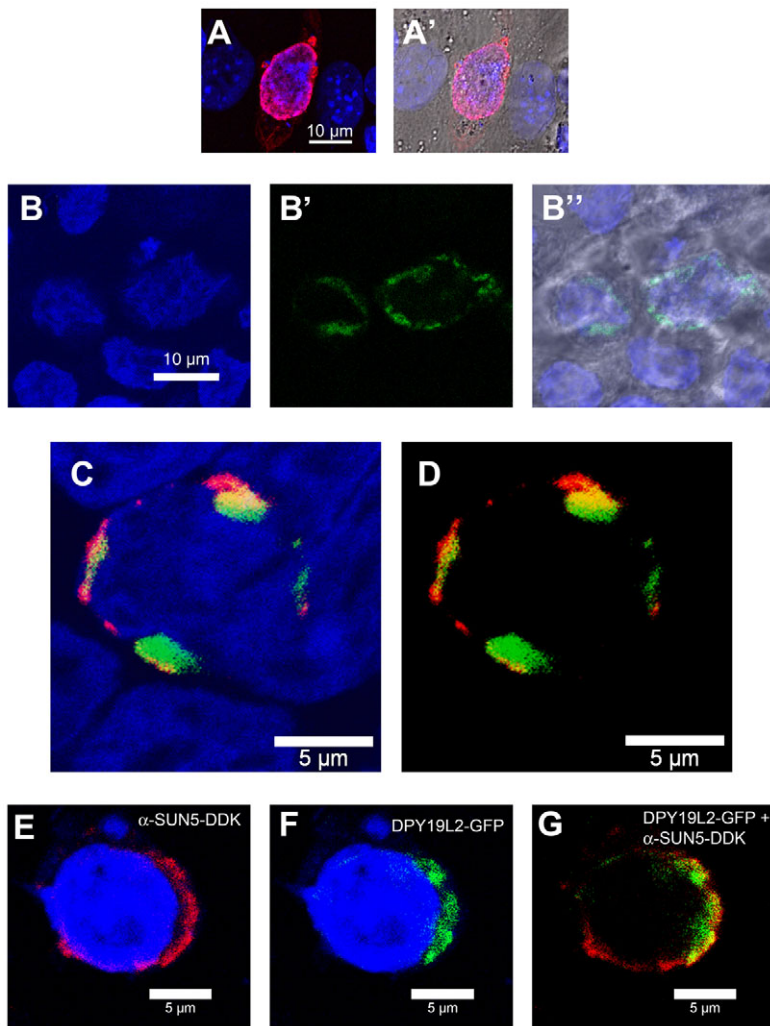
**Fig. 2. Immunostaining of Dpy19l2 shows its acrosomal localization in wild-type spermatids.** (A) Wild-type tubule sections stained with an antibody raised against Dpy19l2 ( $\alpha$ -Dpy19l2) and counterstained with Hoechst to show the nucleus (blue). In round spermatids, the antibody recognized a structure located in the acrosomal cap area (green). (B) The same antibody did not recognize any acrosomal structure in tubule sections from *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> testis. (C,D) Comparison of wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> tubule sections stained with  $\alpha$ -Dpy19l2 (green),  $\alpha$ -sp56 antibodies (to show the acrosomal matrix; red) and Hoechst (blue). (E-J) An isolated round spermatid, at step 5 of spermiogenesis (cap phase) (E-G) and condensed spermatids at step 12 of spermiogenesis (H-J), were labeled with  $\alpha$ -sp56,  $\alpha$ -Dpy19l2 and Hoechst. (E,H) Sp56 staining. (F,I) Dpy19l2 staining. (G,J) Overlay. Scale bars: 20  $\mu$ m in A,B; 10  $\mu$ m in C,D; 1  $\mu$ m in E-G; 0.5  $\mu$ m in H-J.

### Dpy19l2 is a protein of the inner nuclear membrane

The localization of Dpy19l2 identified above may correspond to different subcellular structures such as the inner acrosomal membrane or the NE. To determine the localization of Dpy19l2, we first transfected, alone or in combination, one member of the DPY19L family, DPY19L2 or DPY19L3, and SUN5 (also known as SPAG4L), a member of the SUN family, in HEK and NH3T3 cells. DPY19L2 was tagged with GFP, and DPY19L3 and SUN5 were tagged with DDK. We chose SUN5 as a marker of the inner

nuclear membrane (INM) because it was recently demonstrated that SUN5 is positioned in round spermatids in the NE facing the acrosomal vesicle (Frohnert et al., 2011).

First, as expected for a SUN protein, SUN5 immunostaining formed a nuclear rim-like pattern when transfected alone (Fig. 3A,A'). DPY19L2-GFP fluorescence was also in the peri-nuclear area but the staining was more discontinuous and more clustered around the nuclear rim (Fig. 3B-B"). Because GFP-tag may modify the localization of a tagged protein, we also transfected DPY19L3-DDK, a different member of the DPY19L family. DPY19L3 immunostaining formed a nuclear rim-like pattern very similar to SUN5 immunostaining (supplementary material Fig. S3A). The immunostaining remained attached to isolated nuclei obtained by gentle cell lysis after cell swelling in hypoosmotic solution (supplementary material Fig. S3B). These results suggest that NE is the target organelle for all members of the DPY19L family. When DPY19L2 and SUN5 were co-transfected, DPY19L2-GFP staining partially colocalized with SUN5 staining, but with a striking spatial organization where DPY19L2-GFP fluorescence was located in a more internal nuclear location than SUN5-DDK immunostaining (Fig. 3C,D). Because HEK cells present a small cytoplasmic compartment that makes it difficult to focus only on the nuclear area, double staining were also performed on isolated nuclei. Isolated nuclei presenting NE swelling, evidenced by the presence of a space between SUN5 staining and DNA staining, presented a similar pattern of staining [isolated nuclei prepared in hypo-osmotic solution present with partial NE swelling (Dahl et al., 2004)]: in these nuclei, DPY19L2-GFP fluorescence was also in a more internal nuclear location than SUN5 immunostaining (Fig. 3E-G). Both tags were located at the C terminus of the proteins. The C terminus of SUN proteins is located in the NE lumen (Hodzic et al., 2004) and the fact that GFP staining was in a more internal nuclear location, is incompatible with a localization of DPY19L2 in the outer nuclear membrane (ONM) and thus demonstrates the INM location of DPY19L2 in cell lines. Moreover, this result suggests that the C terminus of DPY19L2 is located in the nucleoplasm. To confirm the nucleoplasmic location of the C terminus of DPY19L proteins, we compared SUN5/DPY19L3 immunostainings obtained with or without permeabilization of isolated nuclei. Similar immunostaining was observed on non-permeabilized or permeabilized isolated nuclei from SUN5-DDK transfected HEK cells with antibodies against SUN5-DDK, suggesting that ONM was partially damaged by the nuclei isolation process (supplementary material Fig. S3Ca,Cb). However, isolated nuclei from DPY19L3-DDK transfected HEK cells were immunostained only after Triton-X100 permeabilization (supplementary material Fig. S3Cc,Cd). The results of these last experiments were in accordance with a nucleoplasmic localization of the C terminus of DPY19L proteins. To confirm that Dpy19l2 is located in the INM in spermatids, we then performed immunogold labeling with EM. In round spermatids at step 5-6 of spermiogenesis, immunogold particles were restricted and positioned all along the bridging structure of the acrosome, corresponding to the NDL, the NE and the acroplaxome (Fig. 4A,B; supplementary material Fig. S4A-D). In step 9, we observed a similar immunogold staining (supplementary material Fig. S4D). This first set of immunogold labeling results unequivocally demonstrated that Dpy19l2 is also located in the NE in spermatids. The antibody targets the N-terminal domain of this transmembrane protein (amino acids 6-21) and thus could be located (1) on the cytosolic face of the ONM, (2) in the lumen of the NE or (3) in the nucleoplasm. As mentioned in the

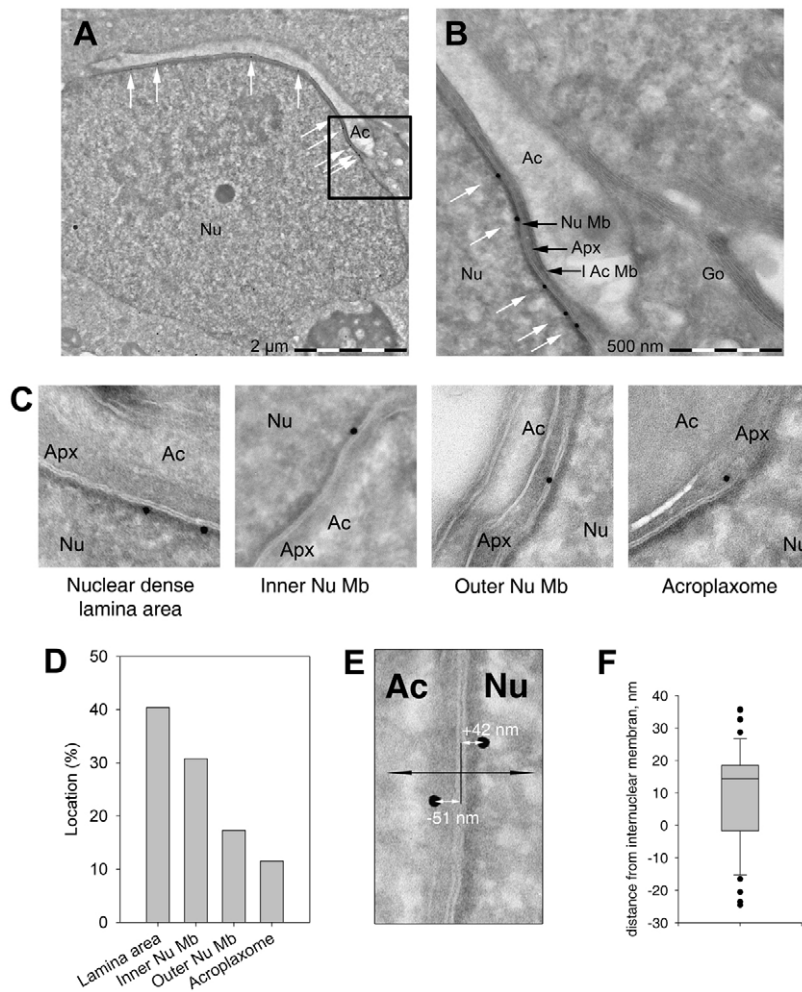


**Fig. 3. DPY19L2 and SUN5 are located in the nuclear envelope when heterologously expressed in cell lines.** (A,A') NH3T3 cells were transfected with pCMV6-SUN5-DDK and immunofluorescence staining observed after Hoechst nuclei counterstaining. (A) Overlay of Hoechst and SUN5-DDK immunostaining and (A') overlay of Hoechst, SUN5-DDK immunostaining and phase contrast. (B-B'') HEK cells were transfected with pCMV6-DPY19L2-GFP and fluorescence of GFP measured by confocal microscopy. (C-G) SUN5-DDK immunostaining partially overlaps with DPY19L2-GFP: the C terminus of DPY19L2-GFP is located closer to the nucleus than the C terminus of SUN5. HEK cells were transfected with both DPY19L2-GFP and SUN5-DDK plasmids. Double transfected cells were analyzed with confocal microscopy after nuclei counterstaining with Hoechst. (C,D) DPY19L2 fluorescence (green) was located in a more internal nuclear location than SUN5 staining (red), showing that the C terminus of DPY19L2-GFP is located closer to the nucleus than the C terminus of SUN5. The yellow corresponds to SUN5-DPY19L2 colocalization. (E-G) Isolated nuclei of double transfected HEK cells presented a DPY19L2-GFP fluorescence (green) in a more internal nuclear localization than SUN5 immunostaining (red) at the nuclear envelope. Scale bars: 10  $\mu$ m in A-B''; 5  $\mu$ m in C-G.

literature, the observed position of the gold particles did not allow the direct determination of the precise localization of the antigenic site because gold particles fall in a 80 nm diameter circle around the antigenic site because of the lengths of IgG [ $20 \text{ nm} \times 2 (\text{IgG} \times 2) = 40 \text{ nm}$ ]. In order to better characterize the localization of the N-ter, we first measured the frequency of the gold particle positioning in relation to different sites: (1) the NDL, (2) the INM and ONM, and (3) the acroplaxome (Fig. 4C). Gold particles were most frequently located in the NDL area (Fig. 4D). Second, we measured the shortest distance from the centre of the gold particle to the line splitting both nuclear membranes (Fig. 4E): measures were counted positively when heading towards the nucleus and negatively when heading toward the acrosome. As the distribution of the gold particles in its circle is random, the median of the sample should be 0 for a location in the NE lumen, around  $-10 \text{ nm}$  if the epitope is located on the cytosolic side of the ONM, and  $+10 \text{ nm}$  for a location in the nucleoplasm. A box-plot corresponding to the numerical values of the distances of 52 gold particles is showed in Fig. 4F and a median of  $+14.36 \text{ nm}$  was determined. This result strongly suggests that the N-ter of Dpy19l2 is located in the nucleoplasm in mouse spermatids. All together, transfection and EM results demonstrate that DPY19L2 is localized in the INM of round spermatids, with both N- and C-ter in the nucleoplasm.

### Caudal descent and acrosome spreading are defective in the absence of Dpy19l2

In order to understand the role of Dpy19l2 in acrosome biogenesis, ultrastructural studies of acrosome formation were performed by EM on spermatogenic cells from *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males sorted by sedimentation velocity (Barcellona and Meistrich, 1977; Romrell et al., 1976). First, initial acrosome binding at step 3 was not disrupted and we observed no differences in the acrosomal junctional structures between wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A,B). However, the acrosomal matrix, which binds tightly to the acroplaxome at this step (Fig. 5A), had an ectopic localization, binding to the outer acrosomal membrane (Fig. 5B,D, black arrows). Acrosome of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> sperm in step 4 of the spermiogenesis had a similar volume and extension compared with wild-type acrosomes (Fig. 5C,D). However, new defects appeared, including the presence of numerous vacuoles in the acrosome (Fig. 5D, white arrows). During the next steps, the caudal descent of the acrosome was clearly hampered. Numerous spermatids were blocked at stage 5 (Fig. 6). The extension of the NDL was not observed (Fig. 6B,C), leading to a complete block of bilateral acrosome extension. Instead of spreading over the nucleus, the acrosome swelled (Fig. 6C). This bloating is correlated with an increase in the size and the number of the vacuoles. This vacuolization probably corresponds to acrosomal membrane invagination caused by the continuing flux of Golgi-derived



**Fig. 4. Immunogold localization of Dpy19l2 in wild-type mouse spermatids.** (A) Gold particles targeting Dpy19l2 antigenic sites were observed along the nuclear envelope of a spermatid in step 5/6 (white arrows). (B) Magnification of the black box drawn in A. (C) Representative localizations of gold particles at different locations. (D) Repartition of the gold particles in function of their localization, as presented in C. (E) Example of the measure of distances between the centre of the gold particle and the inter-nuclear membrane space. (F) Box plot showing the repartition of the numerical values of the distances measured for 52 gold particles. Nu, nucleus; Ac, acrosome; I Ac Mb, inner acrosomal membrane; Apx, acroplaxome; Nu Mb, nuclear membrane; Go, Golgi apparatus.

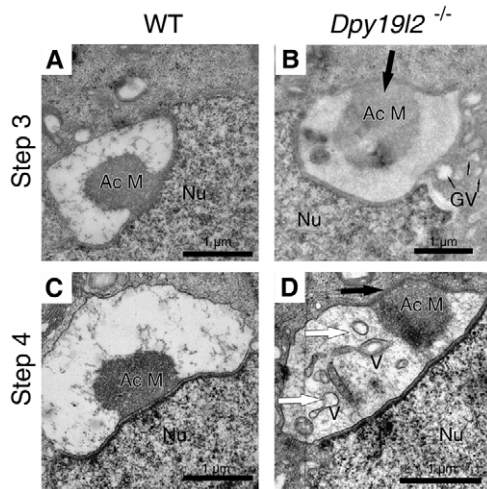
vesicles that cannot contribute to the normal acrosomal membrane spreading. Acrosome descent is unlikely to be due to vesicular traffic defects, as we did not measure any difference in the size of the Golgi apparatus or the number and size of Golgi-derived vesicles between wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids (data not shown). Surprisingly, in some spermatids corresponding to step 9, acrosome spreading progressed unilaterally and was thus defective (Fig. 6E,F). In addition, when observed at higher magnification, the bridging structure of spermatids at step 9 appeared discontinuous (Fig. 6F, inset).

### The NDL facing the acrosome and the acroplaxome are defective in the absence of Dpy19l2

In Fig. 6B,F, the NDL facing the acrosome was partially missing and the thickness of the acroplaxome-lamina area structure was irregular in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids. In fact, the interaction between acroplaxome and NE seems to be dependent on the presence of the NDL: when it was present (Fig. 7A), the bridging structure allowing the interaction between acrosome and nucleus presented a normal layered structure and thickness. In its absence, the acroplaxome was loose and the thickness of the bridging structure was not uniform (Fig. 7A), contrary to the acroplaxome observed in wild-type spermatids (Fig. 7A, inset). At higher magnification, a swelling of the inter-nuclear membrane space was observed and NE membranes split off, the ONM remaining attached on the acroplaxome (Fig. 7B). The

vanishing of the NDL led to a re-organization of the distribution of lamin B1: in wild-type round spermatids, lamin B1 is not present in the NE-facing acrosome and a strong polarization was observed with the acrosome at the anterior pole and lamin B1 at the posterior pole (supplementary material Fig. S5A,B). The absence of Dpy19l2 in deficient animals modifies the polarized distribution of lamin B1, which shifts to the anterior pole (supplementary material Fig. S5C,D). However, the vanishing of lamin B1 in elongated spermatids is not modified in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids (supplementary material Fig. S5E,F).

The disruption of the bridging structures leads to detachments of large parts of the acrosome from the nucleus (Fig. 8A-F). In tubule sections of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> animals, acrosomes were irregular and partially unbound to the nucleus (Fig. 8A,B). Acrosomes fully detached from the nucleus were also frequently observed (Fig. 8B). Acrosome fragmentation was observed from both partially elongated and non elongated acrosomes (Fig. 8C,D). Interestingly, the acroplaxome remained attached to the acrosome during detachment (Fig. 8C), indicating again that the rupture was due to a bridging defect between the acroplaxome and the NE. In more condensed spermatids, fully detached acrosomes with numerous vacuoles were observed in the cytoplasm (Fig. 8E). At later stages, no sp56 staining was observed in the vicinity of condensed nuclei, indicating that condensed spermatids were acrosomeless (Fig. 8F), suggesting that the detached acrosomes or acrosomal fragments were eliminated with the cytoplasmic components in the residual bodies during the last step of spermatid compaction.



**Fig. 5. Fine structure of acrosomes at step 3 and 4 of wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids.** (A,C) Wild-type spermatids. (B,D) *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids. (A) At step 3, the centre of the acrosomal matrix (Ac M) bound tightly to the nuclear membrane. (B) Large black arrow shows the ectopic localization of the acrosomal matrix in deficient spermatid. Small black arrows show fusing Golgi vesicles. (C) Ultrastructure of acrosome of a wild-type spermatid at step 4. (D) Similarly, ectopic acrosomal matrix was observed in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatid at step 4. Moreover, vacuoles appeared within the acrosome (white arrows). Nu, nucleus; V, vacuole; GV Golgi vesicles.

### Mislocalization of the manchette and of glycoproteins at the plasma membrane

During the spermatid elongation phase, a transient microtubular structure, known as the manchette, is implemented and is described as an important element of sperm morphogenesis. The manchette anchors on a perinuclear ring of actin associated with the marginal ring of the acroplaxome (Kierszenbaum et al., 2003). This microtubular structure is necessary for cargo traffic along the manchette and thus spermiogenesis (Zhou et al., 2009). In *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> animals, condensed spermatids with round-nucleus, long microtubular structures corresponding to the manchette, were observed. However, they were not inserted around the nucleus but were free within the cell, contrary to wild-type spermatids (Fig. 9). In condensed spermatids from *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice presenting a partial

elongation, the manchette was longer than the nucleus and seemed anchored in the plasma membrane (Fig. 9C). Thus, the detachment of acrosome did not prevent manchette elongation but rather its anchoring at the right position. The manchette is important for proteins trafficking and its mislocalization may disturb protein distribution in spermatids (Kierszenbaum et al., 2011). Localization and dynamic of mouse sperm glycoproteins can be studied by lectin staining. *Pisum sativum* agglutinin (PSA) is a lectin widely used to visualize cell surface glycoproteins facing the acrosome. It has been shown that wild-type non-capacitated sperm present a typical PSA staining covering the dorsal and equatorial segments of the acrosome and the flagellum (Baker et al., 2004). Interestingly, globozoospermic sperm did not present any PSA staining in the head and in the flagellum (Fig. 9D), suggesting that glycoprotein trafficking is hampered during spermiogenesis of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice.

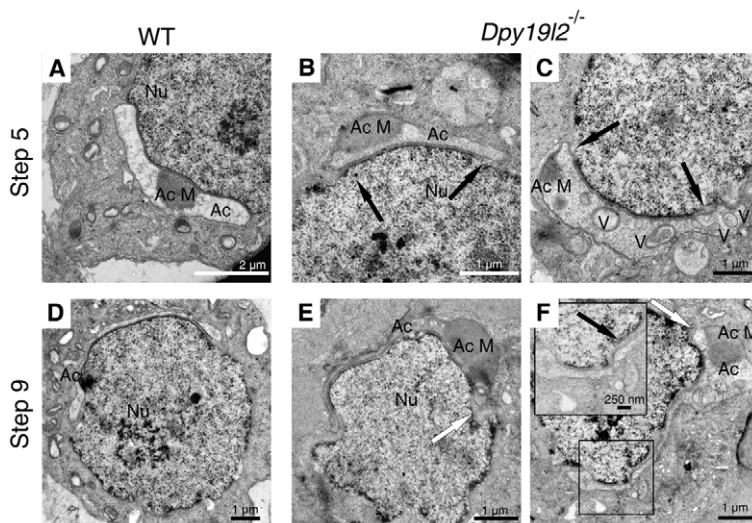
### DISCUSSION

Acrosome biogenesis remains not fully characterized and, to date, there had been no protein described to link the acrosome to the nucleus (Kierszenbaum et al., 2011). This work suggests that DPY19L2, as the first protein that anchors the acrosome to the nucleus, is likely to be central to a yet unexplored network of proteins that leads to the last steps of sperm differentiation. We demonstrate that *Dpy19l2* is a transmembrane protein located in the INM and that its absence leads to the disruption of the layered structure present at the nuclear/acrosome junction during acrosome spreading and eventually to acroplaxome detachment from the nucleus.

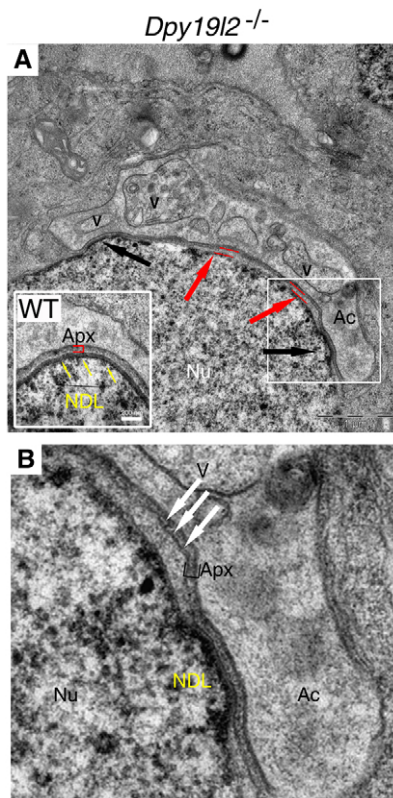
In mammals DPY19L2 belongs to a family of four homologous proteins: DPY19L1 to DPY19L4. This family does not present obvious homology with any other membrane proteins and clearly represents a new family of integral membrane proteins. In this paper, we characterized one of the members of this family and showed that *Dpy19l2* is a membrane protein of the INM. As DPY19L2, DPY19L3 is also localized in the INM when expressed in cells lines. DPY19L proteins thus represent a new and original family of transmembrane proteins of the NE that are probably involved in nucleus/cytoplasm interactions.

### Structure and function of *Dpy19l2* protein in spermiogenesis

First, using different programs dedicated to transmembrane topology prediction (Sosui and Phobius), and comparing the results obtained first with transmembrane topology of *Dpy19l2* in several



**Fig. 6. Fine structure of acrosomes at step 5 and 9 of wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids.** (A,D) Wild-type spermatids. (B,C,E,F) *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids. (A) Step 5 of a wild-type spermatid showing the continuous nuclear dense lamina (NDL) following the acroplaxome. The vacuoles were absent and the acrosomal matrix was bound to the inner acrosomal membrane. (B,C) The NDL/acroplaxome layer was shortened and the acrosome extended widely beyond this structure (black arrows) in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids at step 5. The acrosomal matrix was localized ectopically and the NDL was discontinuous. (D) Step 9 of a wild-type spermatid showing the bilateral spread of the acrosome over the nucleus. The NDL/acroplaxome structures were continuous. (E,F) Unilateral spreading of acrosome in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids at step 9. The failure of contralateral spreading was indicated by white arrows. Disruptions of the NDL/acroplaxome structures were frequently observed (see black arrow in inset corresponding to the enlargement of the black box drawn in F). Ac, acrosome; Ac M, acrosomal matrix; Nu, nucleus; V, vacuole.

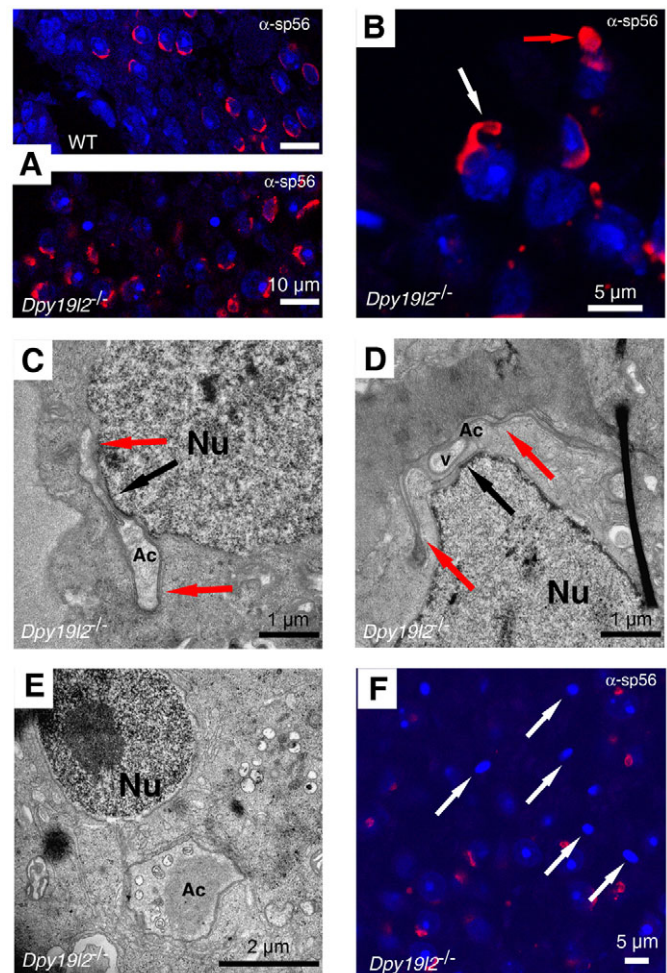


**Fig. 7. The NDL is disrupted, acroplaxome comes loose and nuclear membranes split off in stage 8 *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids.**

(A) Fine structure of the bridging structure between the acrosome and the nucleus in a *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mouse spermatid observed by EM. Acrosome (Ac) spread over the nucleus (Nu). Numerous vacuoles (V) were present in the lumen of the acrosome. Contrary to the wild-type bridging structure, where nuclear-dense lamina (NDL, yellow arrows) was continuous (inset), *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatid presented a disrupted NDL. Black arrows indicate where the NDL was still present. In the absence of the NDL, the acroplaxome (Apx) came loose (red arrows, red dashes indicate the detachment). (B) Higher magnification of the boxed region in A. In the absence of the NDL, the INM and ONM were dissociated and the ONM remained attached to the acroplaxome (white arrows).

species (bovine, dog, mouse, human, pig and Chinese panda) and second with transmembrane topology of *Dpy19l1*, we estimated that *Dpy19l2* is a transmembrane protein with 10 putative transmembrane segments (Fig. 10A). This model indicates the presence of two large N-terminal and C-terminal domains that will thus be located on the same side of the membrane. Second, immunogold labeling results unequivocally demonstrated that the N terminus of *Dpy19l2* is located in the nucleoplasm (Fig. 4F) and immunostaining experiments performed on transfected cells (Fig. 3; supplementary material Fig. S3) demonstrated that the C terminus of *DPY19L* proteins is probably located in the nucleoplasm as well. Altogether, these results suggest that the N-terminal and C-terminal domains are located in the nucleoplasm. A putative topology of *Dpy19l2* is presented in Fig. 10A.

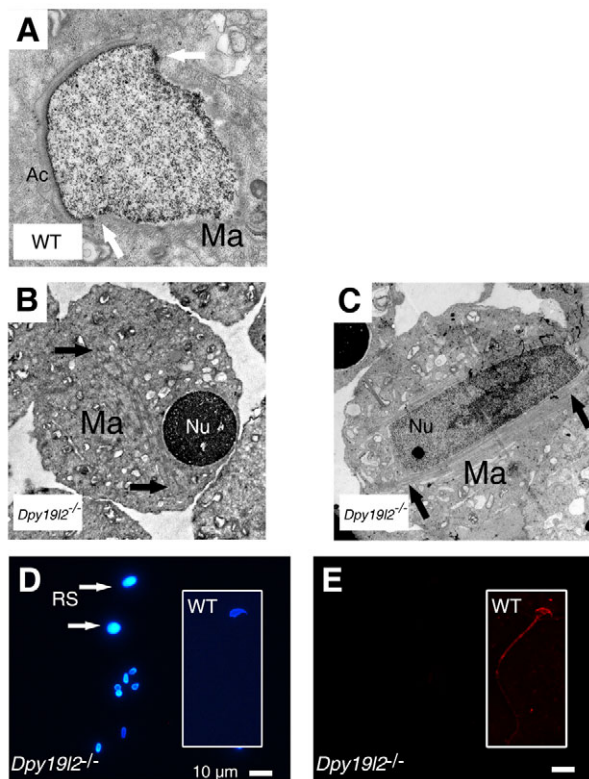
The presence of *Dpy19l2* does not seem to be necessary for acroplaxome and NDL positioning at step 3 and 4, suggesting that other proteins are involved during these phases. However, contrary to wild-type sperm, in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> sperm the acrosomal matrix is



**Fig. 8. Acrosome detachment during spermiogenesis in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids.**

(A) Confocal images of wild-type (up) and *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> (down) testis tubule sections labeled with  $\alpha$ -sp56 and Hoechst. The acroplaxome spread bilaterally and regularly in wild-type compared with *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids. (B) At higher magnification, partially (white arrow) or fully (red arrow) detached acrosomes were observed. (C) Fine structure of a partially detached acrosome on the nucleus of a spermatid of step 5. The bridging structure was present only in the centre (black arrow) and both sides became loose (red arrows). (D) Similar detachment process in a spermatid at step 9: the bridging structure was almost completely disrupted and acrosome remained attached by a small area, where the NDL was conserved (black arrow). Red arrows show large parts of the acrosome detached from the nucleus. (E) In a more condensed spermatid, the acrosome was completely detached. Ac, Acrosome; Nu, nucleus; V, vacuole. (F) A tubule section of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> testis labeled with  $\alpha$ -sp56: in fully condensed spermatids with round-shaped nucleus, the acrosome was no longer distinguishable (white arrows).

free within the acrosome and very often seems to be attached to the outer acrosomal membrane, suggesting that the bridging structure is in fact already defective. This bridging structure did not spread or was disrupted during the caudal descent of acrosome, suggesting that *Dpy19l2* is required to stabilize the multi-layered structure challenged by forces applied during the elongation phase of the acrosome. The absence of *Dpy19l2* lead to the disappearance of the NDL, then to multiple rupture points between both nuclear membranes or between NE and the acroplaxome, eventually



**Fig. 9. The manchette is misplaced in *Dpy1912*<sup>-/-</sup> spermatids.** (A) In wild-type spermatid, manchette was attached to a structure located near the marginal zone of the acrosome (white arrows), corresponding to the marginal ring. (B,C) In *Dpy1912*<sup>-/-</sup> spermatids, the manchette developed but did not anchor to the right location (black arrows) and seemed abnormally long. Nu, nucleus; Ac, Acrosome; Ma Manchette. (D,E) Epididymal sperm from *Dpy1912*<sup>-/-</sup> males stained with Hoechst (D) and *Pisum sativum* agglutinin (PSA-rhodamin) (E). In D, there are two types of nuclei: small nuclei with a round or rod shape corresponding to globozoospermic sperm; and the nuclei of spermiogenesis-blocked spermatids (RS) presented in Fig. 1. Insets: Hoechst staining (blue) showing normal nucleus shape (arrows in D) and PSA staining (red) showing the distribution of glycoproteins in a wild-type sperm.

leading to acrosome detachment. The swelling of inter-nuclear membrane space followed by the separation of both nuclear membranes, have previously been documented in both human globozoospermia (Escalier, 1990) and mouse globozoospermia induced by the absence of casein kinase 2 (Escalier et al., 2003). Interestingly, as shown by EM, the acroplaxome remained attached to the acrosome during the detachment, thus confirming that Dpy1912 is necessary to bridge the nucleus and the acroplaxome. The detachment of the acrosome removes the marginal ring of the acroplaxome and very likely prevents the adequate positioning of the perinuclear ring of the manchette. The manchette is thus mispositioned, leading to impaired intramanchette transport, sperm protein trafficking, and head and flagellum shaping (Kierszenbaum et al., 2011).

Our data clearly demonstrate that Dpy1912 is involved in the preservation or stabilization of a specific ND1 facing the acrosome. Lamin C2 and LAPs2 are not present in the postmeiotic phase and thus are unlikely partners of Dpy1912 (Alsheimer et al., 1998). Lamin B1 and B3 are expressed during spermiogenesis, but their

localizations are not compatible with the localization of Dpy1912 in spermatids (Gob et al., 2010; Schutz et al., 2005). Interestingly, the absence of Dpy1912 does not prevent the initial polarized organization of lamin B1, but the detachment of the acrosome leads to a reorganization of lamin B1, which shifts towards the anterior pole. This result suggests that the acrosome maintains a very specific ND1 that remains uncharacterized.

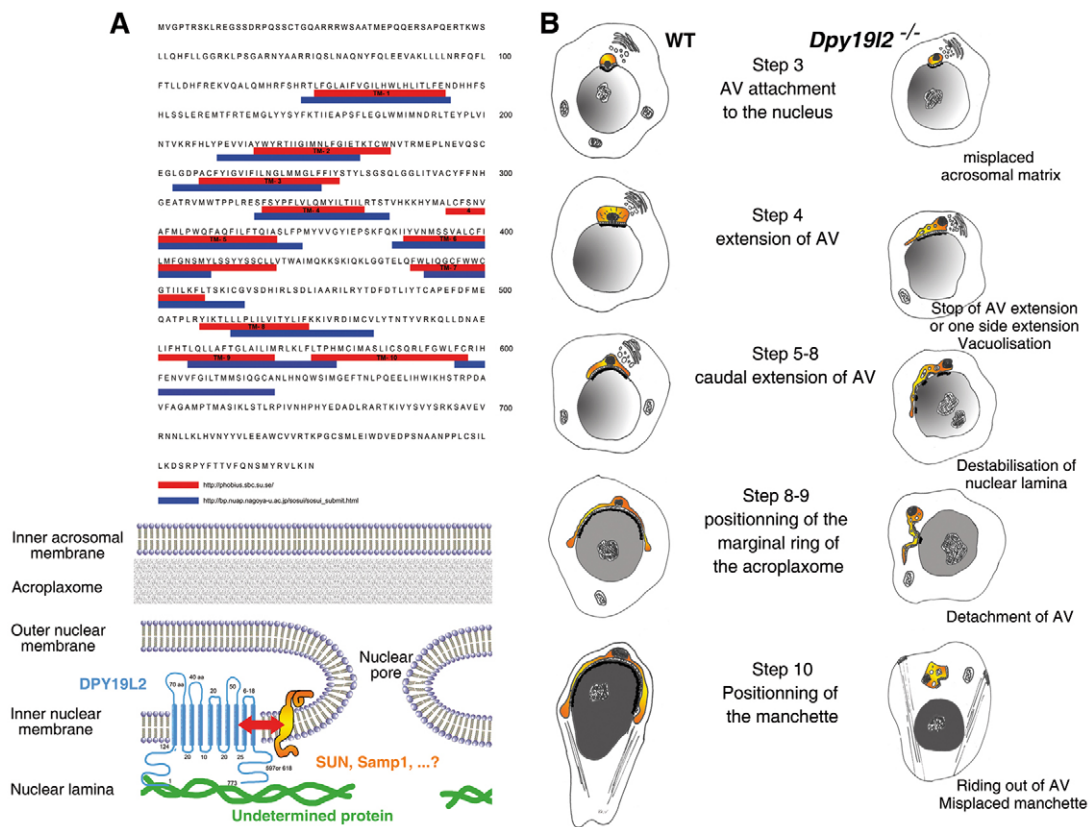
A schematic drawing of the conclusions obtained from our studies is presented in Fig. 10B.

### DPY19L as a functional partner of LINC complex

The localization of the nucleus within the cell changes during cell life and is accurately controlled mostly by SUN and KASH protein families (Burke and Roux, 2009; Tzur et al., 2006). Different SUN proteins are expressed during spermatogenesis and Sun proteins are thus likely to be involved in nuclear shaping during sperm head formation. Interestingly, Ima1, an integral transmembrane protein of the INM, has already been characterized in *S. pombe* and appears to functionally interact with SUN proteins. In the absence of Ima1, a partial dissociation of SUN-KASH complexes leads to nuclear membrane defects and lumen swelling, a phenotype also observed in *Dpy1912*<sup>-/-</sup> spermatids (King et al., 2008). The mammalian ortholog of Ima1, Samp1, is also an INM protein and its absence leads to SUN1 mislocalization (Gudise et al., 2011). SUN interactions with proteins of the INM are thus central for their role as linker of nucleoskeleton and cytoskeleton. In this work, we have characterized a new family of proteins located in the INM, the absence of which leads to the disruption of the bridging structure required for acrosome attachment on the nucleus. Interestingly, Sun5, recently described in the NE facing the acrosome in mouse, shows a spatiotemporal pattern of expression very similar to that of Dpy1912 (Frohnert et al., 2011). Our results show that SUN5 and DPY19L2 clustered in the NE in transfected HEK cells and partially colocalized. This suggests that SUN5 may be a structural partner of DPY19L2. The absence of Dpy1912 may disrupt Sun5 function and thus acrosome binding. This model is, however, speculative as no knockout or knock-down of SUN5 has been presented so far to confirm this hypothesis. Very recently, it has been described that downregulation of Dpy1911 and Dpy1913 during neurogenesis of mouse embryos leads to strong migration anomalies of neurons (Watanabe et al., 2011), a phenotype similar to that observed for Sun/Kash LINC proteins knockdowns (Zhang et al., 2009). Dpy1911/3 may be involved in Sun1/2 functioning in neuroblasts and this hypothesis could explain the striking similarity of Sun1/2 and Dpy1911/3 deficiencies. The study of putative interactions between DPY19L proteins and conventional LINC complexes will be pursued.

### Dpy1912 knockout mice represents a good model for human globozoospermia

The prognosis for men diagnosed with globozoospermia remains very poor and treating globozoospermia represents a challenging task. This is surprising for a post-meiotic defect that does not affect chromosomal segregation (Dam et al., 2007a). However, several causes may explain this high rate of failure. For example, PLC $\zeta$ , the sperm factor required for oocyte activation, is absent or minimally present in globozoospermia (Heytens et al., 2009; Taylor et al., 2010; Yoon et al., 2008). This compromises oocyte activation and therefore accounts, at least partly, for the low fertilization rate observed with these individuals.



**Fig. 10. Putative topology of Dpy19L2 and schematic description of spermiogenesis in *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> spermatids.** (A) Amino acid sequence analysis of Dpy19L2 with two different programs suggests that Dpy19L2 has 10 transmembrane domains. Dpy19L2 is located in the INM and several uncharacterized proteins, partners to Dpy19L2, are likely to be present in the NDL as well as in the INM and/or ONM in order to interconnect and regulate the interactions between the different layers. (B) The different steps of acrosome disruption in *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> spermatids.

In order to understand the physiopathology of globozoospermia and the reasons for the treatment failure, a good animal model was sought for a long time. Contrary to the other mouse mutants described to present a similar phenotype and thus considered as models to understand human globozoospermia (supplementary material Table S1), our *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> model exhibits all the characteristics of the human type 1 globozoospermia, including: (1) absence of the acrosome (Fig. 8F); (2) defects of nuclear shaping (Fig. 1), of the nuclear envelope (Fig. 7B) and of the acroplaxome (Fig. 6F); and (3) aberrant positioning of the manchette (Fig. 9). Moreover, in our model, *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> spermatids presented a unique feature with NDL disruption leading to acroplaxome detachment from the nucleus. This defect was not observed in studies of several mouse globozoospermia described so far and performed by electron microscopy (supplementary material Table S1).

Because deletion of *DPY19L2* is the main cause of human globozoospermia (>70%), *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> mice represent a perfect animal model with which to understand the physiopathology of globozoospermia and to investigate the causes of the low success rate observed in globozoospermic men treated by intra cytoplasmic sperm injection.

#### Acknowledgements

This work was supported by Le Centre national de la recherche scientifique (CNRS) (to C.A.), by the Agence Nationale de la Recherche (ANR Genopat 2009, projet ICG21) (to V.P., C.A. and P.R.). We thank Denise Escalier, Annie Andrieux and Jacques Brocard for valuable discussions.

#### Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

#### Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.077982/-DC1>

#### References

- Alsheimer, M., Fecher, E. and Benavente, R. (1998). Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J. Cell Sci.* **111**, 2227-2234.
- Audouard, C. and Christians, E. (2011). Hsp90beta1 knockout targeted to male germline: a mouse model for globozoospermia. *Fertil. Steril.* **95**, 1475-1477.
- Baker, S. S., Thomas, M. and Thaler, C. D. (2004). Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J. Androl.* **25**, 744-751.
- Barcellona, W. J. and Meistrich, M. L. (1977). Ultrastructural integrity of mouse testicular cells separated by velocity sedimentation. *J. Reprod. Fertil.* **50**, 61-68.
- Burke, B. and Roux, K. J. (2009). Nuclei take a position: managing nuclear location. *Dev. Cell* **17**, 587-597.
- Carson, A. R., Cheung, J. and Scherer, S. W. (2006). Duplication and relocation of the functional *DPY19L2* gene within low copy repeats. *BMC Genomics* **7**, 45.
- Dahl, K. N., Kahn, S. M., Wilson, K. L. and Discher, D. E. (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J. Cell Sci.* **117**, 4779-4786.
- Dam, A. H., Feenstra, I., Westphal, J. R., Ramos, L., van Golde, R. J. and Kremer, J. A. (2007a). Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* **13**, 63-75.
- Dam, A. H., Kosciński, I., Kremer, J. A., Moutou, C., Jaeger, A. S., Oudakker, A. R., Tournaye, H., Charlet, N., Lagier-Tourenne, C., van Bokhoven, H. et al. (2007b). Homozygous mutation in *SPATA16* is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 813-820.



- Escalier, D. (1990). Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* **34**, 287-297.
- Escalier, D., Silvius, D. and Xu, X. (2003). Spermatogenesis of mice lacking CK2alpha: failure of germ cell survival and characteristic modifications of the spermatid nucleus. *Mol. Reprod. Dev.* **66**, 190-201.
- Frohnert, C., Schweizer, S. and Hoyer-Fender, S. (2011). SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 207-218.
- Gob, E., Schmitt, J., Benavente, R. and Alsheimer, M. (2010). Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS ONE* **5**, e12072.
- Gudise, S., Figueroa, R. A., Lindberg, R., Larsson, V. and Hallberg, E. (2011). Samp1 is functionally associated with the LINC complex and A-type lamina networks. *J. Cell Sci.* **124**, 2077-2085.
- Harbuz, R., Zouari, R., Pierre, V., Ben Khelifa, M., Kharouf, M., Coutton, C., Merdassi, G., Abada, F., Escoffier, J., Nikas, Y. et al. (2011). A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 351-361.
- Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S. Y., Fissore, R. A., Hamer, R., Deane, C. M., Ruas, M. et al. (2009). Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.* **24**, 2417-2428.
- Hodzic, D. M., Yeater, D. B., Bengtsson, L., Otto, H. and Stahl, P. D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 25805-25812.
- Honigberg, L. and Kenyon, C. (2000). Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development* **127**, 4655-4668.
- Ito, C., Suzuki-Toyota, F., Maekawa, M., Toyama, Y., Yao, R., Noda, T. and Toshimori, K. (2004). Failure to assemble the peri-nuclear structures in GOPC deficient spermatids as found in round-headed spermatozoa. *Arch. Histol. Cytol.* **67**, 349-360.
- Kang-Decker, N., Mantchev, G. T., Juneja, S. C., McNiven, M. A. and van Deursen, J. M. (2001). Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* **294**, 1531-1533.
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E. and Tres, L. L. (2003). Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4628-4640.
- Kierszenbaum, A. L., Tres, L. L., Rivkin, E., Kang-Decker, N. and van Deursen, J. M. (2004). The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b-containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. *Biol. Reprod.* **70**, 1400-1410.
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E. and Tres, L. L. (2011). Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* **1**, 221-230.
- Kim, K. S., Cha, M. C. and Gerton, G. L. (2001). Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol. Reprod.* **64**, 36-43.
- King, M. C., Drivas, T. G. and Blobel, G. (2008). A network of nuclear envelope membrane proteins linking centromeres to microtubules. *Cell* **134**, 427-438.
- Koscinski, I., Elinati, E., Fossard, C., Redin, C., Muller, J., Velez de la Calle, J., Schmitt, F., Ben Khelifa, M., Ray, P. F., Kilani, Z. et al. (2011). DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 344-350.
- Lin, Y. N., Roy, A., Yan, W., Burns, K. H. and Matzuk, M. M. (2007). Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* **27**, 6794-6805.
- Liou, W., Geuze, H. J. and Slot, J. W. (1996). Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell Biol.* **106**, 41-58.
- Lu, L., Lin, M., Xu, M., Zhou, Z. M. and Sha, J. H. (2006). Gene functional research using polyethylenimine-mediated in vivo gene transfection into mouse spermatogenic cells. *Asian J. Androl.* **8**, 53-59.
- Mannowetz, N., Kartarius, S., Wennemuth, G. and Montenarh, M. (2010). Protein kinase CK2 and new binding partners during spermatogenesis. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 3905-3913.
- Paiardi, C., Pasini, M. E., Gioria, M. and Berruti, G. (2011). Failure of acrosome formation and globozoospermia in the wobbler mouse, a Vps54 spontaneous recessive mutant. *Spermatogenesis* **1**, 52-62.
- Romero, Y., Meikar, O., Papaioannou, M. D., Conne, B., Grey, C., Weier, M., Pralong, F., De Massy, B., Kaessmann, H., Vassalli, J. D. et al. (2011). Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PLoS ONE* **6**, e25241.
- Romrell, L. J., Bellve, A. R. and Fawcett, D. W. (1976). Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev. Biol.* **49**, 119-131.
- Schirren, C. G., Holstein, A. F. and Schirren, C. (1971). Über die Morphogenese rundkopfiger Spermatozoen des Menschen. *Andrologie* **3**, 117-125.
- Schutz, W., Alsheimer, M., Ollinger, R. and Benavente, R. (2005). Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp. Cell Res.* **307**, 285-291.
- Tang, T., Li, L., Tang, J., Li, Y., Lin, W. Y., Martin, F., Grant, D., Solloway, M., Parker, L., Ye, W. et al. (2010). A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat. Biotechnol.* **28**, 749-755.
- Taylor, S. L., Yoon, S. Y., Morshedi, M. S., Lacey, D. R., Jellerette, T., Fissore, R. A. and Oehninger, S. (2010). Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod. Biomed. Online* **20**, 559-564.
- Tzur, Y. B., Wilson, K. L. and Gruenbaum, Y. (2006). SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 782-788.
- Walden, C. M., Sandhoff, R., Chuang, C. C., Yildiz, Y., Butters, T. D., Dwek, R. A., Platt, F. M. and van der Spoel, A. C. (2007). Accumulation of glucosylceramide in murine testis, caused by inhibition of beta-glucosidase 2, implications for spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* **282**, 32655-32664.
- Watanabe, K., Takebayashi, H., Bepari, A. K., Esumi, S., Yanagawa, Y. and Tamamaki, N. (2011). Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates the radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development* **138**, 4979-4990.
- Xiao, N., Kam, C., Shen, C., Jin, W., Wang, J., Lee, K. M., Jiang, L. and Xia, J. (2009). PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J. Clin. Invest.* **119**, 802-812.
- Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D. and Seldin, D. C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.* **23**, 118-121.
- Xu, M., Xiao, J., Chen, J., Li, J., Yin, L., Zhu, H., Zhou, Z. and Sha, J. (2003). Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 9-17.
- Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., Yanagida, K., Sato, A., Toshimori, K. and Noda, T. (2002). Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11211-11216.
- Yatsenko, A. N., O'Neil, D. S., Roy, A., Arias-Mendoza, P. A., Chen, R., Murthy, L. J., Lamb, D. J. and Matzuk, M. M. (2011). Association of mutations in the zona pellucida binding protein 1 (ZBP1) gene with abnormal sperm morphology in infertile men. *Mol. Hum. Reprod.* **18**, 14-21.
- Yildiz, Y., Matern, H., Thompson, B., Allegood, J. C., Warren, R. L., Ramirez, D. M., Hammer, R. E., Hamra, F. K., Matern, S. and Russell, D. W. (2006). Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J. Clin. Invest.* **116**, 2985-2994.
- Yoon, S. Y., Jellerette, T., Salicioni, A. M., Lee, H. C., Yoo, M. S., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, J. B., Visconti, P. E. et al. (2008). Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.* **118**, 3671-3681.
- Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R. and Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron* **64**, 173-187.
- Zhong, Z., Wilson, K. L. and Dahl, K. N. (2010). Beyond lamins: other structural components of the nucleoskeleton. *Methods Cell Biol.* **98**, 97-119.
- Zhou, J., Du, Y. R., Qin, W. H., Hu, Y. G., Huang, Y. N., Bao, L., Han, D., Mansouri, A. and Xu, G. L. (2009). RIM-BP3 is a manchette-associated protein

**Table S1. Mouse models of associated anomalies of the acrosome morphogenesis and nuclear shaping in spermatids**

KO mouse for	Corresponding protein	Function	Localization	Acrosome	Nuclear shape	Nuclear membrane and lamina	Reference(s)
<i>Pick1</i> *	Protein interacting with C kinase 1	Golgi vesicle fusion; Protein trafficking	Trans-Golgi Gopc partner Ck2 $\alpha$ ' partner	Fragmented	Poorly elongated, not hook shape	Normal	(Xiao et al., 2009)
<i>Gopc</i>	Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein)	Golgi vesicle fusion; Vesicle trafficking	Trans-Golgi Pick1 partner	Fragmented	Round or ovoid not hook shape	Normal	(Ito et al., 2004; Yao et al., 2002)
<i>Vps54</i> ‡	Vacuolar-vesicular protein sorting 54 homolog	Vesicular sorting protein Retrograde traffic	Acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Poorly elongated and irregular outline	Normal	(Paiardi et al., 2011)
<i>Hrb Agfg1</i> (official)	HIV-1 Rev binding protein ArfGAP with FG repeats 1 (official symbol)	Golgi vesicle fusion	Cytoplasmic surface of acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Globular	Apparently normal	(Kang-Decker et al., 2001; Kierszenbaum et al., 2004)
<i>Zpbp1</i>	Zona pellucida binding protein 1	Binding and penetration into the zona pellucida	Acrosomal matrix	Bulged	Shortened hook	Normal	(Yatsenko et al., 2011)
<i>Csnk2a2</i>	Casein kinase II alpha' catalytic subunit	Kinase/ phosphorylation	Ubiquitous Acrosomal matrix Pick1 partner	Partially separated from the nucleus	Poorly elongated	Swelling of nuclear membranes	(Mannowetz et al., 2010; Xu et al., 1999)
<i>Hsp90b1</i>	Heat shock protein 90b1 heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1 (official symbol)	Endoplasmic chaperone	Endoplasmic reticulum	Partially present	Globular or deformed	?	(Audouard and Christians, 2011)
<i>Gba2</i>	Glucosidase beta 2	Hydrolyzes glucosylceramide	Endoplasmic reticulum and/or plasma membrane	Partially present, disordered	Not elongated and irregular outline	?	(Walden et al., 2007; Yildiz et al., 2006)
<i>Dpy19l2</i>	Dpy-19-like 2 ( <i>C. elegans</i> )	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) partner	Inner Nuclear membrane	Absent	Round	Destabilization of nuclear lamina. Nuclear membrane splitting off	This work

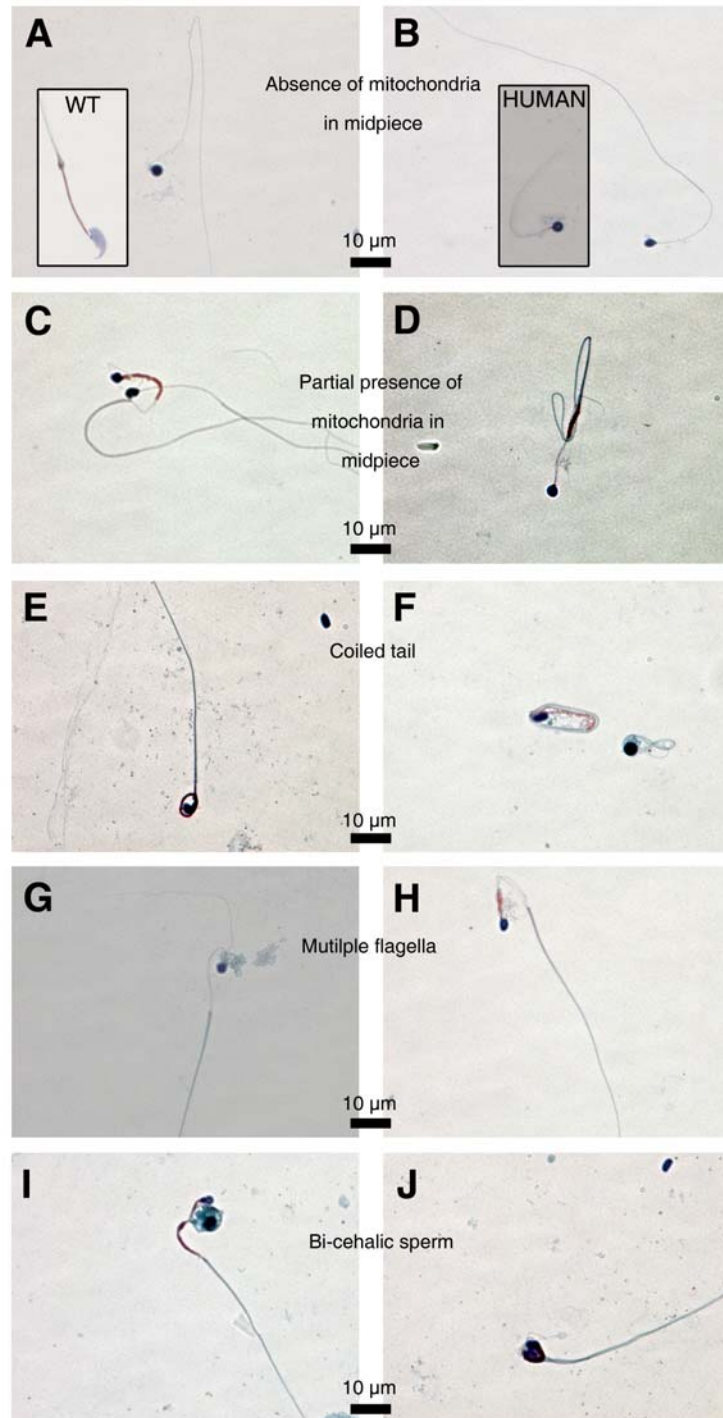
\*Spinocerebellar ataxia (neurodegeneration)

‡Wobbler mice with spinal muscular atrophy (motoneurons degeneration)

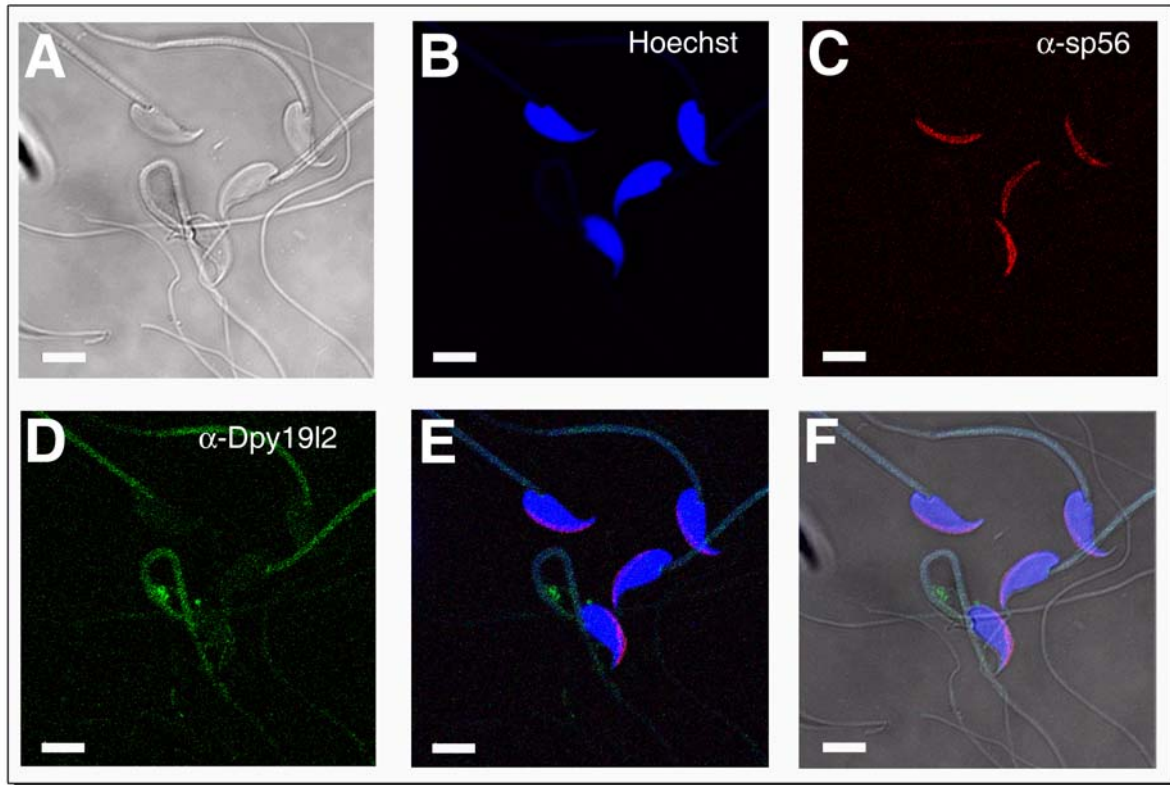
<b>KO mouse for :</b>	<b>Corresponding protein</b>	<b>Function</b>	<b>Localization</b>	<b>Acrosome</b>	<b>Nuclear shape</b>	<b>Nuclear membrane and lamina</b>	<b>Ref</b>
<i>Pick1</i> *	Protein interacting with C kinase 1	Golgi vesicle fusion; Protein trafficking	Trans-Golgi Gopc partner Ck2 $\alpha$ ' partner	Fragmented	Poorly elongated, not hook shape	Normal	(Xiao et al., 2009)
<i>Gopc</i>	Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein)	Golgi vesicle fusion; Vesicle trafficking	Trans-Golgi Pick1 partner	Fragmented	Round or ovoid not hook shape	Normal	(Ito et al., 2004; Yao et al., 2002)
<i>Vps54</i> **	Vacuolar-vesicular protein sorting 54 homolog	Vesicular sorting protein Retrograde traffic	Acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Poorly elongated and irregular outline	Normal	(Paiardi et al., 2011)
<i>Hrb Agfg1</i> (official)	HIV-1 Rev binding protein ArfGAP with FG repeats 1 (official symbol)	Golgi vesicle fusion	Cytoplasmic surface of acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Globular	Apparently normal	(Kang-Decker et al., 2001; Kierszenbaum et al., 2004)
<i>Zpp1</i>	Zona pellucida binding protein 1	Binding and penetration into the zona pellucida	Acrosomal matrix	Bulged	Shortened hook	Normal	(Yatsenko et al., 2011)
<i>Csnk2a2</i>	Casein kinase II alpha' catalytic subunit	Kinase/ phosphorylation	Ubiquitous Acrosomal matrix Pick1 partner	Partially separated from the nucleus	Poorly elongated	swelling of nuclear membranes	(Mannowetz et al., 2010; Xu et al., 1999)
<i>Hsp90b1</i>	Heat shock protein 90b1 heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1 (official symbol)	Endoplasmic chaperone	Endoplasmic reticulum	Partially present	Globular or deformed	?	(Audouard and Christians, 2011)
<i>Gba2</i>	Glucosidase beta 2	hydrolyzes glucosylceramide	Endoplasmic reticulum and/or plasma membrane	Partially present, disordered	Not elongated and irregular outline	?	(Walden et al., 2007; Yildiz et al., 2006)
<i>Dpy19l2</i>	Dpy-19-like 2 (C. elegans)	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) partner	Inner Nuclear membrane	Absent	Round	Destabilization of nuclear lamina. Nuclear membrane splitting off	This work

**Supplementary Material Table S1: Mouse models of associated anomalies of the acrosome morphogenesis and nuclear shaping in spermatids**

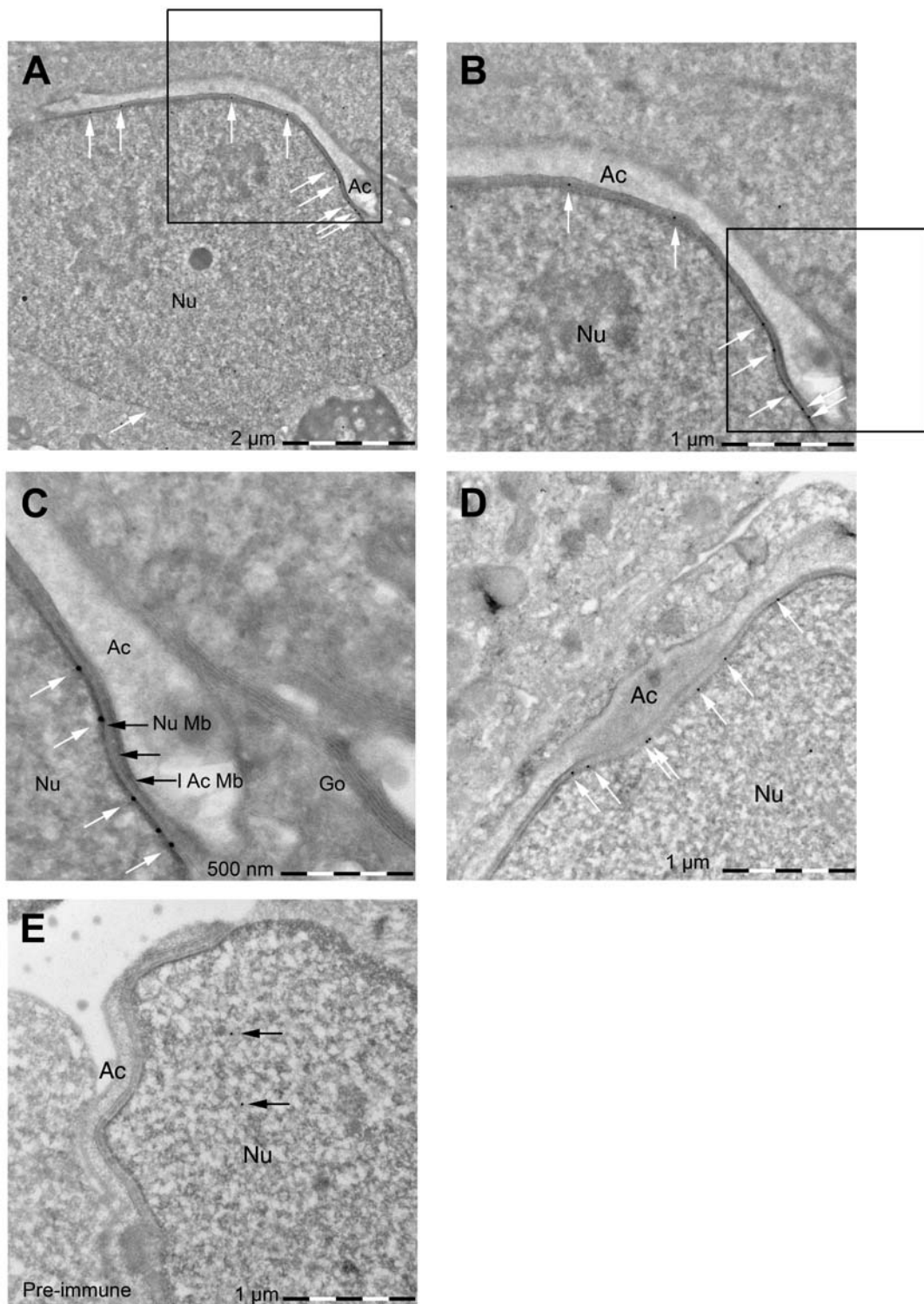
spinocerebellar ataxia (neurodegeneration); \*\*Wobbler mice with spinal muscular atrophy (motoneurons degeneration)



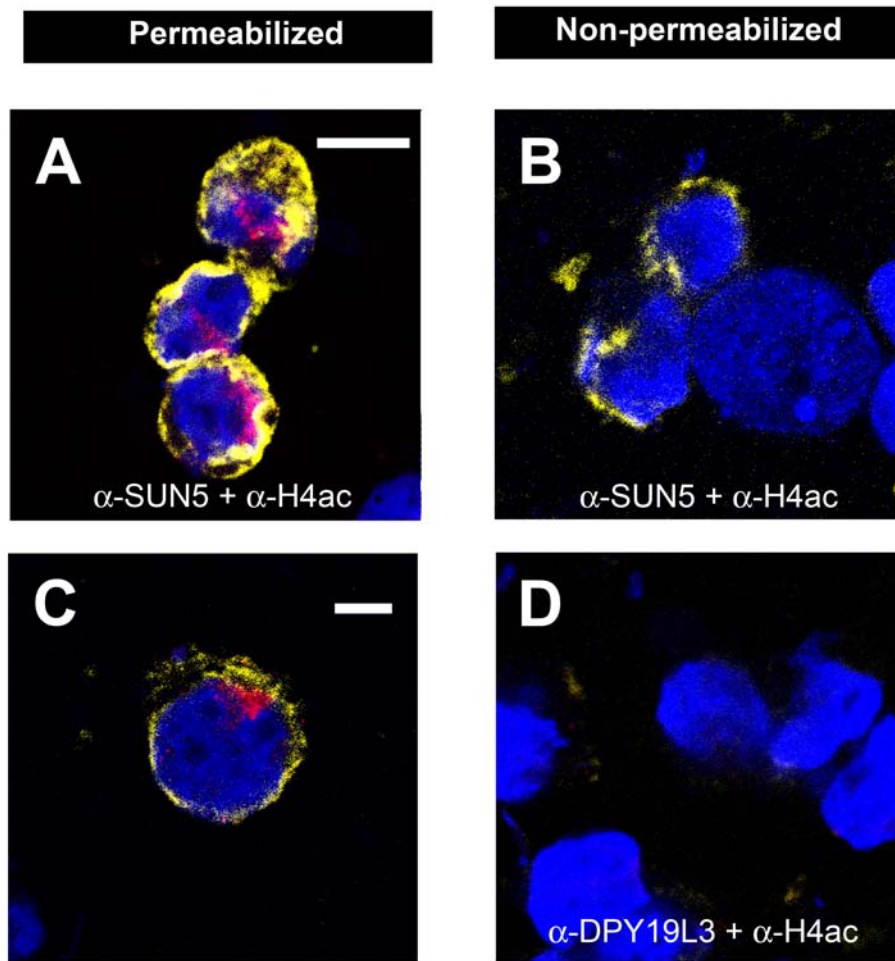
**Supplementary Fig. S1. Sperm from *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males present round shaped head with multiple defects of the flagellum.** (A-J) Light microscopy analysis of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatozoa. Sperm morphology was assessed with Harris-Shorr staining: nuclei were blue and mitochondria red. (A) Most of the spermatozoa (>70%) presented a round-shaped head and an absence of mitochondria in the midpiece. Inset: WT stained mouse sperm presented as a control. (B) Comparison of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mouse sperm with *DPY19L2*-deleted human sperm showing the similarity of the shape of heads. (C and D) Around 25% of spermatozoa presented a disorganized midpiece with mitochondria packed either at the beginning or at the end of the midpiece. (E and F) Some sperm presented coiled tails. (G and H) Sperm with multiple flagella were also observed. (I and J) Sperm with aborted cytokinesis were observed in less than 1% of sperm population.



**Supplementary Fig. S2. Immunolocalization of Dpy1912 in epididymal WT spermatozoa.** (A-F). WT Spermatozoa from epididymis were labeled with  $\alpha$ -Dpy1912 (green),  $\alpha$ -sp56 (red) antibodies and counterstained with Hoechst (blue). (A) phase contrast. (B) Hoechst. (C) sp56 staining. (D) Dpy1912 staining. (E) Overlay of Hoechst, Dpy1912 and sp56 staining. (F) Overlay of phase contrast, Hoechst, Dpy1912 and sp56 staining. Scale bars (A-F) 0.5  $\mu$ m.



**Supplementary Fig. S3. Immunogold localization of Dpy19l2 in WT mouse spermatids.** (A) Gold particles targeting Dpy19l2 antigenic sites were observed along the nuclear envelope of a spermatid in step 8 (white arrows). (B) Magnification of the black box drawn in A. (C) Magnification of the black box drawn in B. (D) Gold particles observed along the nuclear envelope of a spermatid in step 9 (white arrows) (E) Absence of gold particle over the nuclear envelope with pre-immune serum. Unspecific staining was present inside the nucleus.



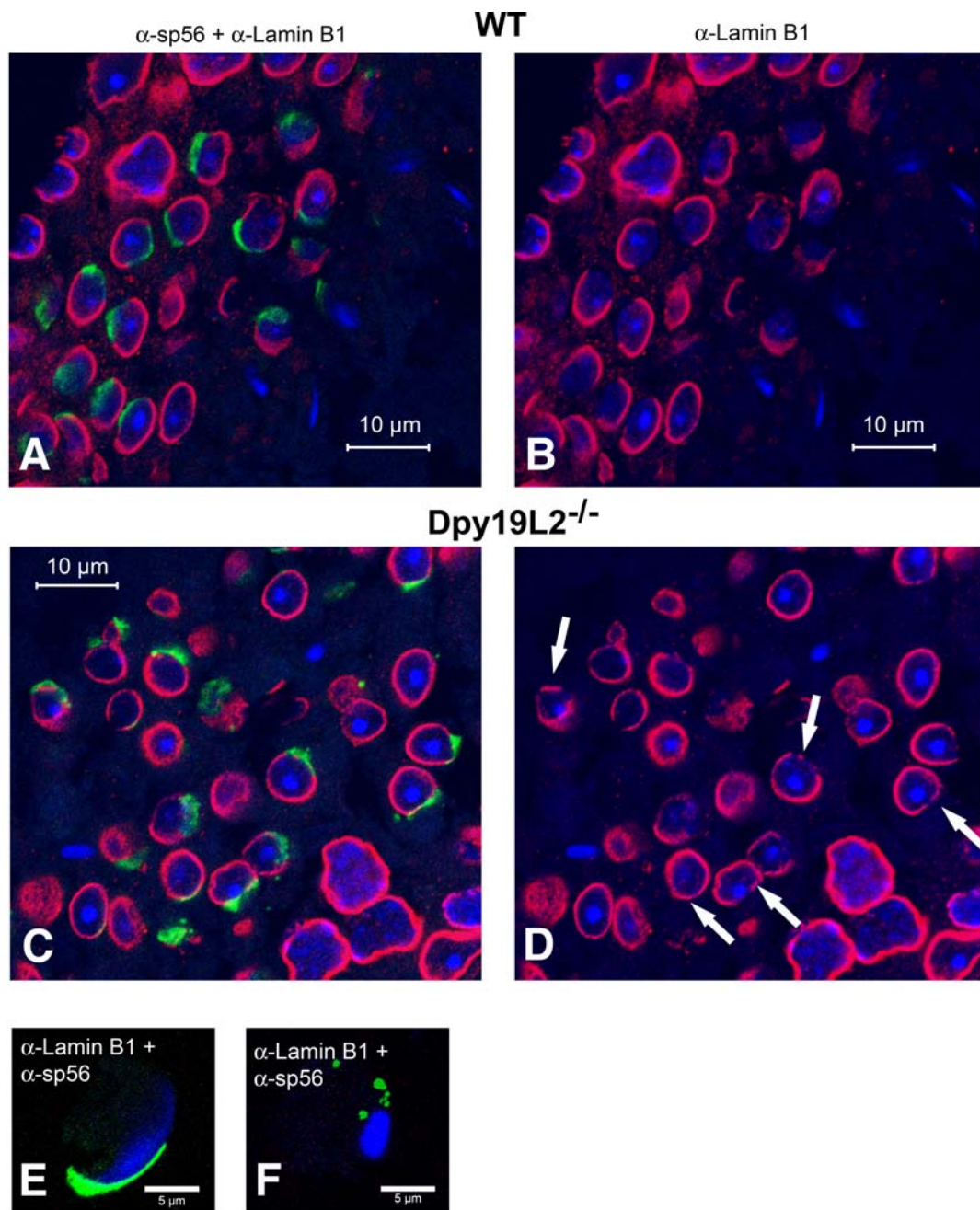
**Supplementary Fig. S4. The C-ter of DPY19L3-DDK is located in the nucleoplasm side of the nuclear envelope.**

(A) Isolated HEK nuclei were permeabilized with triton X-100 and double immunostained with  $\alpha$ -SUN5-DDK antibody (yellow) and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (red), as a control of NE permeabilization and counterstained with Hoechst. Both histone H4 and SUN5 were immunodetected in these conditions.

(B) Non-permeabilized isolated HEK nuclei were double immunostained with  $\alpha$ -SUN5-DDK antibody (yellow) and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (red). The presence of SUN5 immunostaining indicates that ONM was damaged by nuclei isolation and the absence of acetylated histone H4 indicates that the INM was intact.

(C) Isolated HEK nuclei were permeabilized with Triton X-100 and double immunostained with  $\alpha$ -DPY19L3-DDK antibody and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (yellow) and counterstained with Hoechst. Both histone H4 and DPY19L3 were immunodetected in these conditions.

(D) Non-permeabilized isolated HEK nuclei were double immunostained with  $\alpha$ -DPY19L3-DDK antibody and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (yellow) and counterstained with Hoechst. Neither histone H4 nor DPY19L3 were immunodetected in these conditions.



**Supplementary Fig. S5. Abnormal localization and dynamic of lamin B1 in spermatids from Dpy19L2 deficient animals.**

Enlargements of testis sections immunostained with  $\alpha$ -sp56 (green staining) and  $\alpha$ -lamin B1 (purple staining) antibodies (A-B). In WT round spermatids, lamin B1 is not present in NE facing acrosomal vesicle and a strong polarization with acrosomal vesicle at the anterior pole (evidenced with  $\alpha$ -sp56 antibody- green staining) and lamin B1 at the posterior pole ( $\alpha$ -lamin B1-purple staining) is observable. (C-D) The absence of Dpy19L2 in deficient animal modifies the polarized distribution of lamin B1, which shifts to the anterior pole (white arrows). (E-F) In elongated spermatids, lamin B1 staining is no longer observable, in both WT (E) and Dpy19L2 deficient cells (F).



**Article 2:** «Dynamics of Sun5 localization during spermatogenesis in wild type and Dpy19l2 knock-out mice indicates that Sun5 is not involved in acrosome attachment on the nuclear envelope».

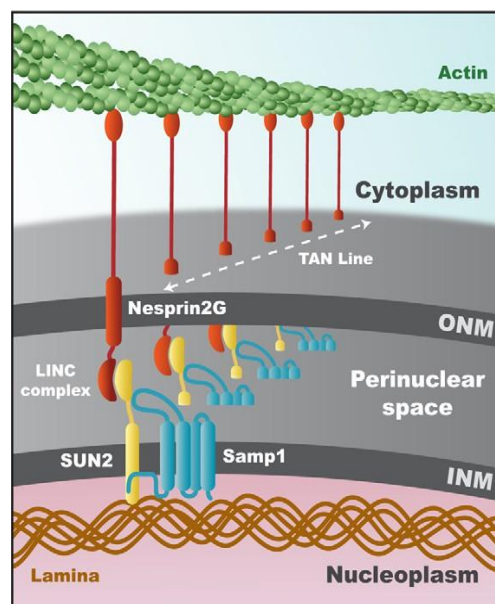
*Sandra Yassine<sup>1,2,#</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2,#</sup>, Roland Abi Nahed<sup>1,2</sup>, Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Thomas Karaouzene<sup>1,2,3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,3</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*</sup>*

**Résumé:**

Nous avons montré précédemment que la protéine Dpy19l2 appartient à la membrane nucléaire interne de la spermatide ronde et que son absence provoque le détachement de l'acrosome et la production des spermatozoïdes malformés et non féconds, à l'origine d'une infertilité masculine sévère, nommée la globozoospermie. Le détachement de l'acrosome en absence de cette protéine, est dû à la déstabilisation de la jonction acroplaxome-lamina nucléaire. De nombreuses infertilités masculines telle que la globozoospermie, sont liées à une altération de la biogenèse de l'acrosome. Dans le but d'identifier les mécanismes moléculaires de la biogenèse de l'acrosome, son étalement et son attachement au noyau spermatique, nous nous sommes dirigés vers la recherche de nouveaux acteurs moléculaires, impliqués particulièrement dans l'attachement de l'acrosome à l'enveloppe nucléaire. Notre recherche a été spécifiquement focalisée sur l'étude de la protéine Sun5/SPAG4L. Nous avons choisi Sun5 puisqu'elle est connue pour son expression restreinte au niveau des testicules et pour sa localisation au niveau de la membrane nucléaire interne en face de l'acrosome (Frohnert et al., 2011). L'hypothèse était donc de vérifier si Sun5 pouvait être un partenaire de Dpy19l2, contribuant ensemble à l'ancrage de l'acrosome à l'enveloppe nucléaire. Cette hypothèse a été inspirée de l'interaction entre Sun2 et Samp1 au niveau des fibroblastes de souris. Lors de la migration polarisée des fibroblastes, cultivés en monocouche, leur noyau migre vers l'arrière et son mouvement est dépendant d'un flux rétrograde de l'actine. Les forces nécessaires au mouvement du noyau, sont donc transmises via un complexe LINC formé par les deux protéines Nesprine 2 (protéine KASH de la membrane nucléaire externe) et Sun2 (protéine SUN de la membrane nucléaire interne). Cependant une troisième protéine qui contribue au mouvement du noyau, est la protéine Samp1 de la membrane nucléaire interne. En interagissant à la fois avec la lamine A/C et avec Sun2, via son extrémité N-ter nucléoplasmique, Samp1 permet l'ancrage de Sun2 au niveau de l'ENI et ainsi la stabilisation du complexe LINC formé par Sun2-Nesprine2. En absence de Samp1, une grande partie de Sun2 est mal localisée et ne peut plus interagir d'une

manière stable avec Nesprine2 aboutissant à la dissociation du complexe Sun2-Nesprine2 et l'altération de la migration cellulaire (Borrego-Pinto et al., 2012).

L'analyse par microscopie électronique des spermatides rondes, des souris mâles *Dpy19l2*<sup>-/-</sup>, montre un gonflement de l'espace périnucléaire liant les deux enveloppes nucléaires externe et interne, puis un détachement de l'acroosome muni de l'acroplaxome ainsi que de l'ENE. Ce défaut de l'enveloppe nucléaire, est fréquemment observé lors de la dissociation du complexe LINC, dont l'une de principales fonctions est d'assurer la rigidité des deux enveloppes nucléaires et le maintien d'un espacement perinucléaire uniforme. Ce défaut observé, nous a poussé à émettre l'hypothèse suivante, que *Dpy19l2* pourrait être un partenaire de Sun5, similaire à *Samp1* et Sun2, contribuant à l'ancrage de Sun5 au niveau de l'enveloppe nucléaire interne et ainsi à la stabilisation d'un complexe LINC formé par Sun5 et une protéine KASH de l'enveloppe nucléaire externe. Et qu'en absence de *Dpy19l2*, une grande partie de Sun5 ne parvient plus à se localiser correctement au sein de l'enveloppe nucléaire interne, aboutissant à la dissociation du complexe LINC et le détachement éventuel de l'acroosome.



**Figure 53 :** Modèle représentant le rôle de *Samp1* dans le mouvement nucléaire. *Samp1* participe à la stabilisation du complexe LINC formé par Nesprine2 et Sun2 au niveau de l'enveloppe nucléaire, en permettant l'ancrage de Sun2 au niveau de l'enveloppe nucléaire interne, par son interaction avec Sun2 d'une part et la lamine A/C d'autre part. Les forces exercées par le cytosquelette d'actine sont ainsi transmises à la lamine nucléaire via le complexe LINC, formé par Nesprine2 et Sun2, permettant le mouvement du noyau. D'après (Borrego-Pinto et al., 2012)

Nous avons étudié en premier temps, la localisation cellulaire de la protéine Sun 5/SPAG4L au cours de la spermatogenèse normale des souris mâles WT et KO *Dpy19l2*<sup>-/-</sup>. Dans un deuxième temps, nous avons analysé le taux d'expression testiculaire de la protéine entre les deux modèles WT et globozoospermique. Dans cette étude, nous montrons que Sun 5 est une protéine à expression pré et post-méiotique, qui apparait au niveau des spermatocytes I et que contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature par « Frohnert et ses collègues », Sun 5 n'est pas située en face de l'acrosome de la spermatide ronde, mais au contraire dans la partie postérieure à l'opposé. Puis son expression diminue au fur et à mesure de la progression de la spermiogenèse, selon un axe antéro-caudal, pour finir par se localiser au niveau de la pièce connective, reliant la tête au flagelle au niveau du spermatozoïde mature. Sun 5 présente une localisation similaire au cours de la spermatogenèse dans le modèle globozoospermique, cependant on assiste à une redistribution de la protéine lors du détachement de l'acrosome, montrant ainsi l'existence de facteur empêchant la mobilité des protéines dans la zone acrosomale.

Les résultats obtenus montre que Sun5 n'est pas un partenaire de *Dpy19l2*, la suite du travail consistera donc à la caractérisation d'autres partenaires moléculaires de *Dpy19l2* avec lesquels elle interagit pour accomplir ses fonctions.



RESEARCH ARTICLE

# Dynamics of Sun5 Localization during Spermatogenesis in Wild Type and *Dpy19l2* Knock-Out Mice Indicates That Sun5 Is Not Involved in Acrosome Attachment to the Nuclear Envelope

Sandra Yassine<sup>1,2‡</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2‡</sup>, Roland Abi Nahed<sup>1,2</sup>, Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Thomas Karaouzene<sup>1,2,3</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,3</sup>, Christophe Arnoult<sup>1,2\*</sup>

**1** Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France, **2** Equipe "Génétique, Epigénétique et thérapies de l'infertilité" Institut Albert Bonniot, INSERM U823, Grenoble, F-38000, France, **3** CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

‡ These authors are shared first authors on this work.

\* [Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:Christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr)



OPEN ACCESS

**Citation:** Yassine S, Escoffier J, Nahed RA, Pierre V, Karaouzene T, Ray PF, et al. (2015) Dynamics of Sun5 Localization during Spermatogenesis in Wild Type and *Dpy19l2* Knock-Out Mice Indicates That Sun5 Is Not Involved in Acrosome Attachment to the Nuclear Envelope. PLoS ONE 10(3): e0118698. doi:10.1371/journal.pone.0118698

**Academic Editor:** Xuejiang Guo, Nanjing Medical University, CHINA

**Received:** July 15, 2014

**Accepted:** January 22, 2015

**Published:** March 16, 2015

**Copyright:** © 2015 Yassine et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The work was supported by Grant fertipla—Gravit Foundation <http://www.gravit-innovation.org/> (CA) and Grant ICG2I—Agence Nationale de la Recherche, <http://www.agence-nationale-recherche.fr> (PR,CA).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

The acrosome is an organelle that is central to sperm physiology and a defective acrosome biogenesis leads to globozoospermia, a severe male infertility. The identification of the actors involved in acrosome biogenesis is therefore particularly important to decipher the molecular pathogeny of globozoospermia. We recently showed that a defect in the *DPY19L2* gene is present in more than 70% of globozoospermic men and demonstrated that *Dpy19l2*, located in the inner nuclear membrane, is the first protein involved in the attachment of the acrosome to the nuclear envelope (NE). SUN proteins serve to link the nuclear envelope to the cytoskeleton and are therefore good candidates to participate in acrosome-nucleus attachment, potentially by interacting with *DPY19L2*. In order to characterize new actors of acrosomal attachment, we focused on Sun5 (also called Spag4l), which is highly expressed in male germ cells, and investigated its localization during spermatogenesis. Using immunohistochemistry and Western blot experiments in mice, we showed that Sun5 transits through different cellular compartments during meiosis. In pachytene spermatocytes, it is located in a membranous compartment different to the reticulum. In round spermatids, it progresses to the Golgi and the NE before to be located to the tail/head junction in epididymal sperm. Interestingly, we demonstrate that Sun5 is not, as initially reported, facing the acrosome but is in fact excluded from this zone. Moreover, we show that in *Dpy19l2* KO spermatids, upon the detachment of the acrosome, Sun5 relocalizes to the totality of the NE suggesting that the acrosome attachment excludes Sun5 from the NE facing the acrosome. Finally, Western-blot experiments demonstrate that Sun5 is glycosylated. Overall, our work, associated with other publications, strongly suggests that the attachment of the acrosome to the nucleus does not likely depend on the formation of SUN complexes.

## Introduction

The acrosome, is a specialized organelle allowing the sperm to cross the zona pellucida. Acrosome biogenesis is a complex event which begins with the formation of the acroplaxome, a specific cytoskeletal structure composed of a network of proteins which includes keratin 5 and beta-actin [1]. The acroplaxome binds to the nuclear envelope while specific vesicles produced by the Golgi apparatus are targeted to the acroplaxome where they fuse to generate the acrosomal vesicle. Additional vesicles then fuse with the growing acrosomal vesicle allowing its stretching during spermatid elongation. The mechanism permitting the association of the different components of the acroplaxome and their attachment to the nuclear envelope on one side and to the acrosome on the other side remain largely uncharacterized [2].

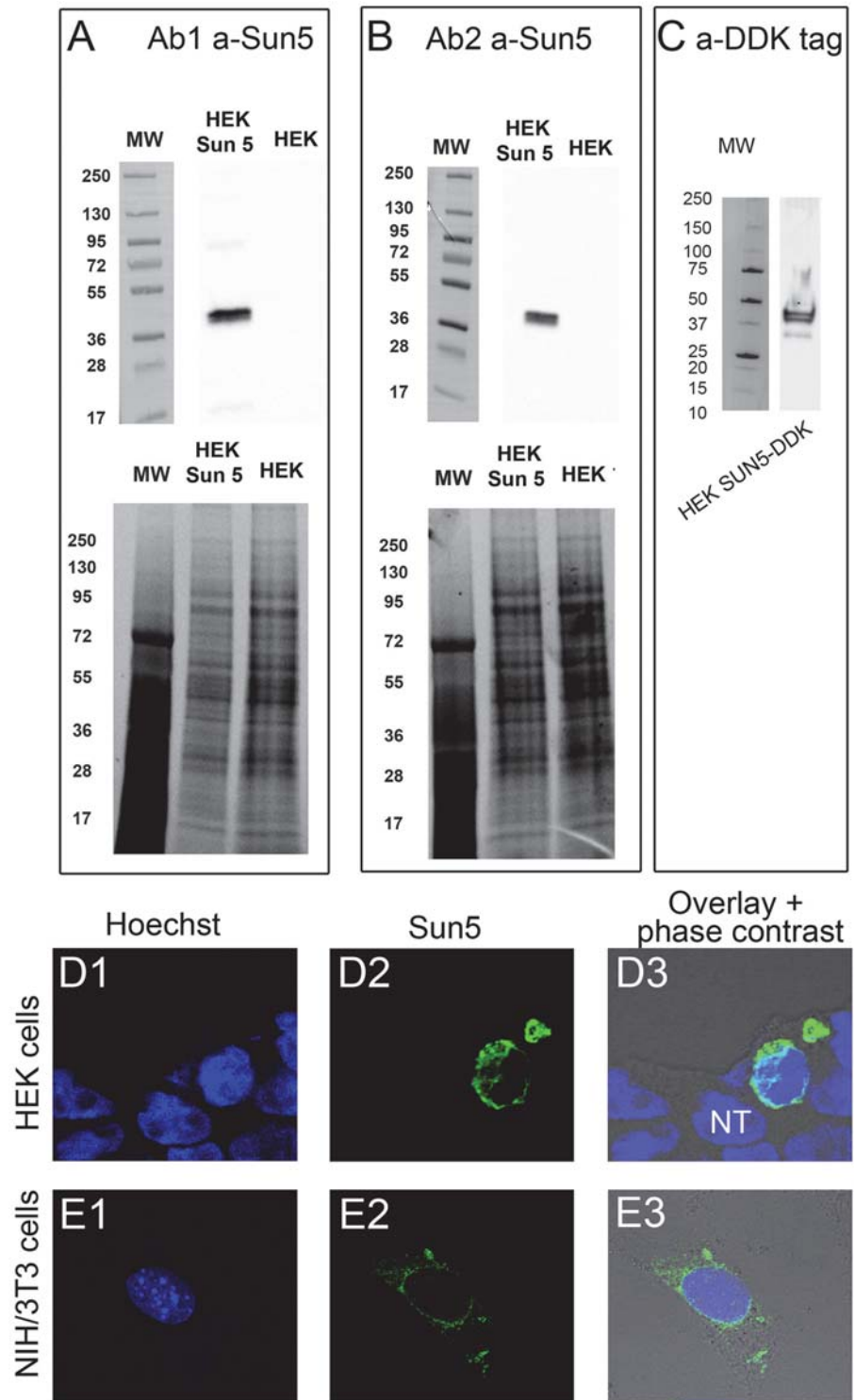
Globozoospermia is a rare genetic disorder characterized by the absence of the acrosome in sperm head. It constitutes an interesting model to study acrosome biogenesis and to identify the different molecular actors involved in sperm head formation. We recently showed that the deletion or mutations of *DPY19L2* are responsible for 70% of human type I globozoospermia [3,4] and that the corresponding protein plays a crucial role in stabilizing the attachment of the acrosome during acrosome stretching associated with spermatid elongation [5]. This result strongly suggests that other proteins are involved in the initial binding of acroplaxome on the nuclear envelope. LINC proteins (LInkers of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton), composed of Sun proteins on the inner nuclear membrane (INM) and Kash on the outer nuclear membrane (ONM), are particularly interesting candidates since their function is to position the nucleus within the cell via cytoskeletal interactions but also to tether centrosome and chromosomes to the nuclear envelope [6,7]. The LINC proteins located in the INM are called Sun proteins (Sad1/UNC-84 homology) and those located in the ONM, Kash proteins (Klarsicht, Anc-1, and Syne/nesprin Homology). In Mammals, there are five different Sun proteins, Sun1, Sun2, Sun3 (also called SunC1), Sun4 (also called Spag4) and Sun5 (also called Spag4l). The N-terminus of the Sun proteins is located in the nucleoplasm and interacts with different proteins of the nucleoskeleton; the C-terminus, located in the lumen of the NE, interacts with C-terminus of the Kash protein and the N-terminus of the Kash protein interacts with different proteins of the cytoskeleton. The formation of these complexes thus allows a direct mechanical coupling between proteins located inside the nucleus, such as lamins A,C (but not with lamin B) to proteins located in the cytoplasm such as actin, plectin or dyneins.

Sun1 and Sun2 are ubiquitously expressed [7]. Sun4 shows a low expression level in many tissues except in the lymph node and in the testis where it is expressed at a higher level [8]. Sun3 and Sun5 expression is restricted to the testis. All five Sun proteins are thus expressed in the testis. Interestingly, the Sun proteins present a remarkable differential localization in the spermatid. During spermiogenesis, Sun1 localization is restricted to the posterior part of the spermatid where it interacts with Syne3 Kash protein. Sun1 is however excluded from the implantation fossa, the articulation which serves to attach the neck (and the rest of the flagella) to the head. Sun3 is absent from the posterior and anterior poles of the elongating spermatid and colocalizes with the microtubules of the manchette along the lateral NE and interacts with the Syne1 Kash protein [9]. Concerning Sun4, the protein is located in the manchette area during spermiogenesis and in the flagellum in mature sperm cell [8]. Its function in NE is however not described in mammals so far. Interestingly, the ortholog of Sun4 in *Drosophila* is required for correct positioning of the centriole during spermatogenesis. This result strongly suggests a specific role of Sun4 protein during spermatogenesis [10]. Finally, Sun5 is expressed during spermiogenesis. It is described to present five alternative transcripts but their differential expression pattern has not been investigated. Contradictory results were published regarding Sun5 expression and localization. A first report has shown that Spag4l (alias of Sun5) and

Spag4l-2 (a longer isoform of the same gene) are expressed after the meiosis and are located in the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome [11] whereas a second study reported an early and strong expression during meiosis [12]. Sun5 could therefore be one of the missing link between the nuclear envelope and the acroplaxome and may, with Dpy19l2, participate to the anchoring of the acroplaxome to the NE. The characterization of these missing links is particularly important in the context of type I globozoospermia, since around 30% of cases are still unexplained. To address this question, we re-evaluated the localization of Sun5 during spermatogenesis. In this paper, we first demonstrate that Sun5 is present at the pachytene stage within the cytoplasm and migrates to the NE at the round spermatid stage. We demonstrate however that, contrary to previously published work [11], Sun5 is not located in the NE facing the acrosome. Moreover, we show that in Dpy19l2 knock-out round spermatids, the detachment of the acrosome leads to Sun5 and lamin B1 relocalization, confirming that Sun5 protein is excluded from the NE facing the acrosome. We therefore show that Sun5 cannot be a functional partner of Dpy19l2, strongly suggesting that Sun5 is not involved in acrosome attachment. In round and elongated spermatids, Sun5 presents a localization that is partly similar to Sun1 and 3. In epididymal sperm, it moves to the junction area between the tail and the sperm head. Finally, we show that Sun5 transits through the Golgi apparatus, leading to post-translational modifications, as witnessed by the appearance of a glycosidase-sensitive band in Western-blot experiments.

## Results

In order to study the potential role of Sun5 during spermatogenesis, we first characterized two different antibodies targeting different epitopes, one from a commercial company (Ab1) and one laboratory designed (Ab2). HEK cells were first transfected with the Sun5 plasmid (mouse Spa4l, short isoform). Gels of proteins, revealed separately with both antibodies, presented the same profile of bands in Western blotting experiments: two close bands were immunodecorated, with an approximate molecular weight of 40 KDa (Fig. 1AB). These two bands are also clearly evidenced with protein extracts from HEK cells, transfected with a plasmid containing the human SUN5, tagged with DDK tag and revealed with anti-DDK antibody (Fig. 1C). DDK is a low molecular weight tag (DYKDDDDK (1012 Da), known to not interfere with protein function (expected MW of Sun5-DDK is 40.5 KDa). In contrast, blots from non transfected HEK cells showed no bands (not shown), demonstrating the high specificity of these three antibodies. Both Ab1 and Ab2 antibodies were then tested in IHC experiments and signals were observed by confocal microscopy. Ab1 marked strongly the nuclear envelope in both HEK and NIH/3T3 cells transfected with Sun5 plasmid, as expected for a protein belonging to the Sun family (Fig. 1DE). We observed in NIH/3T3 cells a fluorescent signal around the nucleus but also in the cytoplasm (Fig. 1E2-E3). This latter result suggests that Sun5 may be located in the reticulum or traffic through other membrane compartments (Golgi apparatus, ERGIC, ...). Remarkably, the non transfected cells (NT) presented no fluorescence, either around the nucleus or in the cytoplasm (Fig. 1D3). We also performed IHC control experiments on non transfected HEK cells, and similarly no staining was observed (not shown). Finally, Ab2 didn't work in IHC. Altogether, these results demonstrate that our antibodies present a high specificity in WB and that Ab1 is a valuable tool to study Sun5 protein localization in spermatogenic cells by IHC. Then, we studied the expression and localization of Sun5 in different dissociated spermatogenic cells, from the pachytene stage to mature sperm cells. We first analyzed the presence of Sun5 in pachytene spermatocyte by IHC experiments: at this stage a punctiform staining was observed only within the cytoplasm (Fig. 2A, see also S2 Fig.). It is worth noting that no staining was observed in control experiments performed on different spermatogenic cells with



**Fig 1. Specificity of antibodies targeting Sun5.** (A) Western blot of protein extracts from HEK cells heterologously expressed with or without plasmid containing mouse short isoform of Sun5 and revealed with anti-Sun5 antibodies 1 (Ab1). Below, gel of protein showing that both lanes were similarly loaded. (B) Similar experiment but revealed with anti-Sun5 antibodies 2 (Ab2). (C) Western blot of protein extracts from HEK cells heterologously expressed with a plasmid containing human short isoform of SUN5-DDK tagged and

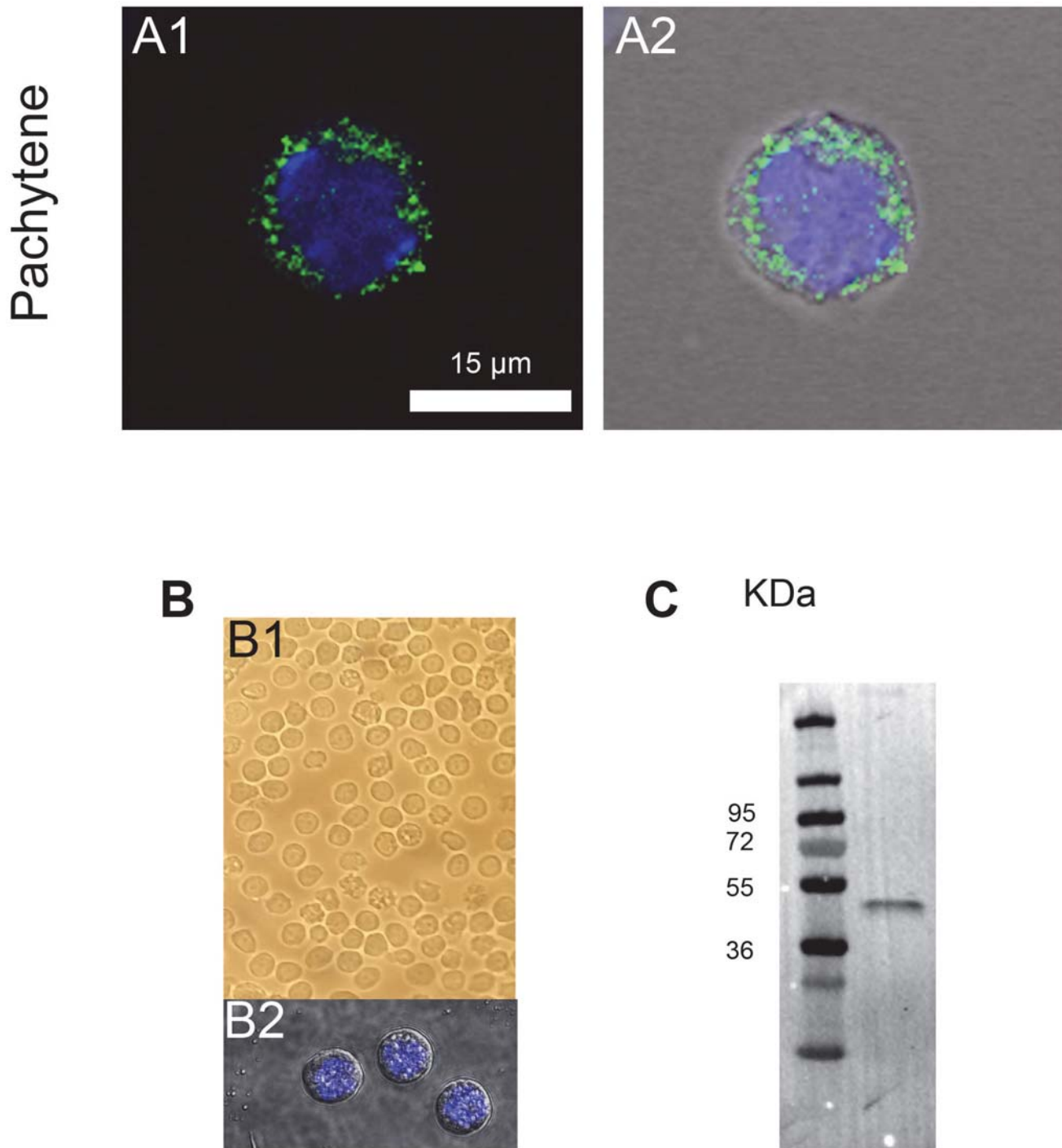


revealed with anti-DDK antibodies. **(D)** HEK cells were transfected with mouse short isoform of Sun5 and stained with Hoechst (blue, D1) and anti-Sun5 Ab1 (D2, green). D3 corresponds to overlay + phase contrast. **(E)** Similar experiment performed with NIH/3T3 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g001

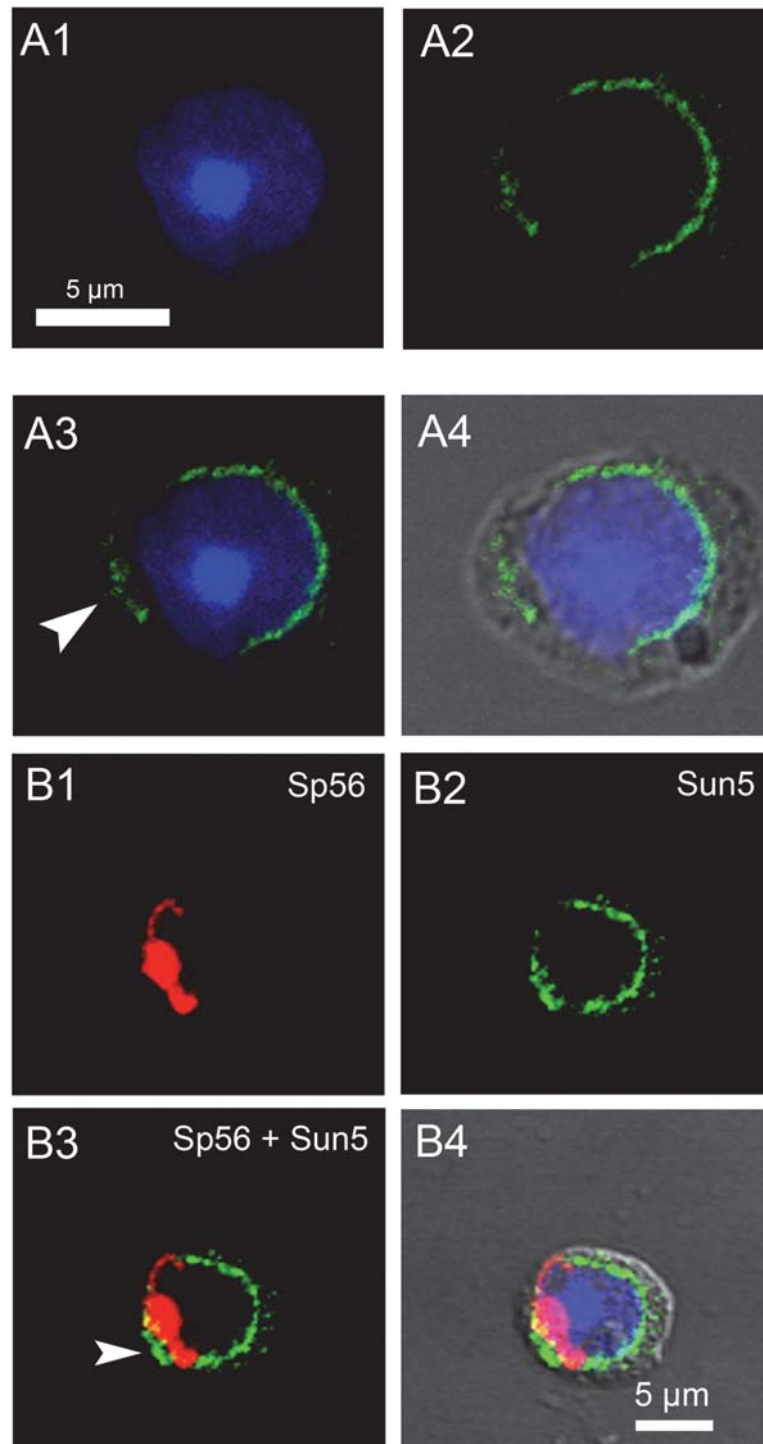
only the secondary Ab ([S1 Fig.](#)). This staining is coherent with that obtained in NIH/3T3 cells and strongly suggests that Sun5 is not located in the nuclear envelope but rather within the cytoplasm at this stage. In order to validate the cytoplasmic Sun5 staining, cytoplasmic proteins extracted from dounce homogenized pachytene spermatocytes were subjected to SDS page and revealed with Sun5 Ab2 (n = 4). Protein extracts were prepared from pachytene spermatocytes purified by unit gravity sedimentation from spermatogenic cell suspension and obtained from sexually mature males. The purity of the fraction was assessed by counting the cells exhibiting characteristic Hoechst nuclear staining under a fluorescent microscope ([Fig. 2B](#)) and we estimated that 95% of the cells were indeed pachytene spermatocytes. Ab2 immunodecorated a single band at 40 KDa, the expected MW of Sun5 ([Fig. 2C](#)). To better characterize the localization of Sun5 within the cytoplasm, a co-localization experiment of Sun5 with a reticulum marker (KDEL antibodies) was performed. Clearly, most of the Sun5 staining did not co-localize with the KDEL staining at the pachytene stage ([S2 Fig.](#)), indicating that Sun5 is located in another membranous compartment.

The progression of meiosis to the round spermatid stage led to an important relocalization of Sun5 from the cytoplasm to the nuclear envelope ([Fig. 3A](#)), as witnessed by Sun5 staining which exhibited an incomplete ring shape at the nuclear periphery ([Fig. 3A](#)). More than 90% of round spermatids presented a discontinuous staining on the NE. In order to better characterize this incomplete ring, we performed a co-staining with anti-Sp56 antibodies, a marker of the acrosomal vesicle [13]. In fact, most of the NE facing the acrosome was not marked by anti-Sun5 antibodies ([Fig. 3B](#), see also panels A-D of [S3 Fig.](#)), and acrosome binding clearly seems to exclude Sun5 from the NE facing the acrosome. Moreover, part of the signal was not attached to the nuclear membrane and was located at a short distance from it (see head arrows, [Fig. 3A3](#)), an unexpected observation for a Sun proteins normally located in the INM [14]. In overlay with phase contrast, this signal was clearly located in the cytoplasm ([Fig. 3A4](#)). When cells were co-stained with Sun5 and Sp56 Abs, this peculiar Sun5 staining, unbound to the nuclear envelope, was always located in the vicinity of the acrosome ([Fig. 3B3](#), arrow head). Additional examples of the presence of NE-unbound Sun5 staining are showed in panels A3,B3,E3 of [S3 Fig.](#) (white and yellow arrow heads). Superimposition of Sun5 and Sp56 NE-unbound staining evidenced that Sun5 staining was always located more externally than the Sp56 acrosomal staining ([Fig. 3B3](#), white arrow head, see also panel E of [S3 Fig.](#), yellow arrow head). This remark is important because we have previously shown that the staining of Dpy19L2, a protein of the nuclear membrane involved in acrosome anchoring, was always more internally located than the staining of the acrosome in experiments performed similarly [5]. The fact that Sun5 staining is located more externally than Sp56 staining suggests that this peculiar Sun5 staining did not correspond to the NE facing the acrosome nor to the acrosome itself. This localization is compatible with the Golgi apparatus, which is located in front of the acrosome. We tested this hypothesis by performing co-staining experiments with Anti-Sun5 and anti-GM130 Abs, a marker of the Cis-Golgi. We observed a strong co-localization of GM130 and the NE-unbound Sun5 staining, demonstrating that Sun5 is targeted to the Cis-Golgi ([Fig. 4A1–4](#)). Other examples of representative co-localization of NE-unbound Sun5 staining and GM130 in round spermatids are presented in [S4 Fig.](#) This co-localization was observed in almost all round spermatids presenting a NE-unbound Sun5 staining. In the Golgi apparatus, numerous proteins are modified by the addition of carbohydrates (glycosylation) or phosphates



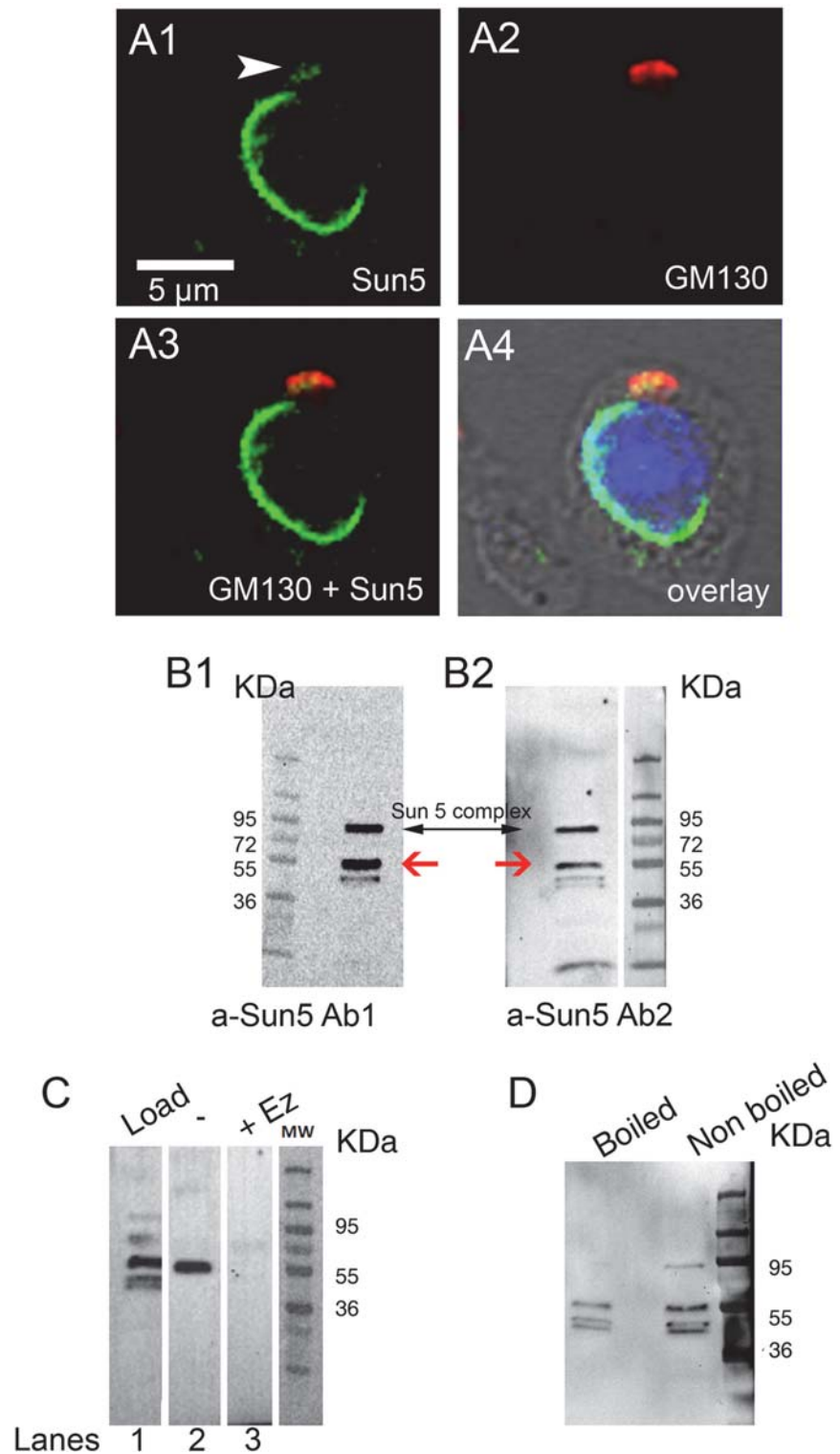
**Fig 2. Sun5 is located in the cytoplasm in pachytene spermatocyte.** (A) Pachytene spermatocyte co-stained with Hoechst (blue) and anti-Sun5 Ab1 (green) (A1). A2 corresponds to overlay + phase contrast. (B) Pachytene spermatocytes were purified by unit gravity sedimentation from spermatogenic cell suspension obtained from sexually mature males. The purity of the fraction (B1, observed with optical microscope), was assessed by counting the cells exhibiting characteristic Hoechst nuclear staining under a fluorescent microscope (B2). (C) Western blot of cytoplasmic proteins extracted from the pachytene spermatocytes showing that Anti-Sun5 Ab immunodecorates a single band around 40 KDa.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g002



**Fig 3. Sun5 is located in the nuclear envelope (NE) in round spermatid and is excluded from the NE facing the acrosome.** (A) Round spermatid stained with anti-Sun5 Ab1 (A2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (A1, blue). A3 corresponds to overlay of A1 and A2; Arrow head indicates the Sun5 staining which was not bound to the NE. A4 corresponds to overlay with phase contrast. (B) Round spermatid co-stained with anti-Sp56 (B1, red) and anti-Sun5 Ab1 (B2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). B3 corresponds to overlay of B1 and B2; arrow head indicates the Sun5 staining which was not bound to the NE. Note that Sun5 staining is located in a more external location than Sp56 staining. B4 corresponds to overlay with phase contrast.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g003



**Fig 4. Sun 5 progresses through the Golgi apparatus and presents post-translational modifications during spermiogenesis.** (A) Round spermatid co-stained with anti-Sun5 Ab1 (A1, green) and anti-GM130 antibodies a marker of the Cis-Golgi (A2, red) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). A3 corresponds to overlay. A4 corresponds to overlay with phase contrast (B) Western blots of

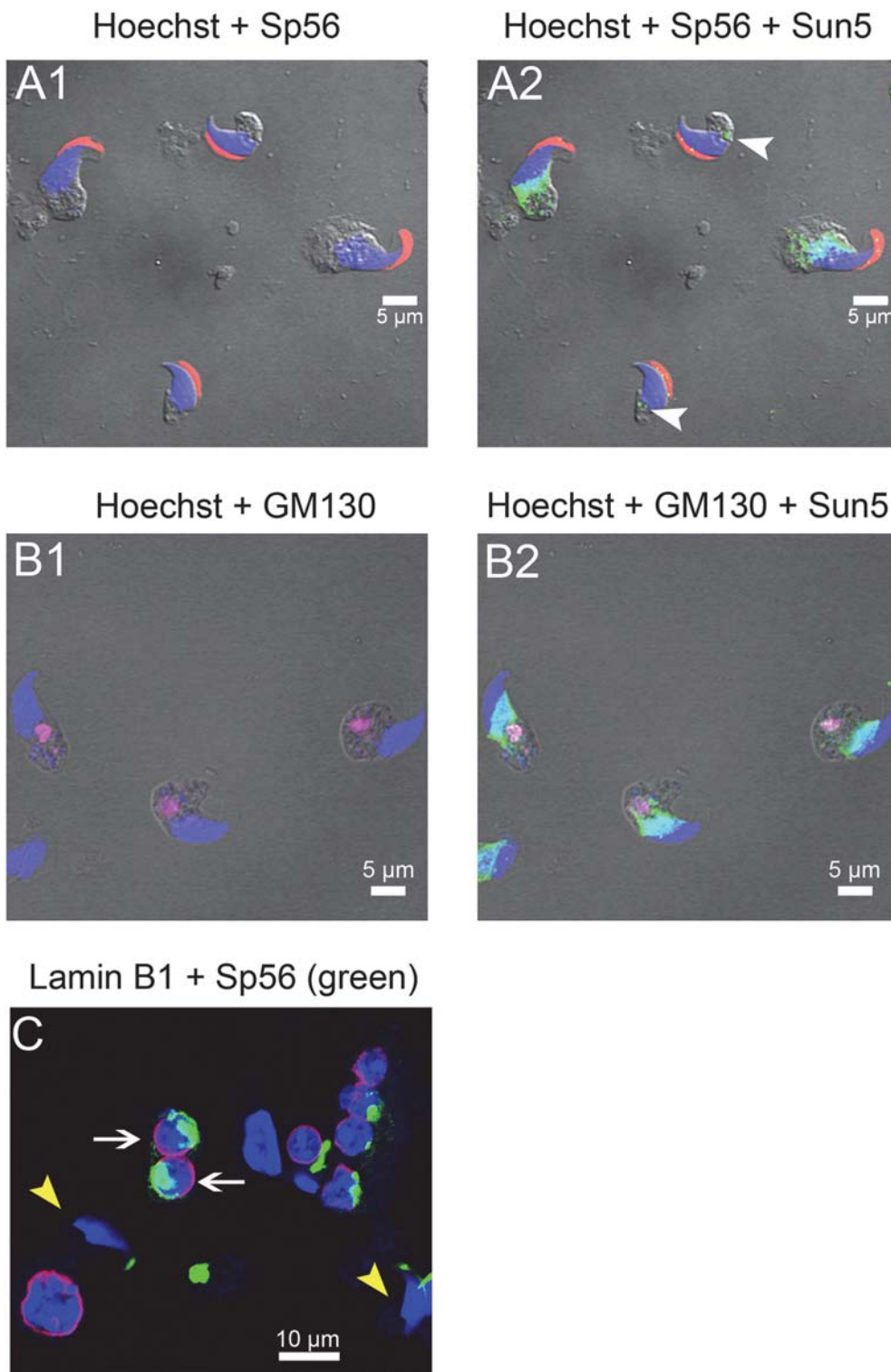
nuclear protein extracts from testis revealed with anti-Sun5 Ab1 (B1, left) and anti-Sun5 Ab2 (B2, right), showing a similar pattern evidenced by both antibodies. (C) Protein extracts (load, lane 1) were incubated 15 hours without (-, lane 2) or with a deglycosylation enzyme mix (+ Ez, lane 3) and the impact on Sun5 was studied in Western blot with Ab2 antibodies. (D) Protein extract was split in two identical fractions, and one fraction was boiled. The band at 95 KDa observed with Sun5 antibodies in Fig. 4B was no longer present when denaturation conditions were strengthened by boiling the sample in Laemmli buffer. Protein loads controlled with TGX stain free precast gels are showed in panel C of S5 Fig.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g004

(phosphorylation). The presence of Sun5 in the Cis-Golgi therefore suggests that Sun5 could be subjected to such post-translational modifications. This is in agreement with the presence of the two close bands observed when the Sun5 plasmid was transfected in HEK cells (Fig. 1AB). To address a possible glycosylation of Sun5 during its transit through the Golgi apparatus, nuclear protein extracts from spermatogenic cells were subjected to SDS page followed by Western blot analysis. Interestingly, in these extracts, we confirmed the presence of a doublet around 40 kDa but we also evidenced a new band around 55 kDa, immunodecorated by both antibodies (Fig. 4B, red arrows). The fact, that both antibodies immunodecorated the same band, demonstrates that the signal is likely specific and shows that Sun5 is strongly modified during its transit through the Golgi apparatus. Numerous N and O glycosylation sites are predicted to be present on the protein and the band at 55 KDa could correspond to a glycosylated protein. To address this question, we incubated testis extracts during 15 hours at 37°C with a mix of deglycosylation enzymes. First we controlled that our protocol was able to remove glycosyl residues by using bovine fetuin as a glycosylated control protein (panel A of S5 Fig.). Contrary to testis extracts incubated without enzymes (Fig. 4C, lane 2), the band at 55 KDa was no longer observable after deglycosylation treatment (Fig. 4C, Lanes 3), confirming that the band at 55 KDa corresponds to a post-translationally modified Sun5. Unexpectedly, the process of incubation by itself (i.e. without enzymes), modified the Sun5 signal: the doublet at 40 KDa was no longer observable (Fig. 4C, Lanes 1 versus 2), suggesting that Sun5 is highly sensitive to degradation when it is deglycosylated. Protein loads before (lane 1) and after treatment (lanes 2 and 3) were controlled with TGX stain free precast gels and no dramatic differences were observed (Panel B of S5 Fig.). Moreover, a band around 95 KDa was also observed (Fig. 4B, black arrow) which likely corresponds to a protein complex containing Sun5 because this band was no longer present when the reducing conditions were increased by boiling the sample before gel loading (Fig. 4D). Protein loads, controlled with TGX stain free precast gels, shows that similar amount of protein were loaded (panel C of S5 Fig.).

During spermiogenesis, and particularly during spermatid elongation, Sun5 was moved back along an antero-posterior axis (Fig. 5AB). This movement seems to occur earlier at the border of the acrosomal cap than on the opposite side of the spermatid. Again, no Sun5 staining was observed in front of the acrosome (Fig. 5AB). At this stage, Sun5 was no longer co-localized with the Cis-Golgi, suggesting that most Sun5 proteins had joined their final target in the nuclear envelope (Fig. 5B). It was reported that Sun1 protein interacts with lamin A [15] and interestingly we show that Sun5 presented a similar localization to lamin B1 in the round spermatids, that is, close to the NE, except in front of the acrosomal vesicle (Fig. 5C, white arrows). This may suggest that Sun5 is a potential partner of lamin B1. Lamin B1 is however quickly removed at the end of the round spermatid stage and no fluorescent signal was observed in early condensing spermatids (Fig. 5C, yellow arrow heads). This result thus demonstrates that Sun5 movement during late spermiogenesis is not dependent of lamin B1.

Finally, we investigated the presence of Sun5 in mature epididymal sperm. Due to the great compaction of the sperm nucleus and the structures of the peri-nuclear theca, the staining of the NE may be difficult. Sperm nuclei were thus decondensed with 10 mM DTT. We have



**Fig 5. Sun5 is removed during spermiogenesis along an antero-caudal axis. (A)** In early condensing spermatids, Sun5 is located at the base of the nucleus. Elongating spermatids co-stained with anti-Sp56 antibodies (A1, red) and anti-Sun5 Ab1 (A2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). Arrow heads show specific Sun5 staining at the implantation fossa in late condensing spermatids. **(B)** In early condensing spermatids, Sun5 is no longer present in Golgi apparatus. Elongating spermatids co-stained with anti-GM130 antibodies (B1, purple) and anti-Sun5 Ab1 (B2, green) and

counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). **(C)** In round spermatids (white arrows), Lamin B1 (purple) is not located in front of the acrosomal vesicle (evidenced by anti-Sp56 antibodies green), showing that lamin B1 and Sun5 were both excluded from the acrosomal area. In early condensing spermatids (yellow arrow heads), Lamin B1 (purple) is absent. Cells were counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue).

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g005

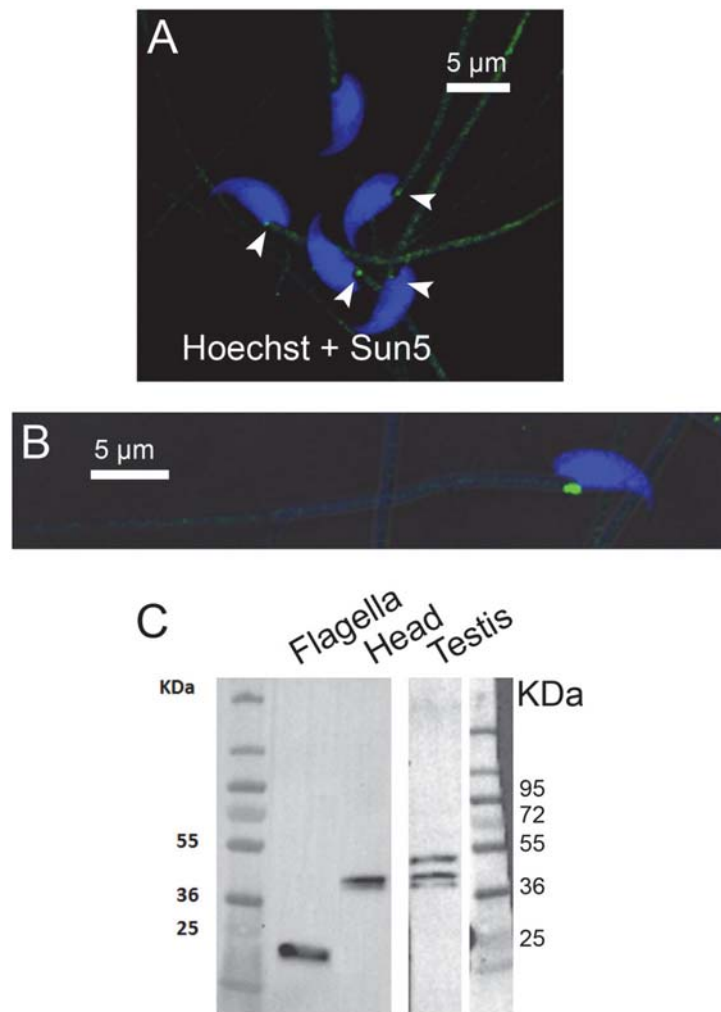
previously shown that this method allows evidencing protamine, a protein deeply embedded in the nucleus [16]. In the epididymal sperm, Sun5 was observed in front of the sperm implantation fossa (Fig. 6AB, white arrow heads). This specific pattern of localization was already observable in late condensing spermatids (Fig. 5A2, white arrow heads). It is worth noting that a similar staining was observed on sperm not treated with DTT, and thus does not correspond to an artifact induced by DTT treatment. A faint staining was also observed in the flagellum of mature epididymal sperm (Fig. 6AB). In order to validate both staining, we compared the band patterns obtained by Western blotting of heads and flagella fractions (Fig. 6C). The heads and flagella fractions were obtained by mild sonication. In the flagella fraction, the Sun5 antibodies immunodecorated a band at 25 kDa only, suggesting that flagellum staining was not specific because Sun5 MW is around 40 kDa.

All the data presented above show that Sun5 is produced early during the meiosis and traffics through the Golgi apparatus before reaching the NE of the round spermatid. The localization of Sun5 is highly controlled since it is excluded from the NE facing the acrosome. To get better insights in the mechanism allowing its exclusion from this specific area, we measured Sun5 localization in spermatogenic cells from *Dpy19l2* KO males; *Dpy19l2* is a transmembrane protein of the INM and its absence leads to acrosome detachment and reorganization of proteins of the NE [5]. The absence of *Dpy19l2* led to a striking relocalization of Sun5 towards the nuclear envelope area previously involved in acrosomal vesicle attachment, as witnessed by the full ring shape of Sun5 staining around the nucleus (Fig. 7AB). This relocalization, which is concomitant with acrosome vesicle detachment, confirms that Sun5 is excluded from the acrosomal vesicle attachment area. At later stages, the absence of *Dpy19l2* did not modify the movement of Sun5 along the antero-posterior axis (Fig. 7C) and the vanishing of the protein in late condensing spermatids (Fig. 7D). In epididymal sperm from *Dpy19l2* KO males, the specific staining in the implantation fossa was lost in most of sperm and the flagellum staining was similar to that observed in WT flagellum (Fig. 7E) and is thus likely to be unspecific as well. Finally, a recent report showed that *Dpy19*, the ortholog of *Dpy19l2* in *C. elegans*, is a C-mannosyltransferase [17]. Sun5, as a nuclear envelope protein may be glycosylated by *Dpy19l2*. To test this hypothesis, we observed the pattern of Sun5 bands in WB of a nuclear extract from *Dpy19l2* KO testis. The absence of *Dpy19l2* did not modify the pattern of post-translational modifications (Fig. 7F), both the doublet at 40 KDa and the band at 55 KDa were observed. This result suggests that *Dpy19l2* is not involved in the glycosylation process of Sun5.

## Discussion

During spermiogenesis, the spermatid nucleus is deeply modified. The intervening modifications involve changes in DNA packaging, nuclear shape and a reorganization of the NE structure. However, the function of the integral membrane proteins of the NE and in particular of Sun proteins during spermatid elongation remains poorly understood and deserve to be investigated. As indicated in the introduction, all Sun proteins are present in spermatogenic cells and their expression and localization are strongly controlled. However, their distinct roles in spermiogenesis remain to be unraveled [9,18].

Herein, we focused our work on Sun5 localization during spermatogenesis. We showed that Sun5 shares common properties with other Sun proteins. First, as described for Sun1 and Sun3, Sun5 is located in the NE of the round spermatids. Moreover, we demonstrated that like

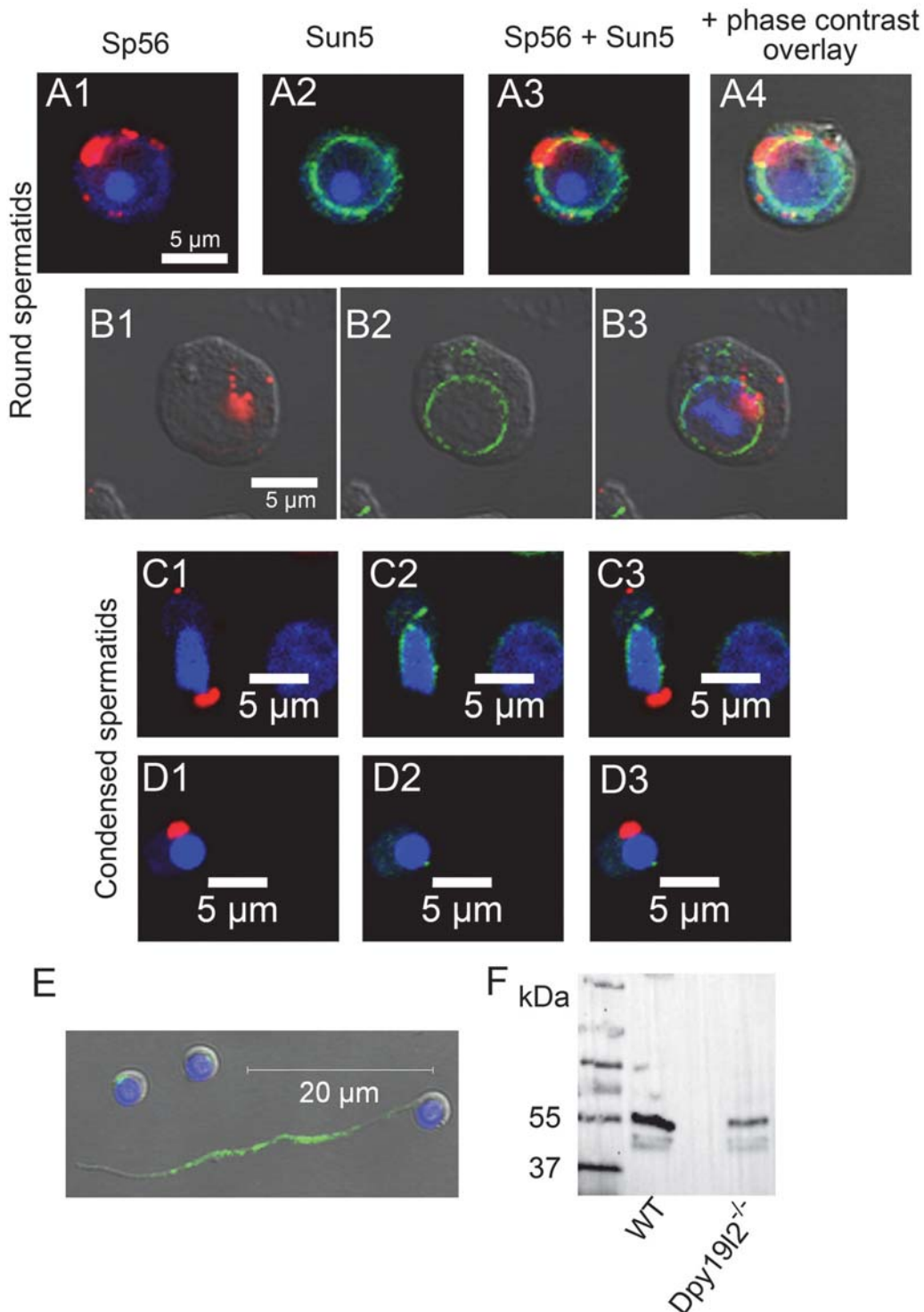


**Fig 6. Epididymal sperm presents a punctiform staining at the implantation fossa. (A, B)** Sun5 staining is located at the implantation fossa in epididymal sperm (arrow heads). **(C)** Sperm were fractionated by mild sonication allowing separating head and flagella fractions and resolved proteins by SDS PAGE of both fractions were subjected to Western blotting analysis with Ab2 Sun5 antibody. As control, testis nuclear protein extracts were subjected to Western blotting analysis in the same trial.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g006

the other Sun proteins studied in spermatogenic cells so far [9], Sun5 is excluded from the region facing the acrosomal vesicle. Sun proteins thus share common structural properties allowing their positioning into the NE and their exclusion from the acrosomal vesicle area. The molecular determinants of Sun exclusion from the acrosomal vesicle area have not yet been characterized. Furthermore, we showed that the detachment of the acrosomal vesicle due to the absence of Dpy19l2 led to an important relocalization of Sun5. In a previous report we showed that acrosome detachment leads to the vanishing of a specific nucleoplasmic structure called the nuclear dense lamina which does not contain any lamin [5]. This structure could be involved in Sun exclusion and would deserve further studies. Sun3 and Sun1 present a complementary localization in round spermatids: Sun1 is located at the posterior pole and Sun3 at an intermediate location between the anterior and the posterior poles [9]. The molecular cause of such mutual exclusion is not understood so far. In comparison, we showed that the area of





**Fig 7. Detachment of the acrosome in spermatids from *Dpy19l2* KO males leads to a relocalization of Sun5.** (A, B) Round spermatids co-stained with anti-Sp56 antibodies (A1, B1, red) and anti-Sun5 Ab1 (A2, B2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). A3 corresponds to overlay and A4 and B3 correspond to overlay + phase contrast. (C) Sun5 removal during spermiogenesis along the antero-caudal axis is not modified in *Dpy19l2* KO condensed spermatids. Elongating *Dpy19l2* KO spermatids co-stained with anti-Sp56 antibody (C1, red) and anti-Sun5 Ab1 (C2, green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue); C3 overlay. (D) Similar stainings in fully condensed spermatids showing the almost complete vanishing of Sun5. (E) Absence of Sun5 staining in *Dpy19l2* KO sperm head. (F) Western blot of nuclear protein extracts from WT and *Dpy19l2* KO testis revealed with anti-Sun5 Ab1. The absence of *Dpy19l2* did not modify Sun5 glycosylation pattern.

doi:10.1371/journal.pone.0118698.g007

Sun5 localization is unique and encompasses Sun1 and Sun3 localizations. Moreover, Sun5 presents some specific features in comparison to other Sun proteins. First, epididymal sperm present a staining in the implantation fossa, a localization where Sun1 is absent [9]. As a nuclear envelope protein, the location of Sun5 in this peculiar area is coherent with the presence of a redundant nuclear envelope at the base of the sperm head as showed in bull and mouse [19]. Although epididymal sperm exhibit compact structures, it is worth noting that Sun5 staining in sperm were performed in conditions allowing us to evidence other proteins (like protamines) located deeper in the nucleus [16], and the presence of Sun5 in other locations is unlikely. Concerning Sun5 staining in the flagellum of mature epididymal sperm, the anti-Sun5 Ab1 antibodies immunodecorated the flagellum in both WT and *Dpy19l2* KO mature sperm. However, we observed no bands at 40 or 55 KDa in Western blot carried out with the flagella fraction. On the other hand a band at 25 KDa was observed. This band is likely to be non-specific because the smallest alternative transcript identified (XP\_006500438), which code for proteins with a molecular weight of 29 KDa does not contains the TLPEDTTTHSGRPRRGVQRSY sequence found on the main transcript and which was used for antibody design. It is important to notice that this 25 KDa band was not observed in Western blots performed from whole testis proteins because there are relatively few mature sperms in the testes compared to other cell types and the blots were carried out on enriched nuclear proteins.

In this report, we also showed that Sun5 is clearly present in the cytoplasm at the pachytene stage in an uncharacterized membranous compartment. It is worth noting that at this stage, Western blotting experiment evidenced only one band around 40 KDa, a result coherent with its transit through the Golgi apparatus at the round spermatid stage. This uncharacterized membranous compartment may correspond to the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment (ERGIC) because it has been shown that integral proteins of the NE including emerlin, another protein of the INM, transit through the ERGIC before retrograde transport to the nuclear envelope [20]. Such a location was already suggested for Sun1 [21]. The transit of Sun5 through the Golgi is associated with deep post-translational modifications. In HEK cells and spermatogenic cells, three different antibodies immunodecorated two close bands around 40 kDa. Two of these antibodies target different parts of the mouse Sun5 protein and one the DDK-tag of the human Sun5-DDK protein. It is thus very unlikely that these bands correspond to a non-specific staining, but rather correspond to post-translational modifications. Interestingly, Sun2 is heavily phosphorylated in HeLa cells treated with phosphatase inhibitors [22]. Moreover, in spermatogenic cells, a new band at 55 kDa was immunodecorated. Again this band was revealed by two different primary antibodies revealed by two different secondary HRP antibodies (rabbit versus rat) and unlikely correspond to an unspecific marking. Moreover, the expression of Sun5 has been extensively studied and 5 splice variants have been identified. The main transcript (NM\_029599.1) codes for a 348 amino acids (aa) protein (NP\_083875.1) with an estimated molecular weight of 39 805 Da. Four alternative transcripts have been identified which code for proteins ranging from 259 to 382 aa with molecular weight ranging from 29545 to 43069 Da (XP\_006500438, XP\_006500436.1, XP\_006500437.1, XP\_006500435.1). It is extremely unlikely that a larger transcript exists. Finally this band was no longer observable after a treatment with deglycosylation enzymes. Altogether these data show that Sun5 is post-translationally modified. To our knowledge, it is the first description of glycosyl modifications of a Sun protein. The fact that Sun5 is post-translationally modified is confirmed by the fact that numerous putative glycosylation sites are predicted using programs detecting post-translational modifications ([http://www.expasy.org/proteomics/post-translational\\_modification](http://www.expasy.org/proteomics/post-translational_modification)). Although the cellular function associated with this glycosylation is currently unknown, it is important to notice that glycosylation of nuclear envelope membrane proteins including nucleoporins is

important for the functional integrity of the nuclear envelope [23]. Interestingly, antibodies also evidenced a band around 95 KDa, which was no longer observable when reducing conditions were increased. This band likely corresponds to a complex containing Sun5. Because the MW of the complex is close to the MW of the Sun 5 dimer and because it has clearly been shown that Sun proteins are associated in oligomers [24], this band likely corresponds to a Sun5 dimer. Remnants of dimers or trimers in WB is very usual for oligomers in weak reducing conditions (without boiling), especially when proteins are difficult to solubilize (it is the case for Sun5, as showed previously [11]). Such a band was also observed in WB performed with extracts from HEK cells transfected with Sun5-DDK plasmid and revealed with a third primary antibody (anti-DDK) and a different secondary antibody (anti mouse HRP). Because Sun proteins have been described to mainly function as trimers [22], the observed dimers may therefore correspond to a partial Sun5 trimer dissociation during protein solubilization. This suggests that Sun5, like other Sun proteins, might also be associated in trimers. The fact that no trimers were observed could be due to a low solubility of the trimeric structure.

The results presented above are clearly different from what was described in previous reports showing that Sun5 is mainly expressed during meiosis in the reticulum [12] and that Sun5 is located in the NE facing the acrosome and is not post-translationally modified [11]. The main difference between our experiments and previous reports was the use of different antibodies. We did test the commercially available antibody used in the previous reports [11] and, despite numerous trials with different conditions, we were unable to reproduce the previously published data. The results presented herein have been obtained using three different antibodies, one of which was new. Their specificity was challenged using two different plasmids containing either mouse Sun5 or human SUN5 DNA sequences in both IHC and Western blot experiments. In IHC, a coherent staining was observed as a ring surrounding the nucleus. A similar staining had already been described with an anti DDK antibody when cells were transfected with Sun5-DDK [5]. We never observed any staining in non transfected cells. The results obtained with different antibodies combinations were highly concordant and altogether, these control experiments brought a high level of confidence in our data.

So far, the interactions between the organelles and the nucleus have always been dependent on the formation of LINC complexes due to the binding of Sun and Kash domain proteins. Herein, we demonstrated by IHC that Sun5 is undetectable in the NE facing the acrosome and thus that the attachment of the acroplaxome on the nucleus does not likely depend on the formation of a LINC complexes involving Sun5. Moreover, several publications on the localization of other Sun proteins in spermatogenic cells, shows that they are also absent from the NE facing the acrosome [8,9,18]. Altogether, these results suggest that the attachment of the acroplaxome on the NE does not likely depend on Sun proteins and seems thus unique. In conclusion, the only protein described so far to be involved in acrosomal attachment remains Dpy19l2. The molecular partners of Dpy19l2 located in the nucleoplasm and in the ONM remain to be characterized. Finally, this data will avoid inverse genetic studies focusing on this protein in the framework of globozoospermia.

## Material and Methods

### Ethics Statement

All animal procedures were run according to the French guidelines on the use of animals in scientific investigations with the approval of the local Ethical Committee, (Grenoble-Institut des Neurosciences—ethical committee, Study agreement number 004). Mice were killed by cervical dislocation.

## Animals

*Dpy19l2*<sup>-/-</sup> mice were obtained from Mutant Mouse Regional Resource Center, University of California, Davis, CA. Although gene knock-out had been checked by PCR/Southern ([http://mmrrc.mousebiology.org/doc/di\\_032274PCR\\_Protocol.pdf](http://mmrrc.mousebiology.org/doc/di_032274PCR_Protocol.pdf)), we confirmed by RT-PCR that *Dpy19l2* transcripts were absent [5].

## Cell Culture and transfection

HEK-293 and NIH/3T3 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% FBS (Invitrogen, France) and transiently transfected either with human orthologs Cter-DDK-tagged Sun5 or mouse Sun5 containing pCMV6 plasmids (from Origene, Rockville, MD, US), using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Two days after transfection, transfected cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) before immunochemistry experiments.

## Testicular Cell dissociation

C57BL6 male or *Dpy19l2* KO mice (8 weeks old) were killed by cervical dislocation. The testes were surgically removed and placed in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature. The tunica albuginea was removed from the testes with sterile forceps and discarded. Then, the testes were incubated in 3 ml of a solution containing 1 mg/ml collagenase and 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 12.1 mM Glucose, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Na-Lactate, 150 mM NaCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub> pH = 7) and agitated horizontally at a maximum of 120 rpm for 30 min at 25°C. The dispersed seminiferous tubules were then washed with PBS and cut thinly. Cells were dissociated by gently pipetting, filtered through a 70 μm filter and then pelleted by centrifugation at 500 g for 10 minutes. Cells were suspended in 1 ml PBS and fixed with 4% PFA solution, washed with PBS and finally layered onto polylysine-coated slides. For WB experiments of purified pachytene spermatocytes, cell suspensions were loaded into a sedimentation chamber according to procedures developed for murine spermatogenic cells for velocity sedimentation under unit gravity separation [25].

## Nuclear protein preparation

Enriched nuclear proteins samples were prepared essentially as described by Korfali et al [26], using dissociated testicular cells. In brief, cells were dispersed in 3 ml of ice-cold hypotonic buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 2 mM DTT) containing Complete protease inhibitor cocktail (Roche) on ice. After 10 min, cells were lysed by application of 20 strokes in a Dounce hand homogenizer. Nuclei were then separated from the cells by a sucrose gradient (0.22 M to 0.9 M). Nuclei were washed in PBS buffer and pelleted at 2000 g at 4°C for 15 min. Nuclei were then solubilized in buffer containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% triton X-100, 100 U/ml DNase and complete protease inhibitor cocktail (Roche) incubated for 4 hours at 4°C under agitation. After centrifugation at 20 000 g for 30 min at 4°C, the soluble supernatant was conserved and subjected to SDS-PAGE.

## Western Blotting analysis

Proteins of enriched nuclear preparation were diluted in ultra pure water and mixed with 5X protein sample buffer (62 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β-mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue as the tracking dye), and samples were heated at 95°C for 5 minutes when required. Samples were then separated on 4–20% SDS-PAGE gels and transferred into PVDF membranes (Millipore) using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). The membranes

were blocked in 6% non-fat dry milk in PBS 0.1% Tween and incubated overnight at 4°C with Ab1 anti-Sun5 (1/1000), Ab2 anti-Sun5 (1:500) or anti-DDK (1:1000) antibodies; this was followed by 30 min of incubation with a matched horseradish peroxidase labeled secondary antibody (1/10,000). Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a Chimidoc Station (Biorad). Western blotting procedures were repeated at least 3 times per sample.

### Immunohistochemistry (IHC)

For IHC, heat antigen retrieval was performed by boiling slides immersed in 0.01 M sodium citrate buffer, 0.05% Tween 20, pH 6.0 during ~15 min. Incubation with primary antibodies was performed overnight at 4°C in PBS with 2% goat serum, 1% bovine serum albumin, 0.1% Triton X-100. Slides were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and counterstained with Hoechst 33342. Images were taken by confocal microscopy (Zeiss LSM 710), and processed using Zen 2009.

### Antibodies

Mouse Sperm Protein Sp56 Monoclonal Antibodies and Golgi matrix protein GM130 (610822), two monoclonal antibodies raised in mouse, were from QED Bioscience; Lamin B1 antibodies were from Abcam (Ab16048); DDK-tag antibodies were from Origene, anti-KDEL from Calbiochem Millipore (Mouse mAb 10C3, 1/200). Two Sun5 antibodies were used: Ab1 corresponds to Spag4l antibody raised in rabbit from Proteintech antibodies (17495-1-AP) and was used from 1/100 to 1/200 in IHC and Ab2 corresponds to laboratory designed antibodies targeting the peptide CTLPEDTTHSGRPRRGVQRSY and corresponding to amino acids 11–31 of the mouse Sun5 and raised in rat.

### Enzymatic deglycosylation

Samples (50 µg of total protein per reaction) were incubated at 37°C for 15 hours under non-reducing conditions with a mixture of different glycosidases (PNGase F, Neuraminidase, O-glycosidase, β 1–4 Galactosidase, β- N-Acetylglucosaminidase (Protein Deglycosylation Kit, Promega) and protease inhibitors (Roche). Deglycosylated proteins were separated on 4–20% gradient SDS-polyacrylamide gel (Bio-Rad) followed by western blot analysis, using the same antisera described above for Sun 5 protein. The control sample was incubated without glycosidase mix and a positively glycosylated protein (fetuin) was provided as a substrate control.

### Fractionation of sperm heads and tails

Cauda epididymal sperm, obtained from male mice (OF1) was collected in PBS buffer and allowed to swim for 10 minutes at 37°C. Sperm heads and tails were separated by mild sonication on ice (five times ON, five times OFF) using Ultrasonic sonicator (Delta labo). The sample was then layered on a discontinuous Percoll density gradient composed of six layers containing 100, 60, 34, 26, 23, and 21% Percoll. All of the percoll solutions were diluted in M2 medium (Sigma-Aldrich, France). The gradient was centrifuged at 600 g for 20 min at 4°C. After centrifugation, sperm heads were recovered in the fraction 100% whereas sperm tails were recovered in the fraction 60%. Both samples were washed in PBS buffer, and then the pellets were resuspended in Laemmli sample buffer without β-mercaptoethanol, and boiled for 5 minutes at 100°C. After centrifugation, 5% β-mercaptoethanol was added to the supernatants, and the mixture was boiled again for 5 minutes. Protein extracts were loaded and subjected to SDS-PAGE as described above.

## Funding

This study was supported by grants from Gravit Foundation (to CA), from the Agence Nationale de la Recherche (Grant ICG2I to PR and CA).

## Supporting Information

**S1 Fig. No staining is observed in spermatogenic cells treated with only secondary antibody.** No staining is observed in pachytene spermatocytes (PS), round spermatids (RS) or elongating spermatids (SE).

(JPG)

**S2 Fig. Co-staining of pachytene spermatocytes with KDEL antibodies (reticulum marker, red) and Sun 5 antibodies (green).** (A) In pachytene, a punctiform staining is observed within the cytoplasm but no staining were observed around the nucleus (A1). The reticulum staining is observed within the reticulum (A2). (A3) overlay. Most of the green and red staining were not superposed. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue). (B) Similar pattern of KDEL and Sun5 staining in a different pachytene spermatocyte.

(JPG)

**S3 Fig. Sun5 is located in the nuclear envelope in round spermatids and excluded from the NE facing the acrosome (A-E).** Round spermatids co-stained with anti-Sp56 (red) and anti-Sun5 Ab1 (green) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus (blue). A-D panels show examples of the absence of staining in the NE facing the acrosome. A and E panels: examples of cells showing that Sun5 staining is located more externally than Sp56 Staining. Arrow heads indicate the Sun5 staining which was not bound to the nuclear envelope.

(JPG)

**S4 Fig. NE-unbound Sun5 staining co-localizes with the Golgi apparatus in round spermatids.** Round spermatids were co-stained with anti-Sun5 antibody (A1, B1, C1, green staining) and with anti-GM130 antibody to evidence the Cis-Golgi (A2, B2, C2, red staining) and counterstained with Hoechst to evidence the nucleus. Overlays of GM130 and Sun 5 staining show that NE-unbound Sun5 staining co-localizes with the Golgi Apparatus (A3, B3, C3, arrow heads).

(JPG)

**S5 Fig. Control data of deglycosylation experiments.** (A) Control showing that our deglycosylation protocol is able to remove glycosyl residues of bovine fetuin. (–) corresponds to fetuin incubated at 37°C for 15 hours in the absence of enzymes and (+) to fetuin incubated at 37°C for 15 hours with a mixture containing different glycosidases. (B) Protein loads were controlled with TGX stain free precast gels. Lane 1 corresponds to testis proteins which were conserved at 4°C during the deglycosylation protocol, lane 2 to testis proteins incubated at 37°C for 15 hours with a mixture of different glycosidases, lane 3 to testis proteins incubated at 37°C for 15 hours in the buffer without enzymes and lane 4 to molecular weights. (C) Protein load, corresponding to the Western blot presented in [Fig. 4D](#), demonstrates that similar amounts of protein were loaded.

(JPG)

## Author Contributions

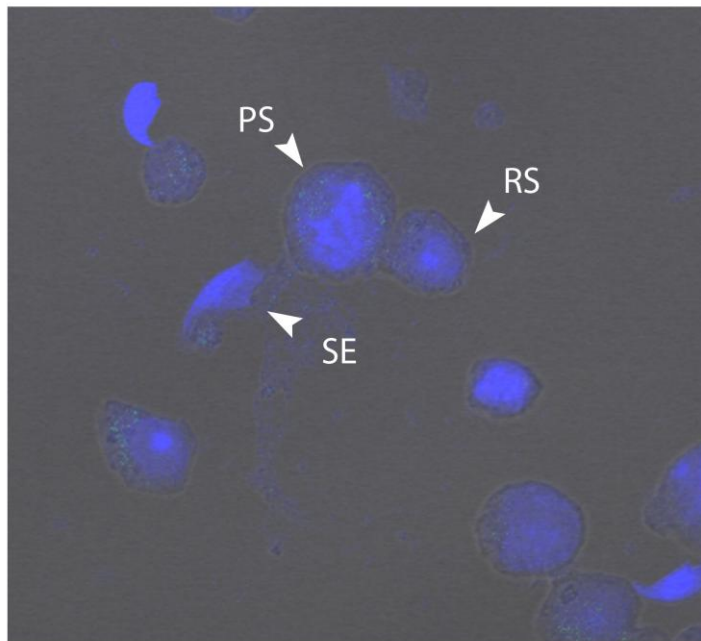
Conceived and designed the experiments: CA PR. Performed the experiments: SY JE RAN VP. Analyzed the data: SY JE RAN PR CA. Contributed reagents/materials/analysis tools: TK. Wrote the paper: CA.

## References

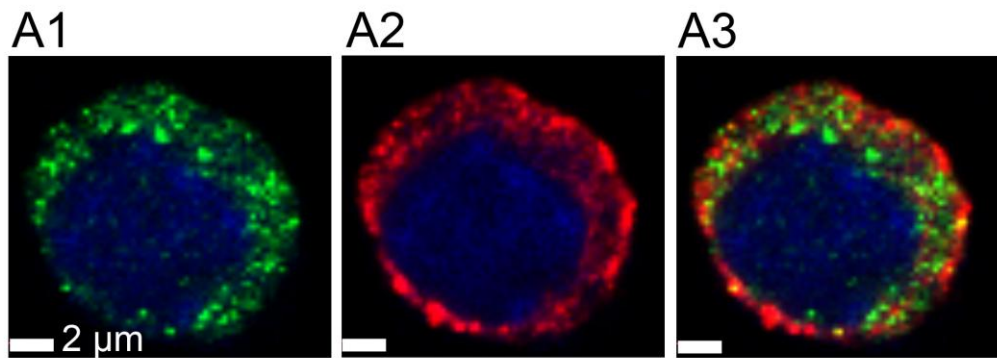
1. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2003) Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 14: 4628–4640. PMID: [14551252](#)
2. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL (2011) Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* 1: 221–230. PMID: [22319670](#)
3. Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C et al. (2011) A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 88: 351–361. doi: [10.1016/j.ajhg.2011.02.007](#) PMID: [21397064](#)
4. Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, Triki C et al. (2012) MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod* 27: 2549–2558. doi: [10.1093/humrep/des160](#) PMID: [22627659](#)
5. Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroche J, Yassine S, Novella C et al. (2012) Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 139: 2955–2965. doi: [10.1242/dev.077982](#) PMID: [22764053](#)
6. Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA et al. (2005) The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci* 118: 3419–3430. PMID: [16079285](#)
7. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B et al. (2006) Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172: 41–53. PMID: [16380439](#)
8. Shao X, Tarnasky HA, Lee JP, Oko R, van der Hooft FA (1999) Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev Biol* 211: 109–123. PMID: [10373309](#)
9. Gob E, Schmitt J, Benavente R, Alsheimer M (2010) Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One* 5: e12072. doi: [10.1371/journal.pone.0012072](#) PMID: [20711465](#)
10. Kracklauer MP, Wiora HM, Deery WJ, Chen X, Bolival B Jr., Romanowicz D et al. (2010) The Drosophila SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *J Cell Sci* 123: 2763–2772. doi: [10.1242/jcs.066589](#) PMID: [20647369](#)
11. Frohnert C, Schweizer S, Hoyer-Fender S (2011) SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod* 17: 207–218. doi: [10.1093/molehr/gaq099](#) PMID: [21159740](#)
12. Jiang XZ, Yang MG, Huang LH, Li CQ, Xing XW (2011) SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol* 30: 875–882. doi: [10.1089/dna.2010.1161](#) PMID: [21711156](#)
13. Kim KS, Cha MC, Gerton GL (2001) Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol Reprod* 64: 36–43. PMID: [11133656](#)
14. Hodzic DM, Yeater DB, Bengtsson L, Otto H, Stahl PD (2004) Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* 279: 25805–25812. PMID: [15082709](#)
15. Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM et al. (2006) SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 26: 3738–3751. PMID: [16648470](#)
16. Yassine S, Escoffier J, Martinez G, Coutton C, Karaouzene T, Zouari R et al (2014) Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development. *Mol Hum Reprod* pii: gau099-[Epub ahead of print].
17. Buettner FF, Ashikov A, Tiemann B, Lehle L, Bakker H (2013) C. elegans DPY-19 is a C-mannosyl-transferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol Cell* 50: 295–302. doi: [10.1016/j.molcel.2013.03.003](#) PMID: [23562325](#)
18. Ding X, Xu R, Yu J, Xu T, Zhuang Y, Han M (2007) SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell* 12: 863–872. PMID: [17543860](#)

19. Ho HC, Suarez SS (2003) Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol Reprod* 68: 1590–1596. PMID: [12606347](#)
20. Tran D, Chalhoub A, Schooley A, Zhang W, Ngsee JK (2012) A mutation in VAPB that causes amyotrophic lateral sclerosis also causes a nuclear envelope defect. *J Cell Sci* 125: 2831–2836. doi: [10.1242/jcs.102111](#) PMID: [22454507](#)
21. Chi YH, Chen CY, Jeang KT (2012) Reversal of laminopathies: the curious case of SUN1. *Nucleus* 3: 418–421. doi: [10.4161/nucl.21714](#) PMID: [22895095](#)
22. Gronborg M, Kristiansen TZ, Stensballe A, Andersen JS, Ohara O, Mann M et al. (2002) A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* 1: 517–527. PMID: [12239280](#)
23. Li B, Kohler JJ (2014) Glycosylation of the nuclear pore. *Traffic* 15: 347–361. doi: [10.1111/tra.12150](#) PMID: [24423194](#)
24. Sosa BA, Rothballer A, Kutay U, Schwartz TU (2012) LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* 149: 1035–1047. doi: [10.1016/j.cell.2012.03.046](#) PMID: [22632968](#)
25. Romrell LJ, Bellve AR, Fawcett DW (1976) Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol* 49: 119–131. PMID: [176074](#)
26. Korfali N, Fairley EA, Swanson SK, Florens L, Schirmer EC (2009) Use of sequential chemical extractions to purify nuclear membrane proteins for proteomics identification. *Methods Mol Biol* 528: 201–225. doi: [10.1007/978-1-60327-310-7\\_15](#) PMID: [19153695](#)

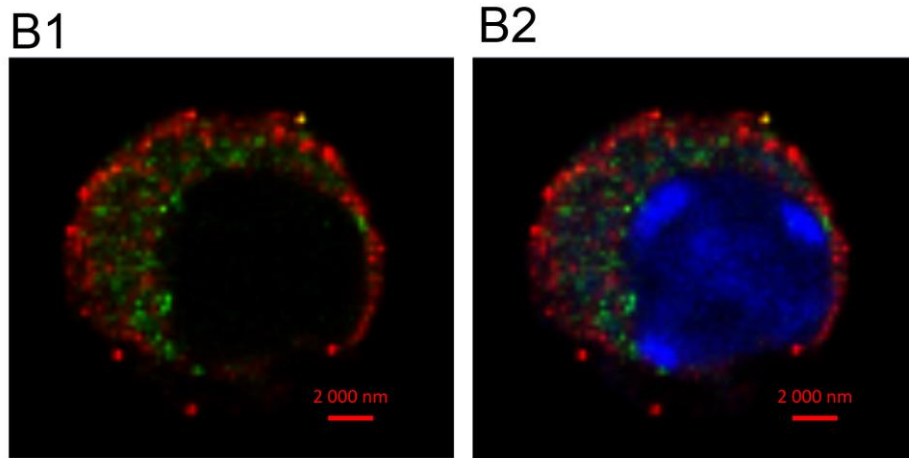




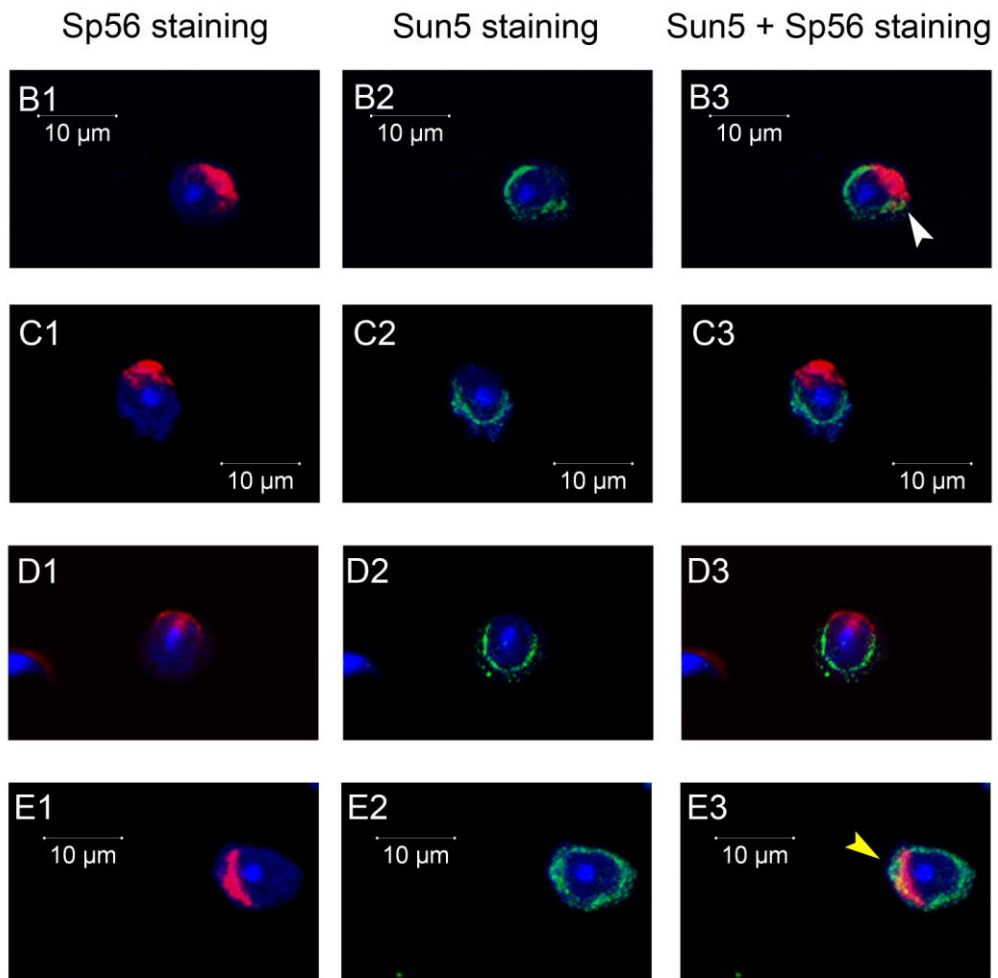
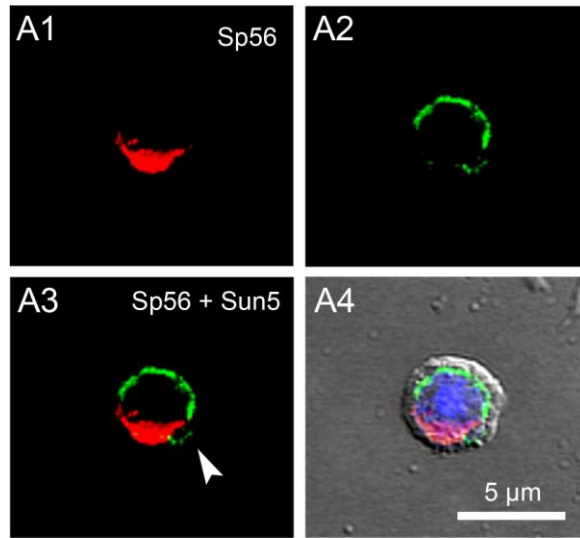
Yassine et al, Figure S1

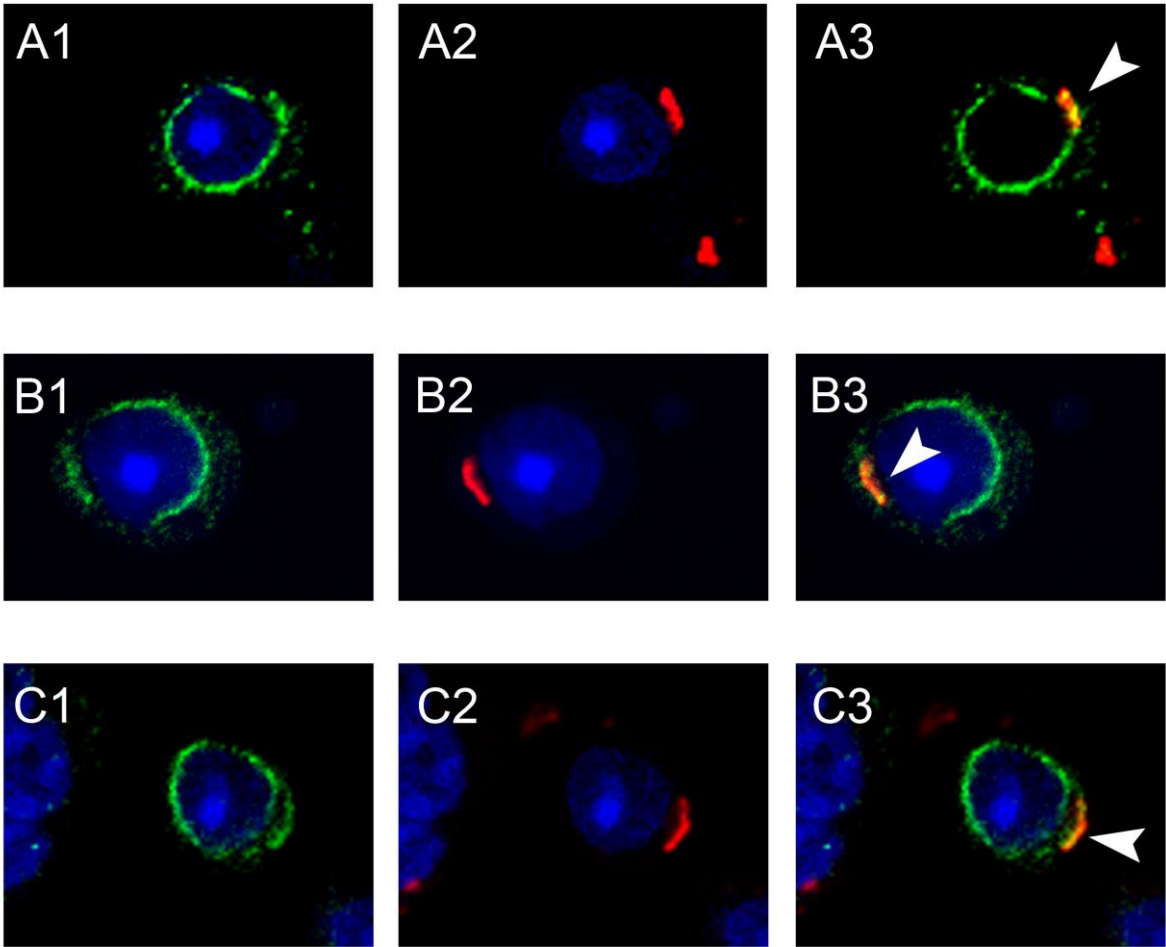


Pachytene spermatocyte

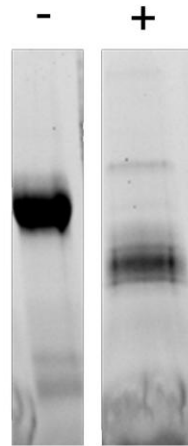


Pachytene spermatocyte

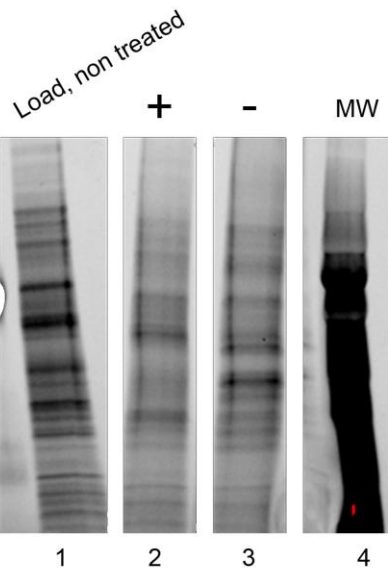




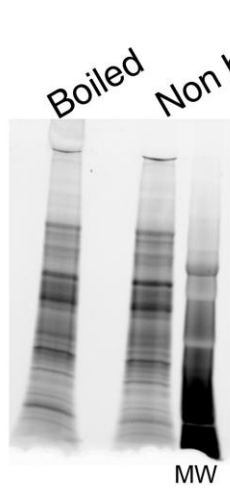
**A**



**B**



**C**



**Article 3:** «Subcellular localization of phospholipase C  $\zeta$ , in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation».

Jessica Escoffier<sup>1,2,†</sup>, **Sandra Yassine**<sup>1,2,†</sup>, Hoi Chang Lee<sup>3</sup>, Guillaume Martinez<sup>1,2</sup>, Julie Delaroche<sup>1,4</sup>, Charles Coutton<sup>1,2,5</sup>, Thomas Karaouzène<sup>1,2</sup>, Raoudha Zouari<sup>6</sup>, Catherine Metzler-Guillemain<sup>7,8</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1,4</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>1,9</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,10</sup>, Rafael Fissore<sup>3</sup>, and Christophe Arnoult<sup>1,2</sup>

†co premier auteur

### **Résumé :**

La globozoospermie de type I est une infertilité masculine rare mais totale, caractérisée par la production de 100% de spermatozoïdes présentant une tête ronde et dépourvue d'acrosome. Dans le cadre de cette pathologie, l'ICSI est le seul traitement palliatif adapté en AMP, permettant de surmonter l'absence de l'acrosome. Cependant, ce traitement reste peu efficace et le taux de réussite est très bas. En effet, peu d'ovocytes sont activés après ICSI et les rares activés présentent un développement défectueux. Des études récentes, réalisées sur des patients globozoospermiques, ont montré que les spermatozoïdes de ces patients, présentent un défaut d'activation ovocytaire, dû à une réduction significative, voir une absence, de l'expression de la PLC zêta (PLC  $\zeta$ ). Cette dernière constitue, le facteur spermatique physiologique, responsable de l'induction des oscillations calciques au sein de l'ovocyte au moment de la fécondation et ainsi l'initiation du développement embryonnaire. Toutefois, ces études ont été réalisées en absence de caractérisation génétique. Notre équipe a identifié le gène *DPY19L2*, responsable de 70 % des cas de la globozoospermie chez l'homme. Le but de notre travail était de mieux comprendre la pathogénie moléculaire de cette infertilité. Nos recherches ont été focalisées sur trois points chez les patients globozoospermiques avec une délétion pour *DPY19L2*, ainsi que chez les souris déficientes pour ce gène : 1/ la présence ou non de la PLC  $\zeta$ , 2/ la localisation subcellulaire de la PLC  $\zeta$  au niveau du spermatozoïde et 3/ l'identification des causes moléculaires qui ont entraîné la perte ou l'absence de la PLC  $\zeta$  au cours de spermatogenèse dans le cas de la globozoospermie. Dans cette étude, nous confirmons que la PLC  $\zeta$  est également absente dans le cas de la globozoospermie dépendante du gène *DPY19L2* chez l'homme et chez la souris. De même, nous montrons pour la première fois, par microscopie électronique, que la PLC  $\zeta$  est localisée au niveau de la thèque périnucléaire de la région post-acrosomale et près de la membrane acrosomale interne du

spermatozoïde humain. Cette localisation est en adéquation parfaite avec son rôle de facteur activateur de l'ovocyte, puisque cette région est la première zone du spermatozoïde mise en contact avec le cytoplasme de l'ovocyte suite à la fusion des deux gamètes. Ceci permet d'expliquer la cause de sa perte lors de la spermatogenèse dans le cas de la globozoospermie, lorsque l'acrosome est complètement détaché et éliminé sous forme de corps résiduel.

# Subcellular localization of phospholipase C $\zeta$ in human sperm and its absence in DPY19L2-deficient sperm are consistent with its role in oocyte activation

Jessica Escoffier<sup>1,2,†</sup>, Sandra Yassine<sup>1,2,†</sup>, Hoi Chang Lee<sup>3</sup>,  
Guillaume Martinez<sup>1,2</sup>, Julie Delaroche<sup>1,4</sup>, Charles Coutton<sup>1,2,5</sup>,  
Thomas Karaouzène<sup>1,2</sup>, Raoudha Zouari<sup>6</sup>,  
Catherine Metzler-Guillemain<sup>7,8</sup>, Karin Pernet-Gallay<sup>1,4</sup>,  
Sylviane Hennebicq<sup>1,9</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,10</sup>, Rafael Fissore<sup>3</sup>,  
and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, Grenoble F-38000, France <sup>2</sup>Equipe 'Andrologie, Génétique et Cancer' Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405, La Tronche F-38700, France <sup>3</sup>Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, 661 North Pleasant Street, Amherst, MA 01003, USA <sup>4</sup>Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U.836, F-38000 Grenoble, France <sup>5</sup>CHU de Grenoble, UF de Génétique Chromosomique, Grenoble F-38000, France <sup>6</sup>Clinique des Jasmins, 23, Av. Louis BRAILLE, 1002 Tunis, Tunisia <sup>7</sup>Aix-Marseille Université-Inserm UMR 910, Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle, 13385 Marseille Cedex 5, France <sup>8</sup>APHM Hôpital La Conception, Gynécopôle, Laboratoire de Biologie de la Reproduction - CECOS, 13385 Marseille Cedex 5, France <sup>9</sup>CHU de Grenoble, Centre d'AMP-CECOS, BP217, Grenoble Cedex 9 F-38043, France <sup>10</sup>CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble F-38000, France

\*Correspondence address. AGIM, Equipe 'Andrologie, Génétique et Cancer', Faculté de Médecine, 38700 La Tronche, France. Tel: +33-4-76-63-74-08; E-mail christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

Submitted on August 28, 2014; resubmitted on October 13, 2014; accepted on October 24, 2014

**ABSTRACT:** We recently identified the *DPY19L2* gene as the main genetic cause of human globozoospermia (70%) and described that *Dpy19l2* knockout (KO) mice faithfully reproduce the human phenotype of globozoospermia making it an excellent model to characterize the molecular pathophysiology of globozoospermia. Recent case studies on non-genetically characterized men with globozoospermia showed that phospholipase C, zeta (PLC $\zeta$ ), the sperm factor thought to induce the Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization, was absent from their sperm, explaining the poor fertilization potential of these spermatozoa. Since 30% of globozoospermic men remain genetically uncharacterized, the absence of PLC $\zeta$  in *DPY19L2* globozoospermic men remains to be formally established. Moreover, the precise localization of PLC $\zeta$  and the reasons underlying its loss during spermatogenesis in globozoospermic patients are still not understood. Herein, we show that PLC $\zeta$  is absent, or its presence highly reduced, in human and mouse sperm with *DPY19L2*-associated globozoospermia. As a consequence, fertilization with sperm from *Dpy19l2* KO mice failed to initiate Ca<sup>2+</sup> oscillations and injected oocytes remained arrested at the metaphase II stage, although a few human oocytes injected with *DPY19L2*-defective sperm showed formation of 2-pronuclei embryos. We report for the first time the subcellular localization of PLC $\zeta$  in control human sperm, which is along the inner acrosomal membrane and in the perinuclear theca, in the area corresponding to the equatorial region. Because these cellular components are absent in globozoospermic sperm, the loss of PLC $\zeta$  in globozoospermic sperm is thus consistent and reinforces the role of PLC $\zeta$  as an oocyte activation factor necessary for oocyte activation. In our companion article, we showed that chromatin compaction during spermiogenesis in *Dpy19l2* KO mouse is defective and leads to sperm DNA damage. Together, these defects explain the poor fertilization potential of *DPY19L2*-globozoospermic sperm and the compromised developmental potential of embryos obtained using sperm from patients with a deletion of the *DPY19L2* gene.

**Key words:** male infertility / globozoospermia / *DPY19L2* / phospholipase C zeta / acrosome / ICSI

† Shared first authorship.



## Introduction

Approximately 15% of couples seek assistance from reproductive clinics for subfertility or infertility. The causes of infertility are numerous (societal, environmental, chromosomal or genetic) and this heterogeneity has slowed down the comprehension of the etiology of infertility. Identification of the cause of a patient's infertility is always long and costly and is thus often neglected and replaced by a palliative treatment based on assisted reproductive technologies (ART), which do not repair or improve the deficient physiological processes but merely bypass the defects. Nevertheless, despite progresses in ART, including the development of ICSI, genetic causes of infertility associated with defects such as macrozoospermia, globozoospermia or azoospermia remain difficult to overcome and many couples fail to achieve a pregnancy. Therefore, a better understanding of the molecular defects underlying these diseases will help to elucidate unknown mechanism(s) of spermatogenesis, while offering the perspective of more rational therapeutic approaches.

In the last few years, we have focused our attention on one phenotype of male infertility, globozoospermia (OMIM #613958, <http://omim.org/entry/613958>), which is characterized by the presence in the ejaculate of a large majority of round spermatozoa devoid of acrosome (Dam et al., 2007a). Some patients present a complete phenotype, type I, with 100% abnormal spermatozoa, whereas others have a mosaic of normal and globozoospermic sperm. Despite the different phenotypes, globozoospermia seems to have a genetic origin, since familial cases have been described. A familial mutation of *SPATA16* has been associated with globozoospermia (Dam et al., 2007b), although a single mutation in *SPATA16* thus far was subsequently identified among a large cohort of patients with this phenotype (Karaca et al., 2014), suggesting that globozoospermia is genetically heterogeneous. Recently, research on a cohort of Tunisian patients with type I globozoospermia revealed that 15 of the 20 analyzed patients displayed complete deletion of the *DPY19L2* gene (Harbuz et al., 2011); this finding was confirmed by two other studies including one in a population of Chinese subjects (Koscinski et al., 2011; Zhu et al., 2013). Subsequently, point mutations in the *DPY19L2* gene were found in some of the patients that did not show *DPY19L2* gene deletion (Coutton et al., 2012; Elinati et al., 2012; Zhu et al., 2013). Together, these results implicate the *DPY19L2* gene as the major cause of type I globozoospermia.

Studies into the mechanism of the deletion of the *DPY19L2* gene showed that it was produced by non-allelic homologous recombination (NAHR) between two repeated sequences located on each side of the gene. Sequence analysis demonstrated that at the center of the breakpoint, there was a 13-nucleotide recognition motif for the PRDM9 protein, confirming the link between the presence of this motif and the occurrence of NAHRs (Coutton et al., 2013). The frequency of the heterozygous deletion in the general population is estimated to be 1 in 220 individuals predicting a prevalence of globozoospermia of around  $\sim 1/200,000$  males, a value that is compatible with the rarity of the phenotype. Although these findings established the association of the *DPY19L2* gene with globozoospermia, the function of the gene product was unknown. Therefore, more fundamental studies about its possible function were carried out using a genetic knockout (KO) mouse model with a deleted *Dpy19l2* gene. In those studies, we found that *DPY19L2* is located in the inner nuclear membrane and is

necessary for anchoring the acrosome to the nuclear envelope, because in its absence, the inner nuclear membrane becomes separated from the outer nuclear membrane, leading to the detachment of the acrosome associated with the outer nuclear membrane (Pierre et al., 2012).

Before the development of ART, and more particularly ICSI, the treatment of globozoospermia was not possible and affected men remained sterile. In 1994, Lundin et al. using ICSI reported the first successful pregnancy and offspring from a man with globozoospermia (Lundin et al., 1994); other teams later reported similar outcomes. Despite this initial success, other studies using ICSI reported an absence of fertilization when using globozoospermic sperm (Liu et al., 1995; Battaglia et al., 1997). The low efficiency of ICSI with globozoospermic sperm, characterized by low rates of egg activation and fertilization, raised the possibility that these sperm were deficient in the factor responsible for egg activation. After many years of study, such a factor was proposed to be a testis-specific phospholipase C, zeta (PLC $\zeta$ ), because it is appropriately expressed in sperm and injection of the corresponding complementary RNAs (cRNA) into oocytes induced Ca<sup>2+</sup> oscillations (Saunders et al., 2002). The role of PLC $\zeta$  was further confirmed in numerous publications (Amdani et al., 2013). PLC $\zeta$  is located in the head of mammalian sperm in areas surrounding the equatorial region, which is where the fusion between gametes is proposed to begin (Yoon and Fissore, 2007; Grasa et al., 2008). Consistent with a possible role in globozoospermia, recent studies on men presenting this condition showed that protein expression of PLC $\zeta$  was greatly reduced or absent from these patients (Yoon et al., 2008; Heytens et al., 2009). Further, later studies using motile sperm organelle morphology evaluation (MSOME) showed that few globozoospermic sperm can retain fragments of the acrosome, known as acrosomal buds, and in these cases some PLC $\zeta$  is detected on the sperm head and/or midpiece, which suggests heterogeneity in expression of this protein in globozoospermic patients (Taylor et al., 2010; Kashir et al., 2012). Given that the *DPY19L2* gene was only described in 2011, the association between globozoospermia, *DPY19L2*-deletion and PLC $\zeta$  expression remains to be demonstrated.

Contrary to humans where only two genes have been associated with globozoospermia, the analyses of KO mice allowed identifying nine genes whose absence leads to defective acrosome biogenesis and the globozoospermia-like sperm phenotype (Pierre et al., 2012). A better characterization of the molecular underpinnings responsible for the infertility of globozoospermic patients could be carried out in mouse models (Heytens et al., 2010). Toward that end, one of these models, the *Dpy19l2* KO mouse, displays a reproductive phenotype remarkably similar to the human disease, as males are completely infertile and 100% of their sperm are globozoospermic (Pierre et al., 2012). Therefore, this model represents an opportunity to assess the role of PLC $\zeta$  in *DPY19L2*-dependent globozoospermia.

Using both human and mouse sperm from individuals/animals with *DPY19L2*-dependent globozoospermia, we show that PLC $\zeta$  is absent/reduced in sperm of both species and this absence seems to underlie the characteristic defect in oocyte activation associated with fertilization by ICSI when using these sperm. Using optical and electronic microscopy, we identified for the first time with a high degree of precision the subcellular localization of PLC $\zeta$  in human sperm in the perinuclear theca. This distribution is consistent with its activity as an oocyte activation factor and with its loss during spermiogenesis in *DPY19L2*-defective

sperm, which display disruption of the nuclear envelope, resulting in detachment of the acrosome and loss of the acrosome and surrounding material including the perinuclear region and PLC $\zeta$ .

## Materials and Methods

### Biological samples

Human sperm were obtained from patients consulting at the fertility department of Grenoble and Marseille Hospitals (France) or Clinique des Jasmins (Tunis, Tunisia), following approval by the ethical committee and informed consent from the patients. All patients gave an informed consent for the conservation of the remaining sperm in the Germetheque biobank and their use in studies on human fertility in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 on human experimentation. The Germetheque Scientific Committee approved the present study design. Globozoospermic patients underwent genetic analysis as previously described (Harbuz *et al.*, 2011) and homozygously *DPY19L2*-deleted patients selected. Some of these patients were included in Harbuz *et al.* (2011). This previous study focused on the genotypes of a cohort of globozoospermic patients and included none of the results presented here, including those involving ICSI. All animal procedures were performed according to the French and to the IACUC UMASS guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the respective local ethical review committees (Grenoble-Institut des Neurosciences—ethical committee, agreement number 004). *Dpy19L2* KO mice were obtained from Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), University of California, Davis, CA, USA. Human sperm were collected by masturbation and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) after semen liquefaction.

### Collection of gametes for ICSI

Sperm from caudae epididymides of different mouse strains (*Dpy19L2* KO and wild-type (WT) B6D2F1) were allowed to swim for 10 min at 37°C in 1 ml of Nuclear Isolation Medium (NIM) containing (in mM) KCl 125, NaCl 2.6, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 and EDTA 3 (pH 7.0). Sperm were then washed twice by centrifugation at 500 g with NIM, then resuspended in 100  $\mu$ l NIM + 12% poly(vinylpyrrolidone) (PVP), average  $M_r \approx 360,000$  (Sigma-Aldrich, France) medium. The sperm head was separated from the tail by the application of several piezo pulses (PiezoXpert®, Eppendorf) or by sonication (2  $\times$  15 s).

### Oocyte preparation

B6D2F1 female mice, 7–11 weeks old, were superovulated by IP injection of 7.5 IU pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG; Intervet) followed by 7.5 IU of hCG (Intervet) 48 h later. Oocytes were collected from oviducts about 14 h after hCG injection. Cumulus cells were removed with 0.1% bovine testicular hyaluronidase (300 USP U/mg; ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA, USA) in M2 medium (Sigma-Aldrich, France) for 5–10 min. Oocytes were rinsed thoroughly and kept in M2 medium at 15°C for at least 15 min until required for ICSI.

### Media

M2 medium (Sigma) and CZB.HEPES (CZB.H, in mM) (HEPES 20, NaCl 81.6, KCl 4.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, EDTA.Na<sub>2</sub> 0.1, Na-lactate 31, NaHCO<sub>3</sub> 5, Na-pyruvate 0.3, polyvinyl alcohol 0.1 mg/ml, phenol red 10 mg/ml (0.5% (w/v) in DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)), pH 7.4) was used for gamete handling and ICSI in air. Potassium simplex optimized medium (KSOM) (100 $\times$ , Life technologies) supplemented with 1% essential amino acids (EAA) (100 $\times$ , Life technologies) was used for embryo culture (KSOM/EAA).

### ICSI procedures

ICSI was performed according to the method described by Yoshida and Perry (2007). For microinjection, sperm were stored in 50  $\mu$ l of NIM, 12% PVP medium and moved directly to the injection chamber. Sperm were introduced into the ooplasm by using micromanipulators (Micromanipulator InjectMan®, Eppendorf) mounted on an inverted Nikon TMD microscope. The sperm suspension was replaced every 30 min during the ICSI experiment. Oocytes that survived the ICSI procedure were incubated in KSOM/EAA medium at 37°C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Pronuclei (PN) formation was checked at 6 h after ICSI, and outcomes were scored up to the blastocyst stage.

### [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> monitoring

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> monitoring was carried out as described by our laboratory (Yoon *et al.*, 2008). Briefly, mouse eggs were loaded with fura-2-AM (Molecular Probes; Invitrogen) prior to performing ICSI. Eggs were then transferred to a monitoring dish (Mat-Tek Corp., Ashland, MA, USA) containing 50  $\mu$ l drops of TL-HEPES medium under mineral oil. Eggs were monitored simultaneously under a 20 $\times$  objective on an inverted microscope (Nikon) outfitted for fluorescence measurements and with a temperature-controlled stage. Excitation wavelengths of 340 and 380 nm were alternated using a filter wheel (Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY, USA). Fluorescence ratios were taken every 20 s. After passing through a 510-nm barrier filter, the emitted light was collected by a Cool-SNAPES digital camera (Roper Scientific, Tucson, AZ). SimplePCI imaging software was used to run all the hardware and capture images (Hamamatsu, Sewickley, PA, USA). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> values are reported as the ratio of 340:380 nm fluorescence in the whole egg.

### Western blotting

Sperm from caudae epididymides of different mouse strains (*Dpy19L2* KO and WT B6D2F1) were allowed to swim for 10 min at 37°C in 1 ml of NIM. Sperm were then washed in 1 ml of PBS, resuspended in Laemmli sample buffer without  $\beta$ -mercaptoethanol, and boiled for 5 min. After centrifugation, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol was added to the supernatants, and the mixture was boiled again for 5 min. Protein extracts equivalent to 1–2  $\times$  10<sup>6</sup> sperm were loaded per lane into a 4–20% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel, and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Millipore) using a Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). The membranes were blocked in 6% nonfat dry milk in PBS–0.1% Tween and incubated overnight at 4°C with anti-PLC $\zeta$  antibodies (1 : 500); this was followed by 1 h of incubation with a horseradish peroxidase labeled secondary antibodies. Immunoreactivity was detected using chemiluminescence detection kit reagents and a Chemidoc™ Station (Bio-Rad). Western blotting procedures were repeated at least three times per sample.

### Immunofluorescence

Sperm were fixed in PBS/4% paraformaldehyde for 1 min at room temperature. After washing in 1 ml PBS, the sperm suspension was spotted onto 0.1% poly L-lysine precoated slides (Thermo Scientific). After attachment, sperm were permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100–DPBS (Triton X-100; Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature. Slides were then blocked in 5% corresponding normal serum–DPBS (normal goat or donkey serum; GIBCO, Invitrogen) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Washes were performed with 0.1% (v/v) Tween 20–DPBS, followed by 1 h incubation at room temperature with Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit or Dylight 488-labeled goat anti-rabbit (1:400) secondary antibodies. Samples were counterstained with 5  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 and mounted with DAKO mounting media (Life Technology).

Fluorescence images were captured with confocal microscopy (Zeiss LSM 710) outfitted with a 63× oil immersion objective for mice sperm and 100× oil immersion objective for human sperm and analyzed with ZEN lite software (Zeiss). Whole images were reconstructed and projected from Z-stack images using ZEN software.

## Immunogold labeling

Purified spermatids were fixed for 2 h in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, containing 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde. Cells were then washed twice in 0.1 M phosphate buffer and once in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2, containing glycine 50 mM before being centrifuged and embedded in 10% gelatin diluted in the same buffer at 37°C. After solidification on ice, this cell pellet was incubated for 4 h in 2.3 M sucrose and frozen in liquid nitrogen. Cryosections of these samples were made at −120°C using an ultra-cry-microtome (Lexica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methylcellulose according to Liou et al. (1996). For labeling, cryosections were first incubated with primary human PLCζ (hPLCζ) antibody and revealed with protein A-gold conjugated (CMC, Utrecht, the Netherlands).

## Primary antibodies

Anti-human acrosin antibodies were obtained from Sigma-Aldrich; two anti-PLCζ antibodies were used: for mouse sperm, antibody was raised against a 19-mer peptide sequence (GYRRVPLFSKSGANLEPSS) of the mouse PLCζ (anti-mPLCζ) (Kurokawa et al., 2005); the anti-mPLCζ was from whole serum, therefore concentration is not known. For human sperm, antibody was raised against a 15-mer-peptide sequence (305KETHERKGSDDRGN319) of the human PLCζ I protein (anti-hPLCζ) (Yoon et al., 2008). The anti-hPLCζ was affinity purified and stored at a concentration of 1 μg/μl. The dilution used was of 1:1000 for western blot and 1:100 for immunofluorescence.

## Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SigmaPlot (Systat Software Inc.). Student's *T*-test and paired *t*-test were used to compare the fertility rate. If necessary, data are presented as mean ± SD. Statistical tests with a two-tailed *P* value ≤0.05 were considered as statistically significant.

## Results

### DPY19L2-deficient sperm display poor oocyte activation capacity

To investigate the ability of *Dpy19l2* KO mice sperm to induce oocyte activation, we injected control and *Dpy19l2* KO sperm heads and tails into WT oocytes, and embryo development was followed up to the blastocyst stage. Injection of *Dpy19l2* KO sperm failed to induce activation, as evaluated by the presence of formation of 2-PN or division to the 2-cell stage, demonstrating failure to induce oocyte activation. In contrast, ~80% of the oocytes injected with WT sperm underwent activation and reached the morula stage (Fig. 1A). The absence of oocyte activation following injection of *Dpy19l2* KO sperm was confirmed by recording Ca<sup>2+</sup> oscillations after ICSI. As expected, injection of WT sperm induced Ca<sup>2+</sup> oscillations (13/13), whereas injection of *Dpy19l2* KO sperm heads (0/21) or flagella (0/5) failed to induce Ca<sup>2+</sup> responses (Fig. 1B1–3).

The ICSI outcomes of globozoospermic patients are variable, with some medical teams reporting high pregnancy rates and others reporting low fertilization rates, early abortion and finally an absence of delivery.

Nevertheless, in the absence of genetic characterization of the cause of globozoospermia in those reports, it is difficult to draw conclusion about the oocyte activation capacity of globozoospermic sperm. In this report, we followed nine couples corresponding to 13 stimulation cycles with males presenting globozoospermia due to a full deletion of the *DPY19L2* gene. Unlike results in the mouse, a low degree of fertilization was observed in these patients, as in 7 of 13 cycles, 2-PN embryos were obtained, although the rate of oocyte activation remained very low, with a mean rate of 7.25% ± 9.76 2-PN formation (Table I).

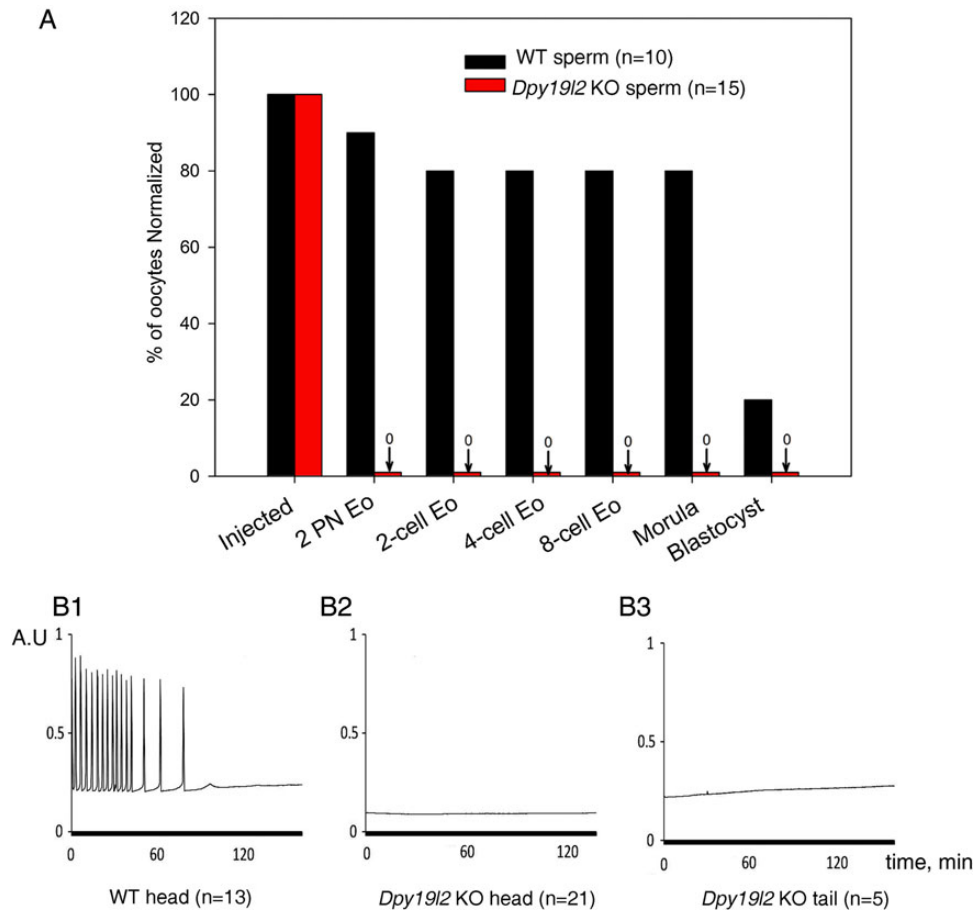
### PLCζ is absent in *Dpy19l2* KO mouse sperm

The absence of oocyte activation in ICSI experiments performed with *Dpy19l2* KO sperm and the low rate of fertilization with human sperm suggested that these sperm lacked the sperm factor thought to be associated with oocyte activation, i.e. PLCζ. To confirm this possibility, we used immunohistochemistry and western blotting to detect expression of PLCζ in both WT and *Dpy19l2* KO sperm. As previously shown, PLCζ is located in the post-acrosomal area of the mouse sperm heads (arrowheads, Fig. 2A1), although additional, less specific staining has also been described in the acrosome region (Yoon and Fissore, 2007; Grasa et al., 2008; Young et al., 2009). In contrast, *Dpy19l2* KO sperm failed to show any immunoreactivity toward PLCζ, strongly suggesting that these sperm are devoid of PLCζ (Fig. 2A2). The absence of PLCζ in *Dpy19l2* KO sperm was confirmed by western blotting, whereas the anti-mPLCζ antibody recognized a band just above 72 kDa in WT sperm, this band was absent in *Dpy19l2* KO sperm lysates (Fig. 2B, representative WB, *n* = 4); equal loading of WT and *Dpy19l2* sperm extracts was demonstrated using TGX stain free™ precast gels (Fig. 2C).

### Reduced and abnormal localization of PLCζ in DPY19L2-deficient human sperm

To examine the expression and localization of PLCζ in DPY19L2-deleted human sperm, we first performed immunofluorescence in control sperm using an anti-human PLCζ (anti-hPLCζ) antibody that we have previously characterized (Yoon et al., 2008; Lee et al., 2014). In agreement with those results, we found that PLCζ is mostly located around the equatorial/post-acrosomal area of human sperm, where it shows a strong and compact staining in the form of a band, the acrosome staining being considerably weaker (Fig. 3A and Supplementary Fig. S1AC). To more accurately determine the location of PLCζ, images obtained with the confocal microscope on the z-axis were examined. In the first section where a signal was detected, here named 0 μm (Supplementary Fig. S1D), PLCζ staining appears as a post-acrosomal band, whereas in more central sections the shape of the staining appears as peripheral dots (Supplementary Fig. S1E and S1F). Finally, as expected, moving the focus to higher confocal sections allowed observing a staining similar to that observed in the 0 μm section (Supplementary Fig. S1G and S1H). These results strongly suggest that PLCζ is not located inside the nucleus, but rather in the vicinity of the nuclear envelope. Lastly, we also performed western blotting studies, which confirmed the specificity of the antibody, as it prominently recognized in three out of four human sperm extracts a band of ~72 kDa, which is the expected molecular weight of hPLCζ (Supplementary Fig. S1I).

The presence of PLCζ in DPY19L2-deleted patients was studied in two subjects with globozoospermia and part of the cohort presented in Table I. We observed that in the large majority of sperm, the anti-PLCζ



**Figure 1** Absence of oocyte activation in *Dpy19l2* knockout (KO) globozoospermic mouse sperm was correlated with defective calcium signaling. **(A)** Absence of 2-pronuclei and subsequent absence of development demonstrate that oocyte activation was defective in ICSI experiments performed with *Dpy19l2* KO nuclei (red columns), contrary to those performed with wild-type (WT) sperm nuclei (black columns). Sperm were from three different KO and two WT males. There was a significant difference between WT and KO sperm for all stages ( $P < 0.001$ ). **(B1–B3)** Contrary to ICSIs performed with WT sperm (13/13, D1), those performed with globozoospermic sperm head (0/21, D2) or flagellum (0/5, D3) do not elicit calcium signaling. Sperm were from three different KO and two WT males.

**Table 1** Outcomes following hormonal stimulation and ICSI in nine couples where the men presented with type I globozoospermia due to the full deletion of the *DPY19L2* gene.

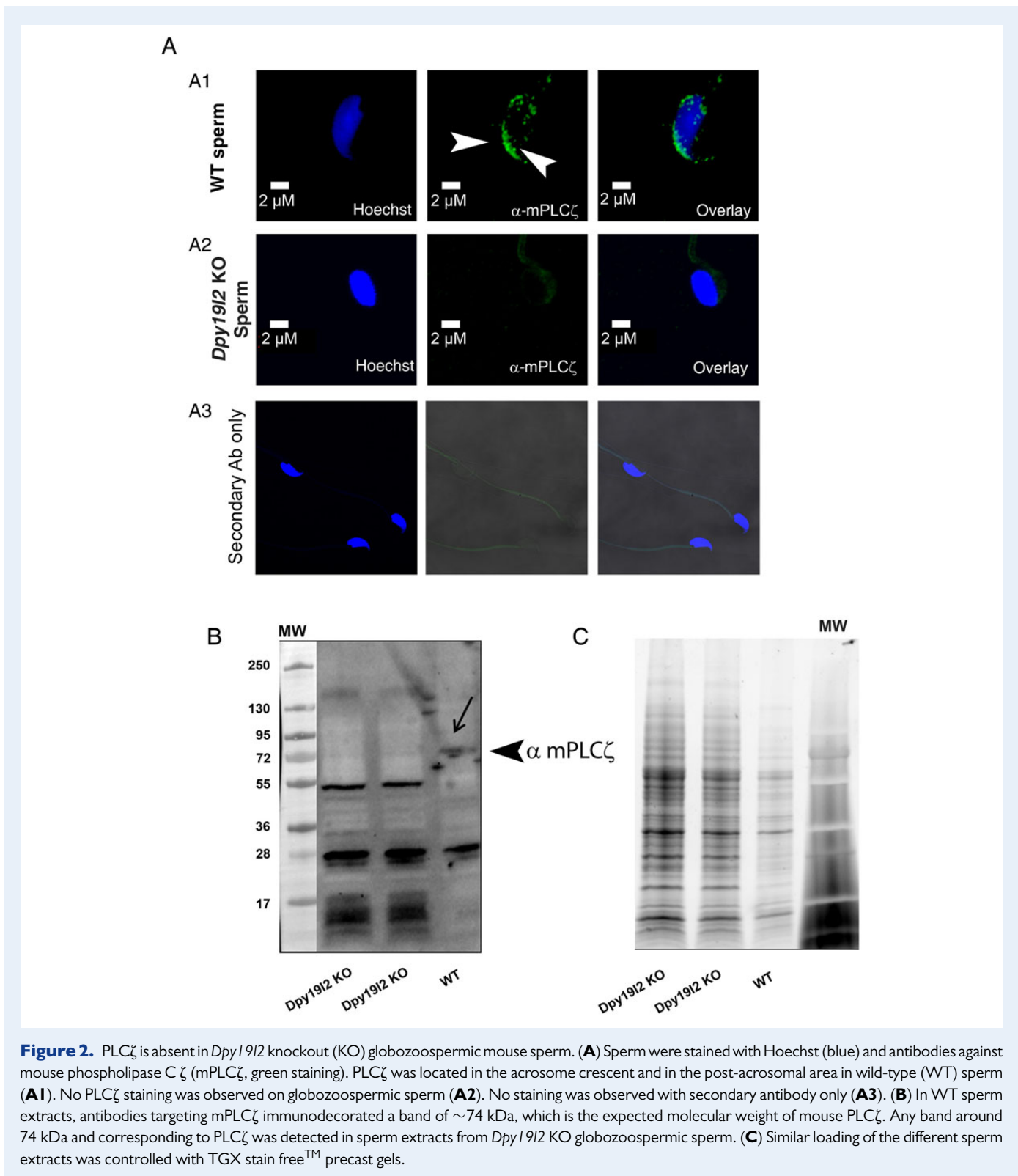
Patient number	M1	G1-1	G1-2	G1-3	T1.1	T1.2	T3	T4	T5.1	T5.2	T7	T8	T9	Mean	SD
Age, male (years)	30	37	38	38	31	31	50	40	36	38	30	42	38		
Age, female (years)	28	29	30	30	27	36	37	36	24	26	26	36	28	30.23	4.28
Nber MII oocytes	14	10	4	5	10	6	8	4	29	19	10	11	9		
Nber 2-PN embryos	2	1	0	0	0	0	0	0	10	1	1	1	1		
% of 2-PN embryos/MII*	14.3	10	0	0	0	0	0	0	34.5	5.3	10	9	11.1	7.25	9.76

MI, metaphase II oocytes retrieved; PN, pronuclei.

\*Oocyte activation rate upon ICSI in 13 different stimulation cycles.

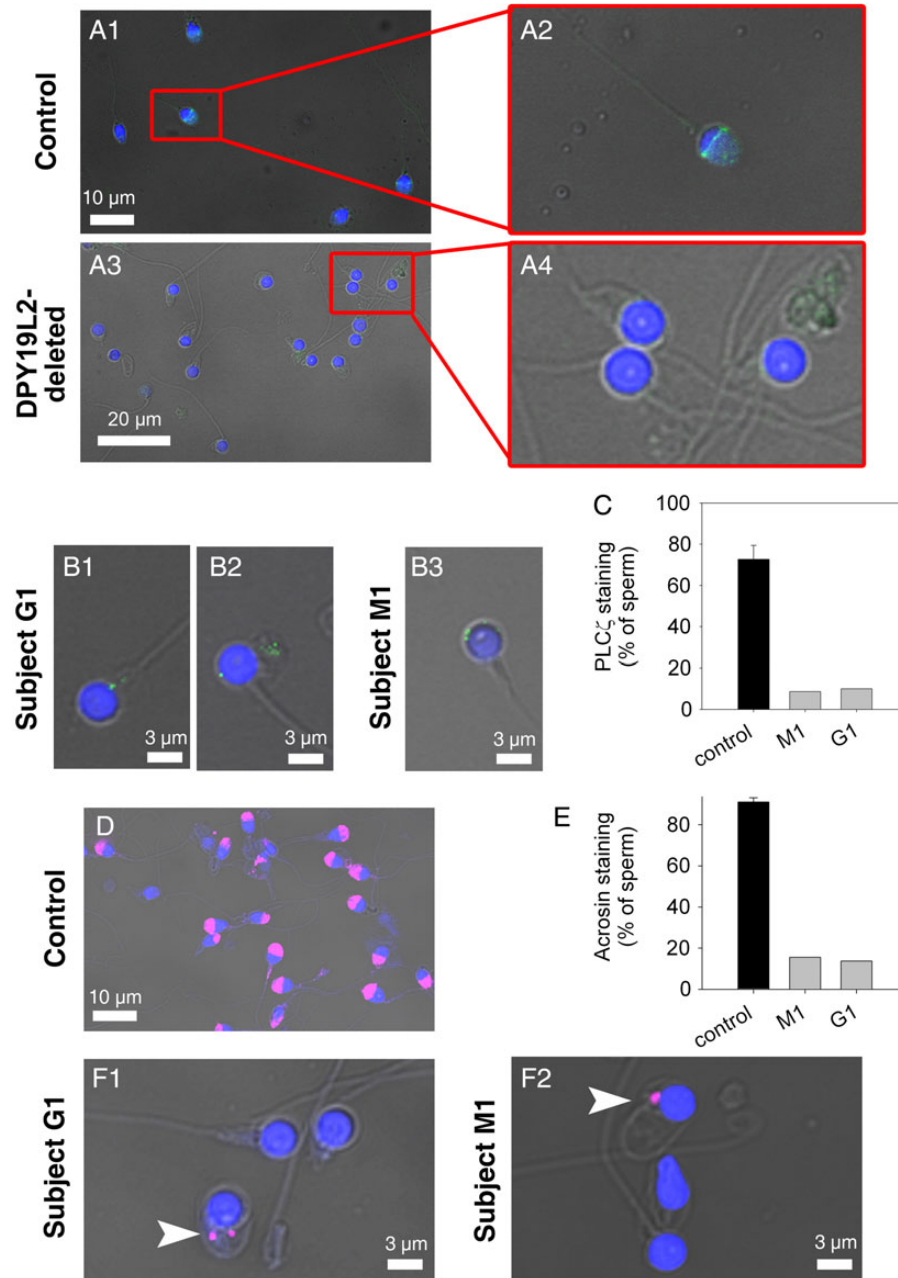
antibody failed to display any reactivity (Fig. 3A3 and A4), which is consistent with the lack of oocyte activation following injection of these sperm. Remarkably, staining with the anti-PLC $\zeta$  antibody showed a punctiform staining in ~10% of the sperm (Fig. 3B1–B3 and 3C; more than

150 sperm were analyzed per subject) and although minor, this staining is likely to represent specific staining of PLC $\zeta$ , because when the primary antibody was omitted, it was no longer observed (Supplementary Fig. S2). It is worth noting that using an anti-acrosin antibody, we observed

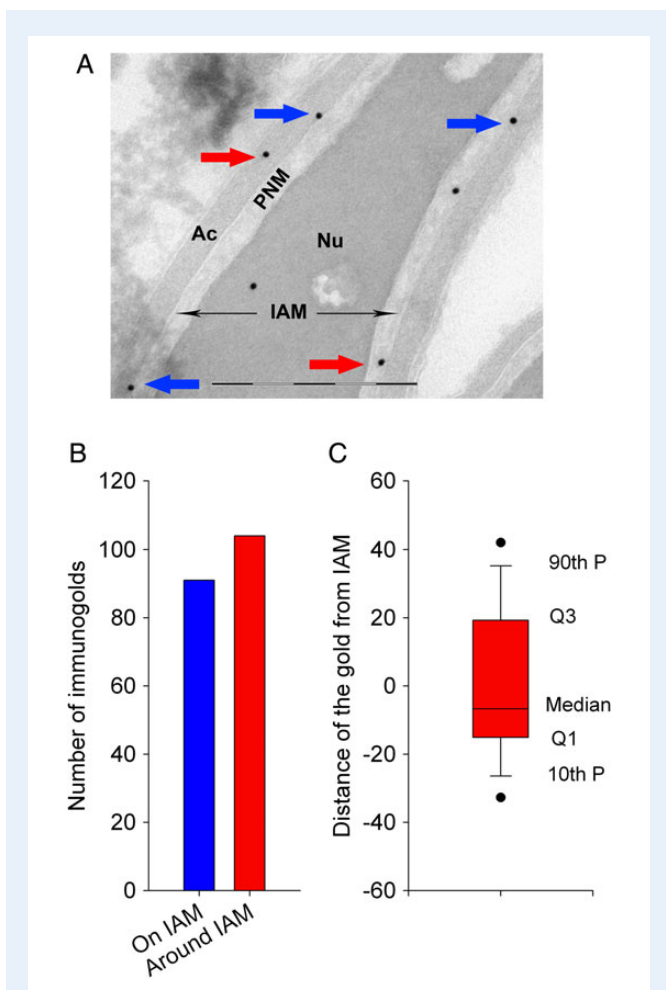


similar punctiform staining in  $\sim 15\%$  of the sperm (Fig. 3E, F1 and F2; more than 150 sperm were analyzed per subject), which suggested the presence of acrosomal buds in a minority of DPY19L2-deleted sperm. While co-staining with hPLC $\zeta$  and acrosin antibodies was not possible, as both antibodies were raised in rabbits, the results suggest that in

those globozoospermic sperm that retain remnants of acrosomal content, they might also contain abnormally distributed PLC $\zeta$ . Taken together, immunofluorescence and western blotting studies using mouse and human sperm clearly demonstrate that PLC $\zeta$  is absent, or its presence highly reduced, in *Dpy19l2*-dependent globozoospermic sperm.



**Figure 3** PLC $\zeta$  is absent in most *DPY19L2*-dependent globozoospermic human sperm. **(A1)** Sperm from a man with normal fertility. Sperm were stained with anti-hPLC $\zeta$  antibodies (green staining) and counterstained with Hoechst (blue). The equatorial and the acrosomal areas are marked. **(A2)** Enlargement of the red square in (A1). Total image length 14  $\mu$ m. **(A3)** Sperm from *DPY19L2*-deleted patients. Sperm were stained with anti-hPLC $\zeta$  antibodies (green staining) and counterstained with Hoechst (blue). No staining was detected in most sperm. **(A4)** Enlargement of the red square in (A3). Total image length 22  $\mu$ m. **(B1–B3)** Dot shape PLC $\zeta$  staining in globozoospermic sperm in two different subjects G1 and M1. **(C)** Only a small fraction of *DPY19L2*-dependent globozoospermic sperm present a punctiform staining in M1 and G1 subjects, in contrast to sperm from men presenting with normal fertility ( $n = 5$ ). There was a significant difference between sperm from control and *DPY19L2*-deleted men ( $P < 0.001$ ). **(D)** Sperm from a man with normal fertility were stained with anti-acrosin antibodies (magenta staining) and counterstained with Hoechst (blue) in order to show the acrosomal vesicle. **(E)** Contrary to control sperm from three different men with normal fertility, only around 15% of *DPY19L2*-dependent globozoospermic sperm from subjects M1 and G1 were stained with anti-acrosin antibody, identifying acrosomal buds **(F1–F2)**. There was a significant difference between sperm from control and *DPY19L2*-deleted men ( $P < 0.001$ ).



**Figure 4.** Immunogold localization of PLC $\zeta$  in ejaculated human sperm. **(A)** Gold particles targeting PLC $\zeta$  antigenic sites were observed along the IAM (blue arrows). About half of the gold particles were also observed at short distances associated with the acrosomal content or the perinuclear theca (red arrows). Scale bar 500 nm. **(B)** Quantification of the localization of 104 gold particles. Blue column corresponds to gold particles located along the IAM and red column to gold particles located in the acrosome or in the nuclear theca. **(C)** Box plot showing the repartition of the numerical values of the distances measured from particles located either in the acrosome (counted as positive) or in the nuclear theca (counted as negative). Nu, nucleus; Ac, acrosome; IAM, inner acrosomal membrane; PNM, perinuclear theca.

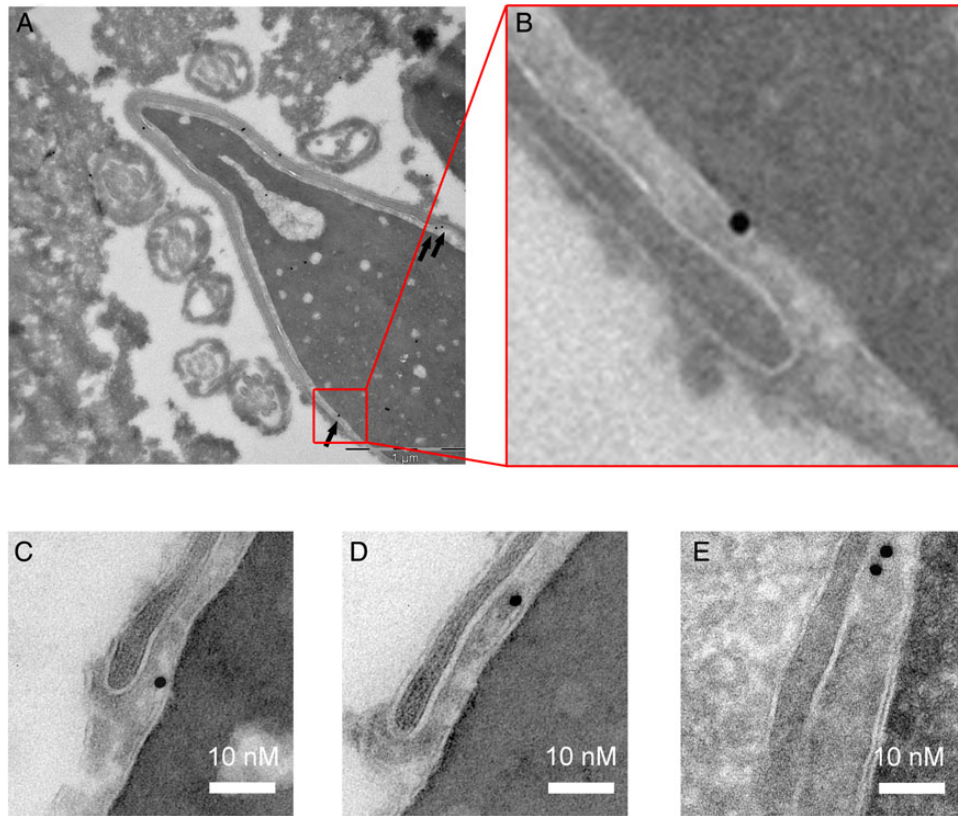
### PLC $\zeta$ localizes to the inner acrosomal membrane/perinuclear theca in the post-acrosomal region of human sperm

To determine the localization of PLC $\zeta$  at the ultrastructural level, we used electronic microscopy (EM) and the anti-hPLC $\zeta$  antibody subsequently revealed with protein A-gold conjugated (Fig. 4A). A total of 195 gold particles were studied and most of the gold particles were located around (104/195) or on (91/195) the inner acrosomal membrane (IAM) (Fig. 4B). Given that the observed position of the gold particles does not allow us to directly determine the precise localization of the antigenic site, i.e. PLC $\zeta$ , as due to the lengths of the two IgGs used in

the IgG-gold complexes ( $15 \text{ nm} \times 2 (\text{IgG} \times 2) = 30 \text{ nm}$ ), the gold particles actually fall in a circle of  $\sim 60 \text{ nm}$  diameter around the antigenic site, we estimated localization of PLC $\zeta$  by measuring the shortest distance from the edge of the gold particle to the line corresponding to the IAM; the distances were counted positively when heading toward the nucleus and negatively when heading toward the acrosome. Since the distribution of the gold particles in the circle is random, the median of the sample should be around 0 for a location on the IAM. A box plot corresponding to the numerical values of the distances of the 104 gold particles located around the IAM is shown in Fig. 4C and reveals a median of  $-6.7 \text{ nm}$  with the 10th/90th percentile values indicating that 80% of the gold particles fall inside the expected circle. This result strongly suggests that in mature sperm PLC $\zeta$  is located on the perinuclear theca side bound to the IAM. In addition, numerous gold particles and gold clusters were found at the end of the base of the acrosomal vesicle (Fig. 5A–E), which is consistent with immunofluorescence images in Fig. 3 and Supplementary Fig. S1, showing that PLC $\zeta$  staining is mostly located in the post-acrosomal area. It is worth noting that a few gold particles were found inside the nucleus (Figs. 4A and 5A), although the specificity of this location was considered weak, as similar density of gold particles was found outside of the cell (Fig. 5A). Finally, in control experiments which were incubated only with secondary gold conjugates, few gold particles were observed and at a very low density (Supplementary Fig. S3).

## Discussion

Globozoospermia is a rare, well-known and complex disease that causes male infertility and is associated with the loss of organelles and proteins during spermatogenesis. Nevertheless, the pathogenesis of the disease is not well-known and this was due in part to the failure to find the molecular defect(s) responsible for it. Indeed, several genes have been shown to be associated with globozoospermia-like infertility in the mouse, including *Csnk2a2* (casein kinase IIa), *Gopc* (Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing protein), *Hrb* (HIV-1 Rev binding protein), *Pick1* (protein interacting with C kinase 1), *Hsp90b1* (gp96; glucose-related protein 94 [Grp94]), *Vps54* (vacuolar protein sorting-associated protein 54) and sperm acrosome associated 1 (Spaca1) (Xu et al., 1999; Kang-Decker et al., 2001; Yao et al., 2002; Xiao et al., 2009; Audouard and Christians, 2011; Paiardi et al., 2011; Fujihara et al., 2012). Importantly, with the exception of a mutation in *PICK1* found in a Chinese family (Liu et al., 2010), the aforementioned genes do appear mutated in men with globozoospermia. In contrast, our recent studies identified the *Dpy19l2* gene as the main genetic cause of human globozoospermia (Harbuz et al., 2011; Coutton et al., 2012, 2013) and showed that the loss of this gene phenocopies globozoospermia in mice (Pierre et al., 2012) demonstrating that defects associated with the *DPY19L2* gene are the main cause of the disease in these species. Herein, we were able to compare human and mouse *DPY19L2* globozoospermia. We observed that mouse spermatozoa display complete absence of PLC $\zeta$  whereas  $\sim 10\%$  of human sperm showed traces of PLC $\zeta$  associated with small remnants of the acrosome. These observations are concordant with the findings of complete fertilization failure following ICSI in mice whereas fertilization was occasionally achieved in men. Furthermore, we identified the precise localization of PLC $\zeta$  in human sperm, which is attached to the IAM in the sperm head, and which helps to explain the mechanism leading to its disappearance during spermatogenesis of globozoospermic men.



**Figure 5.** Presence of numerous gold particles at the base of the acrosome vesicle is consistent with immunohistochemistry results showing post-acrosomal localization of PLC $\zeta$  in human sperm. **(A)** Gold particles targeting PLC $\zeta$  antigenic sites were often observed at the base of the acrosome (black arrows) in a control human sperm. **(B)** Enlargement of the red box drawn in **(A)**. **(C–E)** Examples of the presence of gold particles in the equatorial segment in different human sperm.

### The location of PLC $\zeta$ is consistent with its role as the sperm factor of mammalian sperm

Numerous studies have shown that PLC $\zeta$  is the likeliest candidate to be the sperm factor, and the strongest supporting data are provided by the ability of the recombinant protein or PLC $\zeta$  cRNA injection to initiate sperm-like oscillations (reviewed in [Amdani et al. \(2013\)](#)). In addition, immunoprecipitation studies have shown that removal of PLC $\zeta$  from sperm extracts depletes the ability of these extracts to initiate Ca<sup>2+</sup> oscillations or hydrolyze phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) ([Kurokawa et al., 2007](#)). Herein, we present evidence that the location of PLC $\zeta$  in mouse and human sperm is consistent with its role as the sperm factor. First, using EM, we showed that in human sperm the gold particles that evidence the recognition of PLC $\zeta$  by our specific antibody are located in the perinuclear theca facing the acrosome and are likely associated with the IAM and the perinuclear theca facing the acrosome. This location is consistent with previous results obtained by [Fujimoto et al](#) showing by mass spectrometry that all oocyte-activating fractions of perinuclear theca contain PLC $\zeta$  ([Fujimoto et al., 2004](#)). Further, because both IAM and perinuclear theca remain after the acrosome reaction, the PLC $\zeta$  associated with it would be available to be delivered after sperm–oocyte fusion. In addition, we found greater reactivity in the equatorial zone of the sperm, which is the area that first undergoes fusion with the oocyte, consistent with a role in

triggering Ca<sup>2+</sup> release following fusion of the gametes. Interestingly the equatorial zone remains relatively unaltered during the acrosome reaction in humans ([Zanetti and Mayorga, 2009](#)), which would preserve this PLC $\zeta$  pool. Lastly, we previously showed that in Dpy19l2-dependent globozoospermia, the separation of the nuclear envelope leads to the detachment of the whole acrosome, associated with the perinuclear theca and the outer nuclear envelope, with these structures being then discarded during elimination of the residual body during the compaction stage ([Escalier, 1990](#); [Pierre et al., 2012](#)). It is therefore likely possible that PLC $\zeta$  which is bound to the IAM is discarded from the cell during elimination of the residual body. Altogether, these data demonstrate for the first time a location of PLC $\zeta$  consistent with its role in human sperm.

While the evidence for PLC $\zeta$  is accumulating, a recent study has shown that another sperm protein may be capable of initiating oscillations in mouse and human eggs ([Aarabi et al., 2014](#)). In that study, it was shown that injection of a recombinant form of the sperm protein post-acrosomal WW binding protein (PAWP) triggered Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs, and oscillations were also induced in human eggs by injection of a cRNA encoding human PAWP. Further, a blocking peptide based on a WW binding motif present in PAWP inhibited oscillations initiated by injection of PAWP or by fertilization ([Aarabi et al., 2014](#)). Although these results are intriguing and represent the first step toward the validation



that PAWP may participate in the early stages of mammalian fertilization, important questions remain unanswered, including a very recent report that raises questions about PAWP's ability to initiate  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, as injection of mouse PAWP recombinant protein or cRNA failed to initiate oscillations in mouse eggs (Nomikos et al., 2014). Besides those results, other questions deserve consideration. For example, although oscillations are present in all mammals during fertilization, different species display distinct patterns of oscillations (Igusa and Miyazaki, 1986; Taylor et al., 1993; Halet et al., 2004; Malcuit et al., 2006). These patterns are faithfully replicated by injection of species-specific PLC $\zeta$  cRNAs (Saunders et al., 2002; Ito et al., 2008; Cooney et al., 2010; Sato et al., 2013), although thus far the oscillations induced by PAWP do not appear to show this degree of subtlety (Aarabi et al., 2014). Another important unknown about PAWP, and the suppression of oscillations by the inhibitor peptide, are the site of action. In other words, it was not shown whether or not the blocking peptide is actually binding PAWP or some other target or both. In the same vein, it is unknown whether or not PAWP is necessary to induce oscillations during fertilization. Toward that end, it would be useful to determine if anti-PAWP-specific antibodies could be used to deplete the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -oscillation inducing activity present in mammalian sperm extracts. If this turns out to be the case, as shown to be the case for PLC $\zeta$  (Saunders et al., 2002; Kurokawa et al., 2007), it will represent a compelling result, which will require elucidation of the mechanism by which it triggers oscillations in mammals.

### Oocyte activation by human globozoospermic sperm

Unlike ICSI with *Dpy19l2* KO mouse sperm, ICSI with globozoospermic human sperm induced oocyte activation in 53% of cycles (7/13, see Table 1 Number 2-PN embryos), although only  $7.25\% \pm 9.76$  of the MII oocytes formed 2-PN embryos (total MII oocytes: 139 obtained in 13 different cycles). The females involved in this cohort were young (mean age  $30.23 \pm 4.28$ ) and presented no evidence of infertility, which highlights the low activation rates in these couples compared with couples with a tuboperitoneal female factor and normal spermatogram, whose activation rates after ICSI are  $\sim 70\%$  (Bukulmez et al., 2000). These low fertilization rates are consistent with previous publications examining non-genotyped globozoospermic patients (Liu et al., 1995; Battaglia et al., 1997). It is notable that despite near complete absence of PLC $\zeta$  in the sperm of our patients, some oocytes became activated. Although the oolema deformation and the subsequent rupture of the membrane caused by the ICSI procedure cause  $\text{Ca}^{2+}$  influx, it is generally not sufficient to activate human oocytes (Tesarik et al., 1994; Sato et al., 1999). Nevertheless, it is possible that in some cases, this  $\text{Ca}^{2+}$  influx together with the low traces of PLC $\zeta$  associated with acrosomal buds might be capable of supporting oocyte activation. The importance of acrosomal buds in oocyte activation was initially suggested in a SPATA16/DPY19L2 negative globozoospermic patient (Sermondade et al., 2011) and confirmed later in non-genotyped globozoospermic patients by Kashir et al, showing that sperm exhibiting an acrosomal bud presented a punctate pattern of PLC $\zeta$  staining within the head (Kashir et al., 2012). Finally, there appears to be a clear correlation in Table 1 between the number of MII oocytes retrieved and the occurrence of 2-PN embryos, the correlation coefficient between MII oocytes and 2-PN embryos being 0.87. This observation suggests that the ability of globozoospermic sperm to activate the eggs is dependent on the number of

retrieved oocytes. It may reflect either a difference in oocyte quality or a higher chance that those eggs were injected with sperm with an acrosomal bud. This observation deserves further study.

In conclusion, this study shows that PLC $\zeta$  is absent or greatly reduced in DPY19L2-deficient sperm. Moreover, for the first time we demonstrate the subcellular location of PLC $\zeta$  in human sperm, which is consistent with its role as the sperm factor and its absence in *Dpy19l2*-dependent globozoospermic sperm.

## Supplementary data

Supplementary data are available at <http://molehr.oxfordjournals.org/>.

## Acknowledgements

We are grateful to the patients who gave their informed consent to the use of their samples for research. We thank Dominique Alfordari for technical assistance. We also thank clinicians from the reproductive clinics (Pascale Hoffman, Ulrike Bergues and Dr B. Courbière) and C. Metton and M.J. Fays-Bernardin for technical assistance and Germetheque support.

## Authors' roles

J.E. and H.C.L. performed ICSI experiments. J.D. and K.P.G. performed EM experiments. S.Y. and J.E. performed confocal experiments on PLCzeta localization and sperm DNA compaction, and WB experiments. R.Z., S.H. and C.M.G. provided clinical data and human sperm samples. G.M., C.C. and T.K. were responsible of molecular biology experiments. P.F.R., R.F. and C.A. coordinated the study. P.F.R., R.F. and C.A. contributed to discussion, design and interpretation of data. C.A. and R.F. wrote the manuscript.

## Funding

This study was supported by grants from Gravit Foundation (to C.A.), the Agence National de la Recherche (Grant ICG21 to P.F.R. and C.A.) and NIH (Grant number: R01 HD051872 to R.F.).

## Conflict of interest

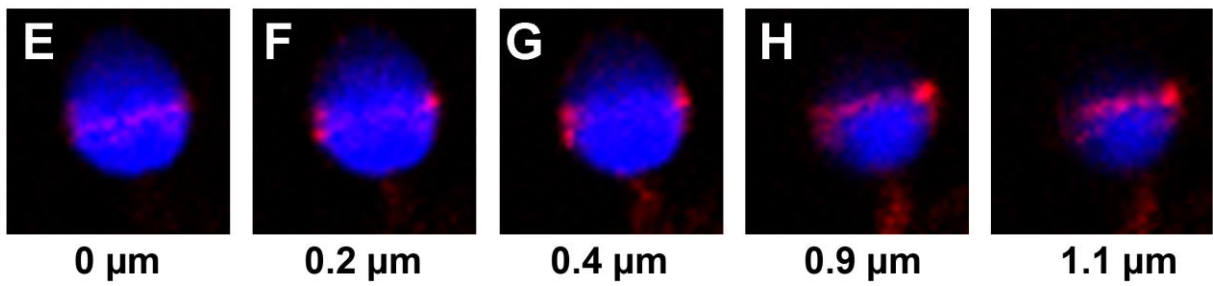
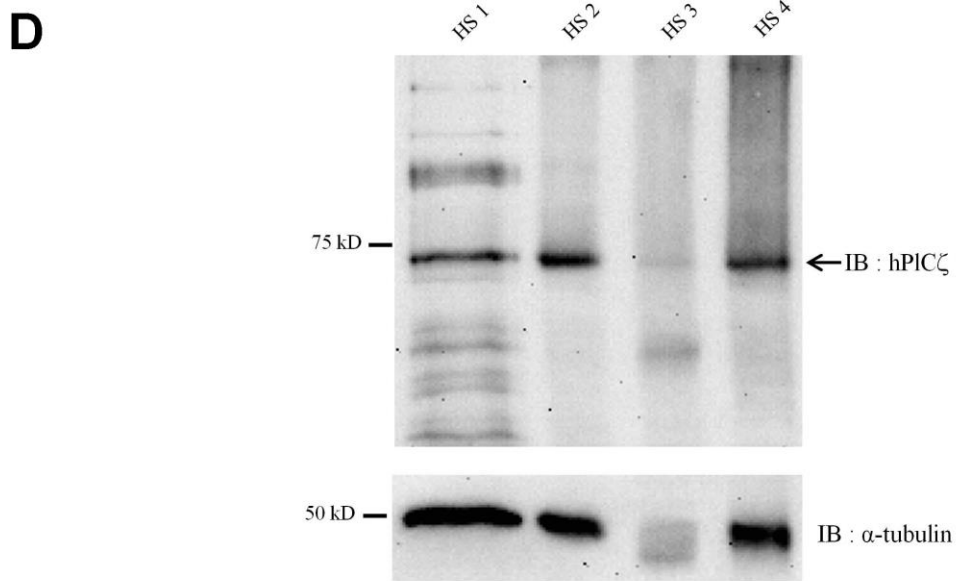
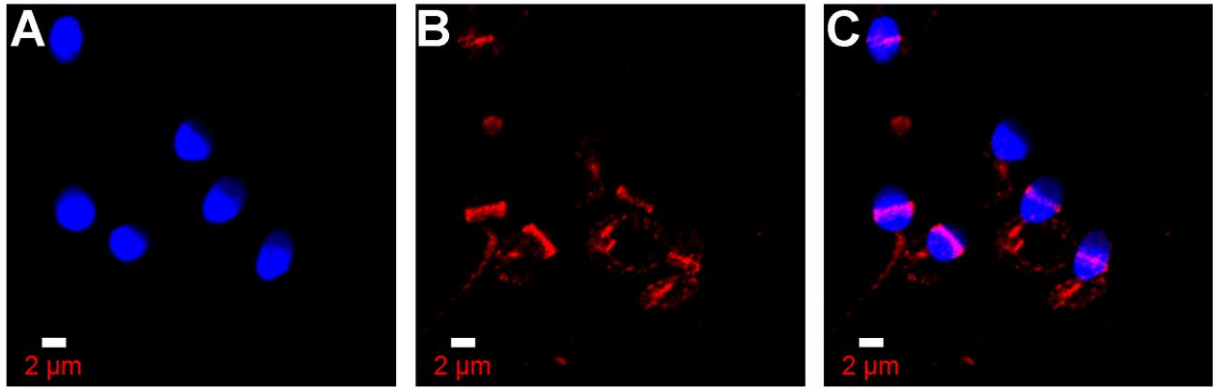
None declared.

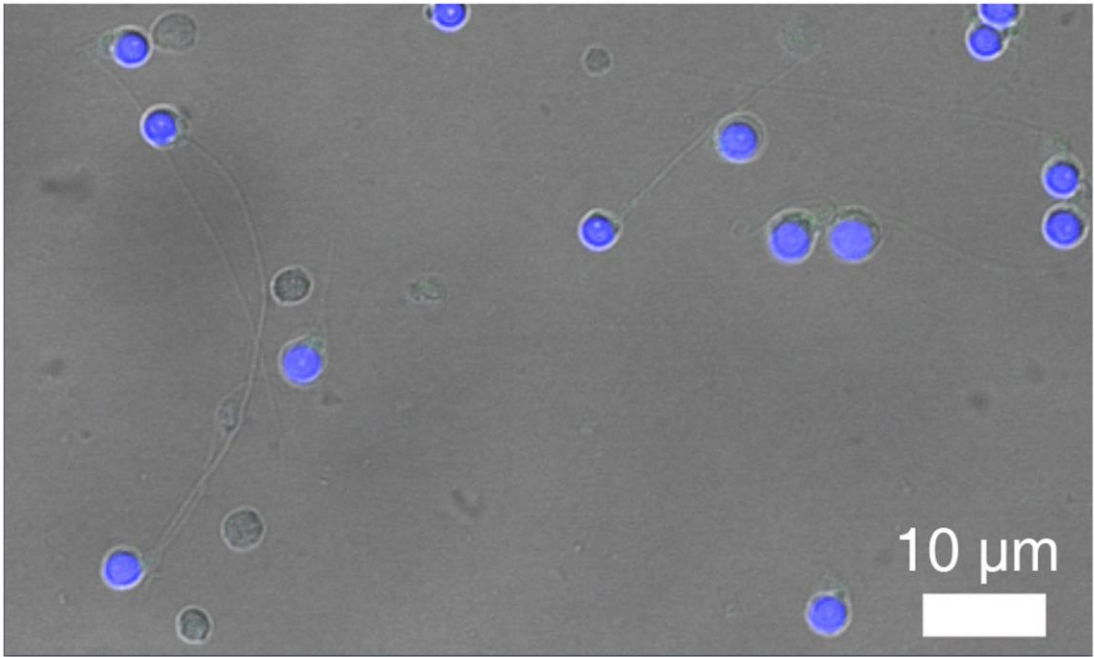
## References

- Aarabi M, Balakier H, Bashar S, Moskovtsev SI, Sutovsky P, Librach CL, Oko R. Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J* 2014;**28**:4434–4440.
- Amdani SN, Jones C, Coward K. Phospholipase C zeta (PLCzeta): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul* 2013; **53**:292–308.
- Audouard C, Christians E. Hsp90beta1 knockout targeted to male germline: a mouse model for globozoospermia. *Fertil Steril* 2011;**95**:1475–1477.
- Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil Steril* 1997;**68**:118–122.

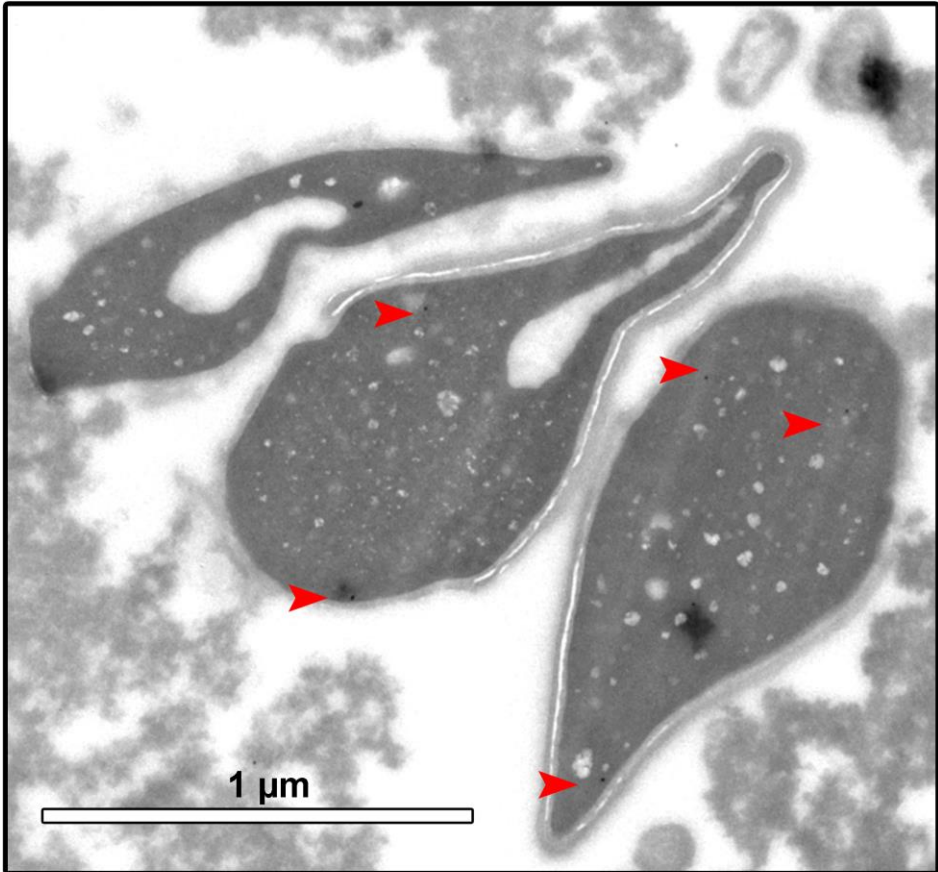
- Bukulmez O, Yarali H, Yucel A, Sari T, Gurgan T. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization for patients with a tubal factor as their sole cause of infertility: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril* 2000;**73**:38–42.
- Cooney MA, Malcuit C, Cheon B, Holland MK, Fissore RA, D'Cruz NT. Species-specific differences in the activity and nuclear localization of murine and bovine phospholipase C zeta 1. *Biol Reprod* 2010;**83**:92–101.
- Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, Triki C, Escalier D, Hesters L, Mitchell V, Levy R et al. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod* 2012;**27**:2549–2558.
- Coutton C, Abada F, Karaouzene T, Sanlaville D, Satre V, Lunardi J, Jouk PS, Arnout C, Thierry-Mieg N, Ray PF. Fine characterisation of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population. *PLoS Genet* 2013;**9**:e1003363.
- Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA. Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update* 2007a;**13**:63–75.
- Dam AH, Kosciński I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, Tournaye H, Charlet N, Lagier-Tourenne C, van Bokhoven H et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2007b;**81**:813–820.
- Elinati E, Kuentz P, Redin C, Jaber S, Vanden Meerschaut F, Makarian J, Kosciński I, Nasr-Esfahani MH, Demirolo A, Gurgan T et al. Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum Mol Genet* 2012;**21**:3695–3702.
- Escalier D. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int J Dev Biol* 1990;**34**:287–297.
- Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development* 2012;**139**:3583–3589.
- Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, Izumi T, Perry AC. Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol* 2004;**274**:370–383.
- Grasa P, Coward K, Young C, Parrington J. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Czeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum Reprod* 2008;**23**:2513–2522.
- Halet G, Tunwell R, Parkinson SJ, Carroll J. Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca $^{2+}$  oscillations at fertilization in mouse eggs. *J Cell Biol* 2004;**164**:1033–1044.
- Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, Merdassi G, Abada F, Escoffier J, Nikas Y et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 2011;**88**:351–361.
- Heytens E, Parrington J, Coward K, Young C, Lambrecht S, Yoon SY, Fissore RA, Hamer R, Deane CM, Ruas M et al. Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* 2009;**24**:2417–2428.
- Heytens E, Schmitt-John T, Moser JM, Jensen NM, Soleimani R, Young C, Coward K, Parrington J, De Sutter P. Reduced fertilization after ICSI and abnormal phospholipase C zeta presence in spermatozoa from the wobbler mouse. *Reprod Biomed Online* 2010;**21**:742–749.
- Igusa Y, Miyazaki S. Periodic increase of cytoplasmic free calcium in fertilized hamster eggs measured with calcium-sensitive electrodes. *J Physiol* 1986;**377**:193–205.
- Ito M, Shikano T, Oda S, Horiguchi T, Tanimoto S, Awaji T, Mitani H, Miyazaki S. Difference in Ca $^{2+}$  oscillation-inducing activity and nuclear translocation ability of PLCZ1: an egg-activating sperm factor candidate, between mouse, rat, human, and medaka fish. *Biol Reprod* 2008;**78**:1081–1090.
- Kang-Decker N, Mantchev GT, Juneja SC, McNiven MA, van Deursen JM. Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* 2001;**294**:1531–1533.
- Karaca N, Yilmaz R, Kantan GE, Kervancioglu E, Solakoglu S, Kervancioglu ME. First successful pregnancy in a globozoospermic patient having homozygous mutation in SPATA16. *Fertil Steril* 2014;**102**:103–107.
- Kashir J, Sermondade N, Sifer C, Oo SL, Jones C, Mounce G, Turner K, Child T, McVeigh E, Coward K. Motile sperm organelle morphology evaluation-selected globozoospermic human sperm with an acrosomal bud exhibits novel patterns and higher levels of phospholipase C zeta. *Hum Reprod* 2012;**27**:3150–3160.
- Kosciński I, Elinati E, Fossard C, Redin C, Muller J, Velez de la Calle C, Schmitt F, Ben Khelifa M, Ray PF, Kilani Z et al. DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2011;**88**:344–350.
- Kurokawa M, Sato K, Wu H, He C, Malcuit C, Black SJ, Fukami K, Fissore RA. Functional, biochemical, and chromatographic characterization of the complete [Ca $^{2+}$ ] $_i$  oscillation-inducing activity of porcine sperm. *Dev Biol* 2005;**285**:376–392.
- Kurokawa M, Yoon SY, Alfandari D, Fukami K, Sato K, Fissore RA. Proteolytic processing of phospholipase Czeta and [Ca $^{2+}$ ] $_i$  oscillations during mammalian fertilization. *Dev Biol* 2007;**312**:407–418.
- Lee HC, Army M, Grow D, Dumesic D, Fissore RA, Jellerette-Nolan T. Protein phospholipase C Zeta1 expression in patients with failed ICSI but with normal sperm parameters. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:749–756.
- Liou W, Geuze HJ, Slot JW. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol* 1996;**106**:41–58.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Devroey P, Van SA. Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod* 1995;**10**:626–629.
- Liu G, Shi QW, Lu GX. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl* 2010;**12**:556–560.
- Lundin K, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L. Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* 1994;**62**:1266–1267.
- Malcuit C, Maserati M, Takahashi Y, Page R, Fissore RA. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal [Ca $^{2+}$ ] $_i$  responses and oocyte activation. *Reprod Fertil Dev* 2006;**18**:39–51.
- Nomikos M, Sanders JR, Theodoridou M, Kashir J, Matthews E, Nounesis G, Lai FA, Swann K. Sperm-specific post-acrosomal WW-domain binding protein (PAWP) does not cause Ca $^{2+}$  release in mouse oocytes. *Mol Hum Reprod* 2014;**20**:938–947.
- Paiardi C, Pasini ME, Gioria M, Berruti G. Failure of acrosome formation and globozoospermia in the wobbler mouse, a Vps54 spontaneous recessive mutant. *Spermatogenesis* 2011;**1**:52–62.
- Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroche J, Yassine S, Novella C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Arnout C. Absence of Dpy19L2: a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 2012;**139**:2955–2965.
- Sato MS, Yoshitomo M, Mohri T, Miyazaki S. Spatiotemporal analysis of [Ca $^{2+}$ ] $_i$  rises in mouse eggs after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* 1999;**26**:49–58.
- Sato K, Wakai T, Seita Y, Takizawa A, Fissore RA, Ito J, Kashiwazaki N. Molecular characteristics of horse phospholipase C zeta (PLCzeta). *Anim Sci J* 2013;**84**:359–368.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royle J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002;**129**:3533–3544.

- Sermondade N, Haffouf E, Dupont C, Bechoua S, Palacios C, Eustache F, Poncelet C, Benzacken B, Levy R, Sifer C. Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Hum Reprod* 2011;**26**:2944–2949.
- Taylor CT, Lawrence YM, Kingsland CR, Biljan MM, Cuthbertson KS. Oscillations in intracellular free calcium induced by spermatozoa in human oocytes at fertilization. *Hum Reprod* 1993;**8**:2174–2179.
- Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellerette T, Fissore RA, Oehninger S. Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:559–564.
- Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994;**9**:511–518.
- Xiao N, Kam C, Shen C, Jin W, Wang J, Lee KM, Jiang L, Xia J. PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest* 2009;**119**:802–812.
- Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet* 1999;**23**:118–121.
- Yao R, Ito C, Natsume Y, Sugitani Y, Yamanaka H, Kuretake S, Yanagida K, Sato A, Toshimori K, Noda T. Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;**99**:11211–11216.
- Yoon SY, Fissore RA. Release of phospholipase C zeta and  $[Ca^{2+}]_i$  oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction* 2007;**134**:695–704.
- Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, Lee HC, Yoo MS, Coward K, Parrington J, Grow D, Cibelli JB, Visconti PE et al. Human sperm devoid of PLC, zeta I fail to induce  $Ca^{2+}$  release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest*, 2008;**118**:3671–3681.
- Yoshida N, Perry AC. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc* 2007;**2**:296–304.
- Young C, Grasa P, Coward K, Davis LC, Parrington J. Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril* 2009;**91**:2230–2242.
- Zanetti N, Mayorga LS. Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* 2009;**81**:396–405.
- Zhu F, Gong F, Lin G, Lu G. DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Mol Hum Reprod* 2013;**19**:395–404.





Secondary antibody only



Escoffier et al, Supp figure 3

**Article 4:** «Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damages that compromises the initiation of embryo development».

*Sandra YASSINE<sup>1,2,#</sup>, Jessica ESCOFFIER<sup>1,2,#</sup>, Guillaume MARTINEZ<sup>1,2</sup>, Charles COUTTON<sup>1,2,3,6</sup>, Thomas KARAOUZÈNE<sup>1,2</sup>, Raoudha ZOUARI<sup>4</sup>, Jean-Luc RAVANAT<sup>1,5,7</sup>, Catherine METZLERGUILLEMAIN<sup>6,7</sup>, Rafael FISSORE<sup>8</sup>, Sylviane HENNEBICQ<sup>1,9</sup>, Pierre F. RAY<sup>1,2,10,8</sup>, and Christophe ARNOULT<sup>1,2,\*</sup>*

**Résumé :**

Nous avons montré, dans une étude précédente que la PLC  $\zeta$  est absente ou son expression est fortement réduite au niveau de la tête des spermatozoïdes globocéphales chez l'homme et chez la souris. L'injection de l'ARNm de la PLC  $\zeta$  dans le cytoplasme de l'ovocyte, en même temps que le spermatozoïde de souris *Dpy19l2*<sup>-/-</sup>, n'a pas pu restaurer un développement embryonnaire normal chez la souris, bien que l'activation ovocytaire soit normale. Ce résultat a suggéré que le génome paternel pourrait être endommagé, et que l'ovocyte serait incapable de réparer les défauts de l'ADN spermatique. Pour cette raison, l'objectif de ce travail, était donc de réaliser une étude comparative des étapes principales de la condensation du génome spermatique lors de la spermiogenèse des souris mâles WT et *Dpy19l2*<sup>-/-</sup>. Nous montrons que plusieurs étapes de compaction de l'ADN sont défectueuses, y compris l'invasion nucléaire par les protamines et la présence accrue des cassures de l'ADN des spermatozoïdes globozoospermiques. Ces résultats confirment l'analyse de la maturité nucléaire des spermatozoïdes WT et *Dpy19l2*<sup>-/-</sup>, par les deux tests CMA3 et bleu d'aniline, qui ont montré un défaut de protamination du génome paternel ainsi qu'une rétention des histones, indiquant une mauvaise compaction du génome. Ces défauts ainsi que la déficience en PLC  $\zeta$ , sont susceptibles d'expliquer l'échec de la fécondation après ICSI, et le développement très réduit des embryons issus des patients déficients pour le gène *DPY19L2* ainsi que des souris *Dpy19l2*<sup>-/-</sup>.





# Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development

Sandra Yassine<sup>1,2,†</sup>, Jessica Escoffier<sup>1,2,†</sup>, Guillaume Martinez<sup>1,2</sup>, Charles Coutton<sup>1,2,3</sup>, Thomas Karaouzène<sup>1,2</sup>, Raoudha Zouari<sup>4</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>1,5</sup>, Catherine Metzler-Guillemain<sup>6,7</sup>, Hoi Chang Lee<sup>8</sup>, Rafael Fissore<sup>8</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>1,9</sup>, Pierre F. Ray<sup>1,2,10</sup>, and Christophe Arnoult<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université Grenoble Alpes, Grenoble, F-38000, France <sup>2</sup>Equipe 'Andrologie, Génétique et Cancer' Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405, La Tronche, F-38700, France <sup>3</sup>CHU de Grenoble, UF de Génétique Chromosomique, Grenoble, F-38000, France <sup>4</sup>Clinique des Jasmins, 23, Av. Louis BRAILLE, 1002 Tunis, Tunisia <sup>5</sup>Laboratoire Lésions des Acides Nucléiques, CEA, INAC-SCIB, F-38000 Grenoble, France <sup>6</sup>Aix-Marseille Université-Inserm UMR 910, Génétique médicale et Génétique Fonctionnelle, 13385 Marseille Cedex 5, France <sup>7</sup>APHM Hôpital La Conception, Gynépôle, Laboratoire de Biologie de la Reproduction – CECOS, 13385 Marseille Cedex 5, France <sup>8</sup>Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, 661 North Pleasant Street, Amherst, MA 01003, USA <sup>9</sup>CHU de Grenoble, Centre d'AMP-CECOS, BP217, Grenoble Cedex 9, F-38043, France <sup>10</sup>CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, F-38000, France

\*Correspondence address. AGIM, Equipe 'Andrologie, Génétique et Cancer', Faculté de Médecine, 38700 La Tronche, France. Tel: +33-4-76-63-74-08; E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

Submitted on August 28, 2014; resubmitted on October 13, 2014; accepted on October 24, 2014

**ABSTRACT:** We recently identified the *DPY19L2* gene as the main genetic cause of human globozoospermia. Non-genetically characterized cases of globozoospermia were associated with DNA alterations, suggesting that *DPY19L2*-dependent globozoospermia may be associated with poor DNA quality. However the origins of such defects have not yet been characterized and the consequences on the quality of embryos generated with globozoospermic sperm remain to be determined. Using the mouse model lacking *Dpy19l2*, we compared several key steps of nuclear compaction. We show that the kinetics of appearance and disappearance of the histone H4 acetylation waves and of transition proteins are defective. More importantly, the nuclear invasion by protamines does not occur. As a consequence, we showed that globozoospermic sperm presented with poor sperm chromatin compaction and sperm DNA integrity breakdown. We next assessed the developmental consequences of using such faulty sperm by performing ICSI. We showed in the companion article that oocyte activation (OA) with globozoospermic sperm is very poor and due to the absence of phospholipase C $\zeta$ ; therefore artificial OA (AOA) was used to bypass defective OA. Herein, we evaluated the developmental potential of embryos generated by ICSI + AOA in mice. We demonstrate that although OA was fully rescued, preimplantation development was impaired when using globozoospermic sperm. In human, a small number of embryos could be generated with sperm from *DPY19L2*-deleted patients in the absence of AOA and these embryos also showed a poor developmental potential. In conclusion, we show that chromatin compaction during spermiogenesis in *Dpy19l2* KO mouse is defective and leads to sperm DNA damage. Most of the DNA breaks were already present when the sperm reached the epididymis, indicating that they occurred inside the testis. This result thus suggests that testicular sperm extraction in *Dpy19l2*-dependent globozoospermia is not recommended. These defects may largely explain the poor embryonic development of most mouse and human embryos obtained with globozoospermic sperm.

**Key words:** male infertility / globozoospermia / *Dpy19l2* / DNA compaction / protamine

† Shared first authorship.

## Introduction

The sperm epigenome presents several peculiarities, due to the great compaction of the nucleus during spermiogenesis. Indeed, the sperm genome undergoes a complete chromatin remodeling during post-meiotic differentiation. The most significant of these events are (i) an almost genome-wide removal of histones and their replacement by protamines (Prms), (ii) nucleosome retention at specific genomic loci, likely linked with early paternal gene activation after fertilization (Arpanahi et al., 2009; Hammoud et al., 2009) and (iii) the presence within the sperm of specific small regulating RNAs, known to modulate gene expression and embryo development after fertilization (Dadoune, 2009). It is now recognized that the whole paternal epigenome plays an important role in the developing embryo (Miller et al., 2010; Jenkins and Carrell, 2012). However, although the current literature provides strong evidence for a relationship between male infertility and dysregulation of sperm epigenetic marks (Cho et al., 2001; Oliva, 2006), our knowledge of the role of paternal epigenetic marks during the different steps of embryonic development and their evolution during embryogenesis remains poor. More importantly, the long-term consequences of male epigenetic dysregulation are unknown and may lead to pathological phenotypes in offspring. These questions are highly important for human reproduction because ICSI, necessary to treat teratozoospermic patients, uses sperm which very often present multiple and severe DNA defects. In consequence, efforts should be made to characterize the pathological epigenetic landscape of sperm chromatin (DNA breaks, compaction and epigenetic defects) in the context of male infertility and to understand the etiology of these abnormal profiles.

In the last few years we have focused our attention on a specific type of teratozoospermia, namely globozoospermia (MIM #613958), which is characterized by the presence in the ejaculate of a large majority of round spermatozoa devoid of an acrosome. We demonstrated that genetic defects of *DPY19L2* were identified in >70% of men presenting with globozoospermia indicating that *DPY19L2* represents the main cause of this teratozoospermia (Harbuz et al., 2011; Coutton et al., 2012, 2013). Two other genes are also involved in type I globozoospermia, *SPATA16* and *PICK1*, but with a lower incidence (Dam et al., 2007; Liu et al., 2010). If the absence of an acrosome is the main feature of globozoospermic sperm, previous cases reports have shown that the chromatin of globozoospermic sperm presents defective condensation and DNA alterations (Baccetti et al., 1996; Vicari et al., 2002; Vozdova et al., 2013). These results suggest that *Dpy19l2*-dependent globozoospermia is also associated with poor sperm DNA quality. However, this hypothesis is based on only a few case descriptions, which were performed without neither the identification of the genetic etiology nor the precise characterization of the DNA alterations. The DNA quality of *DPY19L2*-dependent globozoospermic sperm remains thus to be assessed. Moreover, the origins of such defects have not been characterized and, finally, the consequences on the quality of embryos generated with *DPY19L2*-dependent globozoospermic sperm remain to be determined.

Because of the absence of an acrosome in globozoospermic sperm, production of embryos requires the use of ICSI. Indeed, before the development of assisted reproductive techniques (ART), and more particularly ICSI, the treatment of globozoospermia was not possible and affected men remained sterile. Although several teams reported

successful pregnancy and offspring from men with globozoospermia using ICSI (Lundin et al., 1994); the overall rate of success of ICSI with globozoospermic sperm remained very low (Liu et al., 1995; Battaglia et al., 1997). In the accompanying report, we demonstrated that the absence of oocyte activation (OA), associated with *Dpy19l2*-dependent globozoospermic sperm is in fact due to the absence of phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ) (Escoffier et al., companion article). The lack of OA in globozoospermic cases can be circumvented with artificial oocyte activation (AOA) using Ca<sup>2+</sup> ionophore (Liu et al., 1995; Battaglia et al., 1997; Tejera et al., 2008; Kyono et al., 2009; Taylor et al., 2010). A recent study on *DPY19L2*-dependent globozoospermic patients showed that AOA rescues fertilization and allows a significantly improved fertilization and delivery rate (Kuentz et al., 2013). However, the delivery rate remains relatively low in cases of ICSI performed with globozoospermic sperm + AOA, reaching 31% (mean female age 29.7 years) (Kuentz et al., 2013) compared with a 45.9% (age <35 years) in a large study of control cohort patients (Palermo et al., 2009), suggesting that embryonic development is somehow defective following conception using globozoospermic sperm. Recently, a *Dpy19l2* knock-out (KO) mouse has become available and its reproductive phenotype is remarkably similar to the human disease: males are completely infertile, with 100% globozoospermic sperm (Pierre et al., 2012). This model therefore represents an opportunity (i) to characterize the DNA quality of *Dpy19l2* KO sperm, (ii) to unravel the reasons behind the abnormalities of DNA organization in globozoospermic sperm and (iii) to evaluate the developmental potential of preimplantation embryos conceived with *Dpy19l2*-deficient sperm.

In this paper, using the KO mouse model, we show that several DNA compaction stages are defective. We note in particular that the protamines fail to invade the nucleus during the last stage of compaction leading to a defective nuclear compaction and the occurrence of DNA breaks. This defective compaction largely explains the poor sperm chromatin compaction and sperm DNA integrity breakdown of *Dpy19l2*-deficient mature sperm. We also show that the development of mouse embryos generated by ICSI and AOA from *Dpy19l2* KO sperm and of human embryos generated by ICSI from sperm of *DPY19L2*-deleted patients were severely impaired. Collectively, our data provide important new insights into the molecular pathogenesis of *DPY19L2*-dependent globozoospermia, which should lead to improved therapeutic strategies and sheds light on the mechanisms that regulate the organization of the sperm head.

## Materials and Methods

### Biological samples

Human Sperm were obtained from patients consulting at the fertility department of Grenoble and Marseille Hospitals (France) or Clinique des Jasmins (Tunis, Tunisia), following approval by the ethical committee and informed consent from the patients. All patients gave an informed consent for the conservation of the remnant sperm in the Germetheque biobank and their use in studies on human fertility in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 on human experimentation. The Germetheque Scientific Committee approved the present study design. Globozoospermic patients underwent a genetic analysis as previously described (Harbuz et al., 2011) and homozygously *DPY19L2*-deleted patients were selected. Human sperm were collected by masturbation and washed twice in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS). All animal procedures were performed according

to French and to IACUC UMASS guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the respective local ethical review committees (Grenoble-Institut des Neurosciences – ethical committee, agreement number 004). *Dpy1912* KO mice were obtained from Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC), University of California, Davis, CA, USA. First, epididymis was isolated and sperm were collected from the different parts of the epididymis (caput, corpus, or cauda) by direct puncture in M2 medium. Sperm were allowed to swim for 10 min and collected by centrifugation at 500 g.

## Gradation of human embryos

Grade I embryos had even, regular, spherical blastomeres with < 10% fragmentation; grade II embryos had uneven or irregular blastomeres with < 10% fragmentation; grade III embryos had blastomeres in grade II condition with 10–50% fragmentation and grade IV embryos had > 50% fragmentation or developmental arrest.

## Spermatogenic cell preparation

C57BL6 male or *Dpy1912* KO mice (8 weeks old) were killed by cervical dislocation. The testes were surgically removed and placed in PBS (at room temperature). The tunica albuginea was removed from the testes with sterile forceps and discarded. Then, the testes were incubated in 1 mg/ml of collagenase solution in EKR cell buffer containing in mM 2 CaCl<sub>2</sub>, 12.1 Glucose, 10 HEPES, 5 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 6 Na-Lactate, 150 NaCl, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 NaHCO<sub>3</sub> pH 7, and agitated horizontally at a maximum of 120 rpm for 30 min at 25°C. The dispersed seminiferous tubules were then washed with PBS and cut thinly. Cells were dissociated by gently pipetting, filtered through a 100 µm filter and then pelleted by centrifugation at 500 g for 10 min. Cells were suspended in 1 ml PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) solution, washed with PBS and finally layered onto polylysine-coated slides.

## Collection of gametes for ICSI

Sperm from caudae epididymides of different mouse strains (*Dpy1912* KO and WT B6D2F1) were allowed to swim for 10 min at 37°C in 1 ml of NIM medium containing (in mM) KCl 125, NaCl 2.6, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4 and EDTA 3 (pH 7.0). Sperm were then washed twice by centrifugation at 500 g with NIM medium, then resuspended in 100 µl NIM + 12% PVP (PVP360 sigma) medium. The sperm head was separated from the tail by the application of several piezo pulses (PiezoXpert<sup>®</sup>, Eppendorf) or by sonication (2 × 15 s).

## Oocyte preparation

B6D2F1 female mice, 7–11 weeks old, were superovulated by IP injection of 7.5 IU pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG; Intervet) followed by 7.5 IU HCG (Intervet) 48 h later. Oocytes were collected from oviducts about 14 h after hCG injection. Cumulus cells were removed with 0.1% bovine testicular hyaluronidase (300 USP U/mg; ICN Biochemicals, Costa Mesa, CA, USA) in M2 medium for 5–10 min. Oocytes were rinsed thoroughly and kept in M2 at 15°C for at least 15 min until required for ICSI.

## Media

M2 medium (Sigma) and CZB.HEPES (CZB.H, in mM) (HEPES 20, NaCl 81.6, KCl 4.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, EDTA.Na<sub>2</sub> 0.1, Na-lactate 31, NaHCO<sub>3</sub> 5, Na-pyruvate 0.3, polyvinyl alcohol 0.1 mg/ml, phenol red 10 mg/ml (0.5% (w/v) in DPBS), pH 7.4) was used for gamete handling and ICSI in air. KSOM (100×, Life technologies) supplemented with 1% essential amino acids (100×, Life technologies) were used for embryo culture (KSOM/EAA).

## ICSI procedures

ICSI was performed according to the method described by Yoshida and Perry (2007). For microinjection, sperm were stored in 50 µl of NIM, 12% PVP medium supplemented with 0.3 µg/µl of complementary RNA (cRNA) PLCζ depending on the experimental design and moved directly to the injection chamber. Sperm were introduced into the ooplasm using micromanipulators (Micromanipulator InjectMan<sup>®</sup>, Eppendorf) mounted on an inverted Nikon TMD microscope. The sperm suspension was replaced every 30 min during the ICSI experiment. Oocytes that survived the ICSI procedure were incubated in KSOM/EAA medium at 37°C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Pronucleus formation was checked at 6 h after ICSI, and outcomes were scored up to the blastocyst stage.

## Parthenogenetic oocyte activation experiments

Oocytes were activated by injection of cRNA PLCζ (0.3 µg/µl, concentration in the pipette) into the ooplasm or by incubating them in Ca<sup>2+</sup>-free CZB supplemented with 10 mM SrCl for 2 h at 37.5°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub>. After Sr<sup>2+</sup> treatment or cRNA microinjection, oocytes were cultured in KSOM/EAA. The media for Sr<sup>2+</sup> activation was supplemented with 5 µg/ml cytochalasin B (CB) to prevent second polar body extrusion and diploidize the parthenotes. The cRNA PLCζ injection volume was 5–10 pl, which is ~1–3% of the total egg volume. Pronucleus formation was checked at 6 h after ICSI, and outcomes were scored up to the blastocyst stage.

## Messenger RNA preparation

Complementary DNA (cDNA) encoding for full-length mouse PLCζ I (GenBank Accession number AF435950; a gift from K. Fukami, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, Tokyo, Japan) was amplified by PCR and cloned into the pCS2+ vector. In brief, the cDNA was linearized at the NotI site, and transcribed *in vitro* using the mMessage/mMachine capping kit (Ambion, Austin, TX, USA). Capped and poly(A)-tailed cRNAs were purified from the reaction mixture using the MEGAclean Kit (Ambion). The cRNAs were eluted with diethylpyrocarbonate-treated H<sub>2</sub>O and, if necessary, further diluted with it before microinjection.

## Immunofluorescence and histology

Testes were fixed for 24 h in 4% PFA. Tissue was dehydrated in a graded ethanol series, embedded in paraffin (Leica TP1020 and EGI 150) and sectioned (4 µm thickness) onto slides (Leica RM2245). For histology studies, sections were stained via an automated slides stainer (Leica Autostainer XL V2.2). For immunohistochemistry, heat antigen retrieval was performed by boiling slides immersed in 0.01 M sodium citrate buffer, 0.05% Tween 20, pH 6.0 for ~25 min. For sperm immunofluorescence studies, sperm were fixed with in PBS/4% PFA for 1 min at room temperature. After washing in 1 ml PBS, the sperm suspension was spotted onto 0.1% poly L-lysine pre-coated slides (Thermo Scientific). After attachment, sperm or spermatogenic cells were permeabilized with 0.1% (v/v) Triton X-100–DPBS (Triton X-100; Sigma-Aldrich) for 5 min at room temperature. Slides were then blocked in the corresponding 5% normal serum–DPBS (normal goat or donkey serum; GIBCO, Invitrogen) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. For Prm1 and Prm2 detection, heat antigen retrieval was associated with DNA decondensation in 10 mM Dithiothreitol, 0.1 M Tris–HCl (pH 8.0) for 1 h at room temperature. After decondensation, the slides were washed twice in deionized water before starting immunofluorescence experiments. Washes were performed with 0.1% (v/v) Tween 20–DPBS, followed by 1 h incubation at room temperature with Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit or Dylight 488-labeled goat anti-rabbit (1:400) secondary antibodies. Samples were counterstained with

5 µg/ml Hoechst 33342 and mounted with DAKO mounting media (Life technology). Control sections were incubated with PBS containing 0.1% Triton and the corresponding normal serum without the primary antibody.

Fluorescence images were captured with confocal microscopy (Zeiss LSM 710) outfitted with a 63 × oil immersion objective for mice sperm and 100 × oil immersion objective for human sperm and analyzed with ZEN lite software (Zeiss). Whole images were reconstructed and projected from Z-stack images using ZEN software.

### Primary antibodies

Mouse Sperm Protein sp56 Monoclonal Antibodies were from QED Bioscience; Acetyl histone H4 antibodies (06-598) were from Millipore; Protamine 1 (sc-23107), Protamine 2 (sc-23104) and Tnp2 Antibodies (sc-21106) were from Santa Cruz. Tnp1 antibody (ab73135) was from Abcam. Antibodies were used at the following concentration anti-Tnp1, 1/1000; anti-Tnp2, 1/100; anti-Acetylated Histone, H4 1/100, anti-Prm1 and Prm2, 1/100.

### Chromomycin A<sub>3</sub> staining

Semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1 × and fixed in a methanol/acetic acid (3:1, v/v) solution at 4°C for at least 30 min. Cells were spread on Superfrost® slides and air dried at room temperature overnight. Cells were labeled using a 0.25 mg/ml chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) solution in McIlvaine buffer (pH 7) for 20 min, and washed two times for 2 min with McIlvaine buffer. Sperm nuclei were counterstained in a 0.5 µg/ml Hoechst solution for 3 min, washed in PBS for 3 min and mounted with DAKO mounting media. Slides were analyzed using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 80i).

### Aniline blue

Semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1 ×, 10 µl were spread on a slide, allowed to air dry and then fixed with a 3% glutaraldehyde solution in PBS 1 × for 30 min at room temperature. Slides were then incubated 5 min in water, 10 min in 5% aniline blue diluted in 4% acetic acid solution, two times for 2 min in water, 2 min in 70, 90 and 100% ethanol solutions and finally 2 min in Toluene. Slides were then analyzed using a microscope with a transmitted light microscope 100 × objective with oil.

### Oxidative DNA damage

Quantification of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) was performed by isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay, as previously described (Ravanat et al., 1998). DNA was extracted as previously described with an optimized protocol that minimizes DNA oxidation during the work-up (Badouard et al., 2008).

### DNA breaks

Semen samples were washed twice with 5 ml of PBS and fixed in a methanol/acetic acid (3:1, v/v) solution at 4°C for at least 30 min. Cells were spread on Superfrost® slides and air dried at room temperature overnight. Cells were permeabilized using 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium citrate in PBS 1 × for 2 min and labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL) according to the Roche protocol of the In Situ Cell Detection Kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Sperm nuclei were counterstained in a 0.5 µg/ml Hoechst solution for 3 min, washed in PBS for 3 min and mounted with DAKO mounting media. Slides were analyzed using a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 80i).

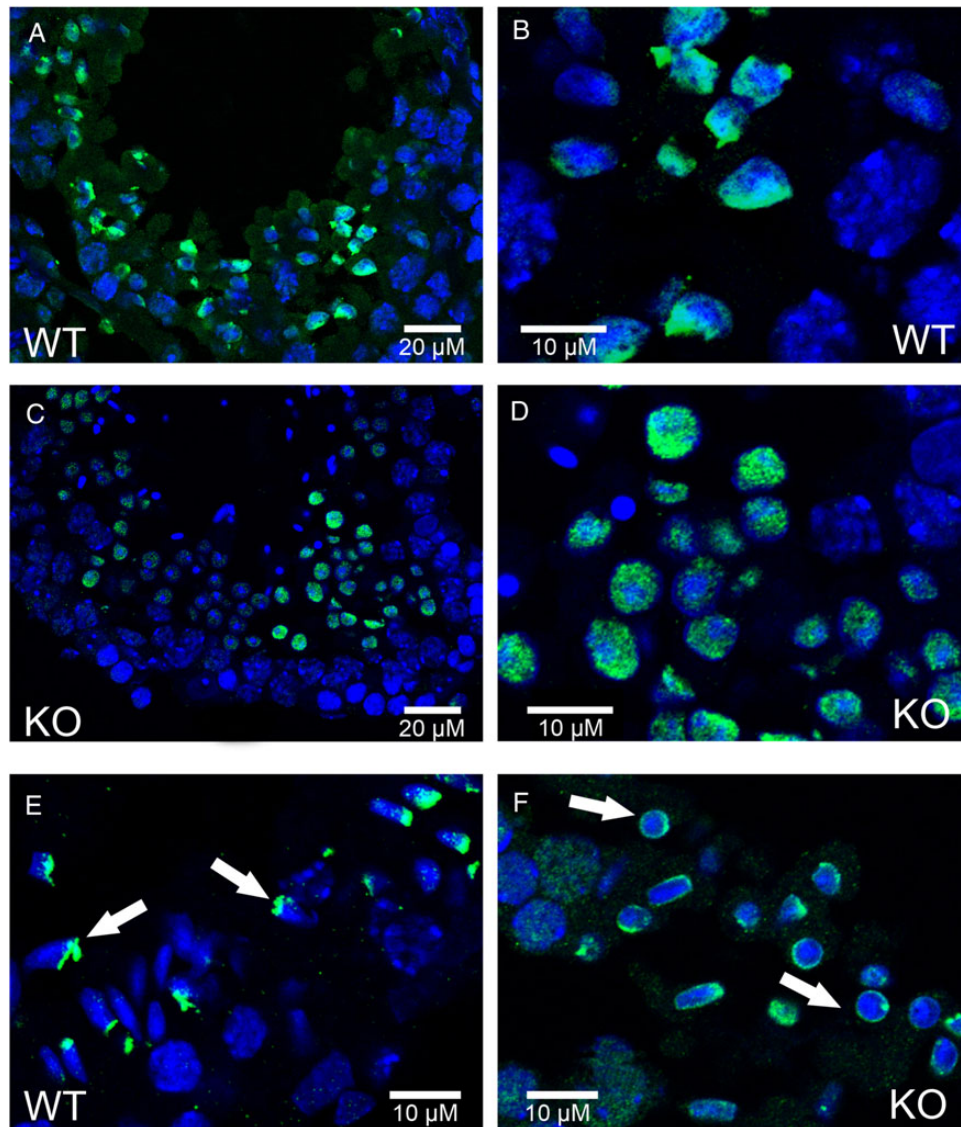
### Statistical analyses

Statistical analyses were performed with SigmaPlot using the Student's *T*-test. Data presented represent mean ± SE. Statistical tests with a two-tailed *P*-values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

## Results

### *Dpy1912* KO spermatid chromatin compaction is defective and shows defective transport of protamines into the nucleus

We first studied in detail the main stages of spermatid DNA compaction in WT and globozoospermic sperm. The replacement of histone by protamine is a complex process, involving first histone post-translational modifications and the incorporation of testis-specific variants (Montellier et al., 2013), leading to nucleosome instability. One of the best characterized histone modifications, which occurs at the beginning of the spermatid elongation stage, is a wave of hyperacetylation affecting core histones (Hazzouri et al., 2000), including H4, which has been later demonstrated to interact with Brdt, the testis-specific member of the double bromodomain containing proteins of the BET family, which controls the histone-to-transition proteins and protamine exchange (Gaucher et al., 2012). Histone acetylation was measured in testis sections of WT and *Dpy1912* KO mice by observing the staining pattern obtained by the binding of an antibody raised against acetylated histone H4 (H4ac). No difference was measured between the H4 acetylation waves of WT and KO elongating spermatids from tubule sections at stage IX, where H4ac is homogeneously distributed throughout the whole nucleus (Fig. 1A–D). During the elongation of spermatids, acetylated core histones are transiently replaced by a set of two basic proteins named nuclear transition proteins 1 and 2 (Tnp1 and Tnp2). In elongating/condensing spermatids from WT tubule sections at stages X–XI, histone replacement is partial (Hazzouri et al., 2000) and a subset of nucleosomes retained H4acs located at the base of the sperm head, close to the flagellum (Fig. 1E, white arrows). In contrast, in *Dpy1912* KO spermatids, most of the spermatids presented no obvious polarization, with H4ac staining surrounding the nucleus (Fig. 1F, white arrows), suggesting that their replacement and removal was performed but according to a different axis. This difference is likely due to the defective manchette (Pierre et al., 2012) leading to a disturbance of protein trafficking in *Dpy1912* KO spermatids. The next stage involved the nuclear transition proteins Tnp1 and Tnp2, which play crucial roles in sperm DNA compaction, and also in flagellum biogenesis (Zhao et al., 2004). The arrival of Tnp1 and Tnp2 into the nucleus of elongated spermatids during compaction was observed in both WT and *Dpy1912* KO tubule sections at stages IX and X and no difference was found between the two genotypes (Fig. 2), suggesting that histone replacement by transition proteins occurred normally. In a preparation of dissociated WT spermatogenic cells, we observed a progressive incorporation of Tnp proteins into the nucleus from the base to the apex during the spermatid compaction (Fig. 3A–C). The disappearance and replacement of Tnps then seemed to start first at the center of the nucleus and next take place at the nucleus border (Fig. 3D). This observed pattern of Tnps replacement is consistent with Tnps replacement in rat spermatids (Kolthur-Seetharam et al., 2009). Again, the absence of elongation in *Dpy1912* KO spermatids disturbed the specific pattern of Tnps assembly/



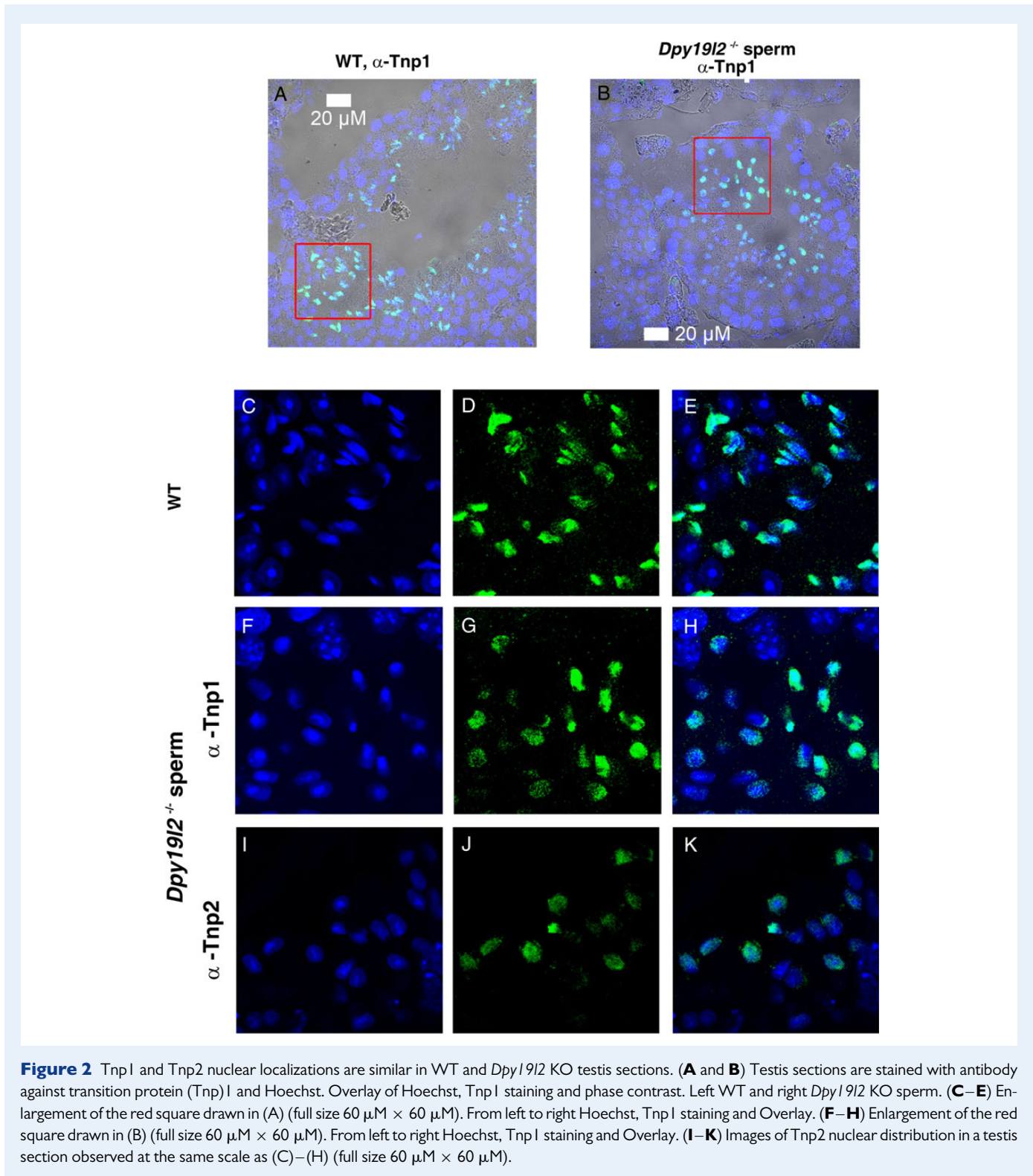
**Figure 1** Histone H4 is acetylated in both WT and *Dpy19l2* KO testis sections, but present different pattern of vanishing. (A–F) Testis sections were fixed and stained with Hoechst to mark DNA (blue) and with antibodies targeting acetylated histone H4 (H4ac, green signal). (A and B) Wild type (WT) testis sections showing H4 acetylation on late round spermatids. (C and D) Testis section from *Dpy19l2* knock-out (KO) males showing H4 acetylation on late round spermatids. (E) WT testis sections showing the localization of H4ac on elongating spermatids (white arrows). (F) Testis section from *Dpy19l2* KO males showing the localization of H4ac on condensed spermatids, which likely corresponded to WT elongated spermatids.

removal, as observed in WT spermatids (Fig. 3F–H). However, no dramatic alteration of Tnps assembly/removal was observed in *Dpy19l2* KO spermatids, which strongly suggests that Tnp-dependent compaction is partially affected at this stage. In a last poorly understood step, Tnps are then replaced by protamines, which eventually allow the compaction of sperm DNA by ~10-fold. Protamine localization was observed in epididymal sperm. Remarkably, *Dpy19l2* KO sperm cells presented a dramatic loss of protamines: both protamines formed a ring at the nucleus periphery (Fig. 4A and B). In contrast, protamines were present in the whole nucleus of WT sperm, with a stronger staining in the apex (Fig. 4C and D). In addition, epididymal *Dpy19l2* KO sperm presented other defects. First, contrary to WT sperm, H4ac histone was still present but with an unexpected location in the midpiece (Fig. 4E and

F). Second, both Tnps were still present in this stage, as a ring surrounding the nucleus, whereas Tnps are normally absent in mature WT sperm (Fig. 4G–J). We want to point out that we observed a small specific staining at the flagellum insertion in the head for Tnp1 (Fig. 4I, white arrow heads). Such a specific staining was not observed for Tnp2 (Fig. 4J).

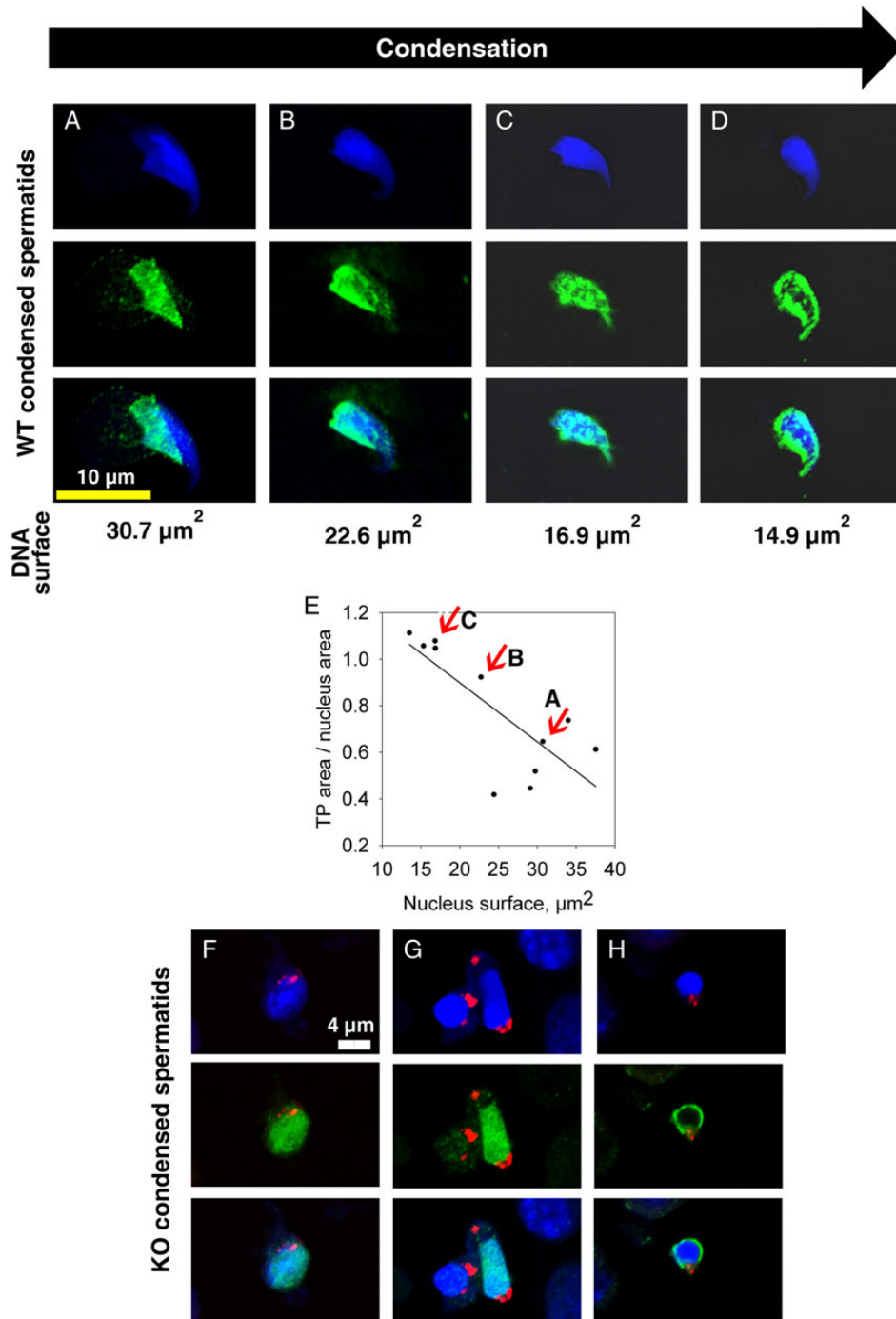
### Mature *Dpy19l2*-dependent globozoospermic mouse and human sperm present positive acidic aniline blue and CMA<sub>3</sub> tests

In fertility clinics, DNA compaction of ejaculated sperm is evaluated by two complementary tests: the acidic aniline blue (and the CMA<sub>3</sub> tests, which are positive when histones are retained inside the nucleus and

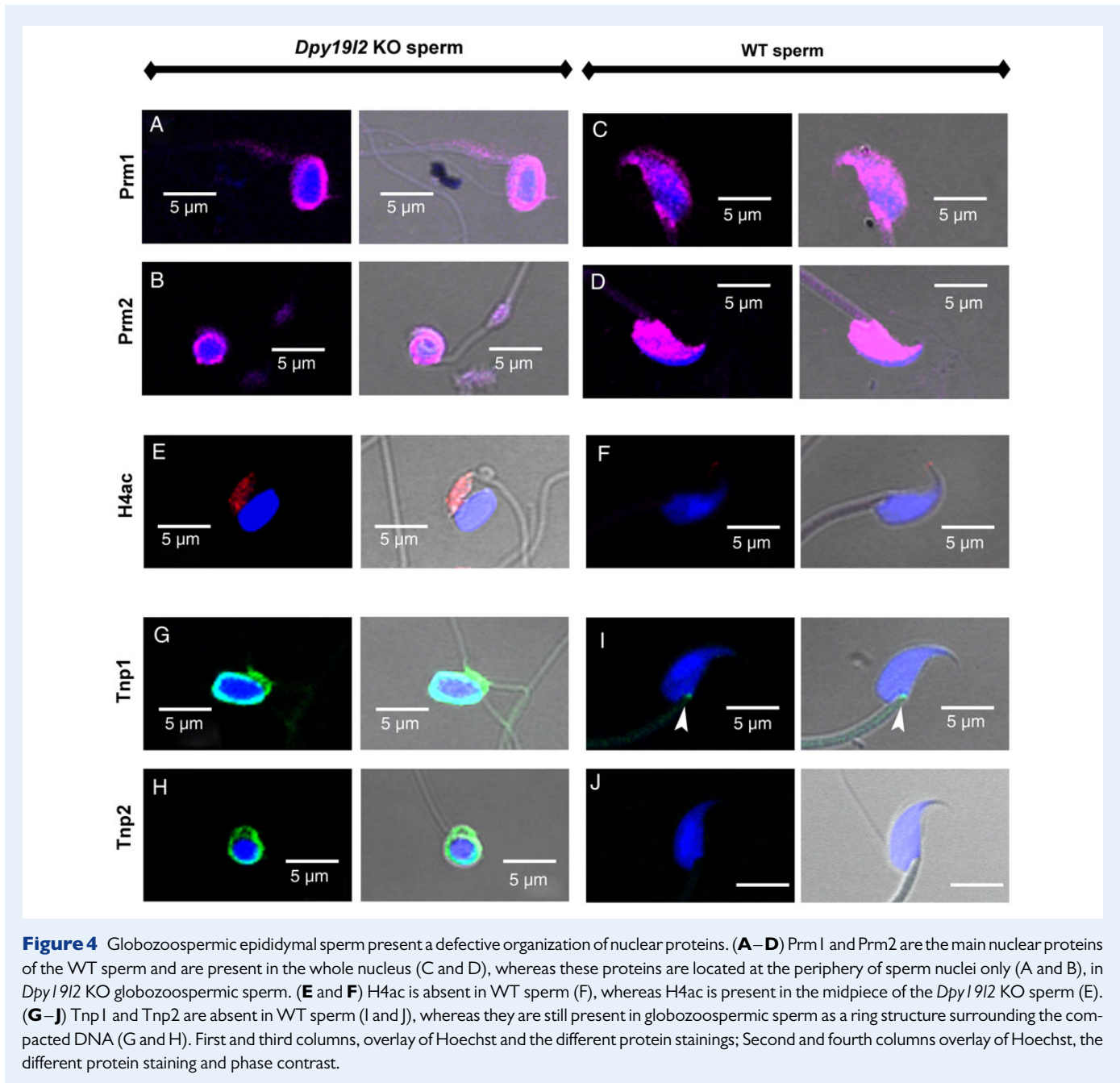


when protamines are absent, respectively. In both human and mouse sperm cells from *Dpy19l2*-dependent globozoospermic males, the retention of histone seemed very important, as suggested by the high rate of sperm (80%) stained by aniline blue (Fig. 5A and B). The protamination of sperm was also strongly defective, with around 60% CMA<sub>3</sub> positive sperm (Fig. 5C and D). The positive results of both compaction

tests on globozoospermic mature sperm is in good agreement with the numerous compaction defects characterized above during spermiogenesis. Importantly, these results demonstrate that most of the *Dpy19l2*-dependent globozoospermic sperm used in ICSI present strong compaction defects in both mouse and human sperm, characterized by a high level of histone retention and low levels of protamination.



**Figure 3** Dynamics of Nuclear Transition Protein Tnp I during spermatogenesis are different between WT and *Dpy19l2* KO spermatids. **(A–D)** Confocal images of WT elongating spermatids showing the dynamics of arrival and removal of Tnp I transition proteins. Tnp I proteins invade the spermatid nucleus from the posterior pole (A and B) and then occupy the whole nucleus (C). Tnp I is removed according to the centrifugal axis (D). From top to bottom: Hoechst, Tnp I (green) and overlay. **(E)** Graph showing that spermatid condensation is associated with nuclear invasion of TP I. **(F–H)** Confocal images of *Dpy19l2* KO elongating spermatids showing the dynamics of arrival and removal of transition proteins. No Tnp I wave arriving from the posterior pole was observed. Condensed spermatids were homogenously stained with Tnp I antibodies (F and G), in contrast to WT spermatids. At the end of condensation, a perinuclear ring of Tnp I staining was observed. DNA is marked with Hoechst (blue), acrosome with sp56 Ab (red) and Tnp I is stained in green.

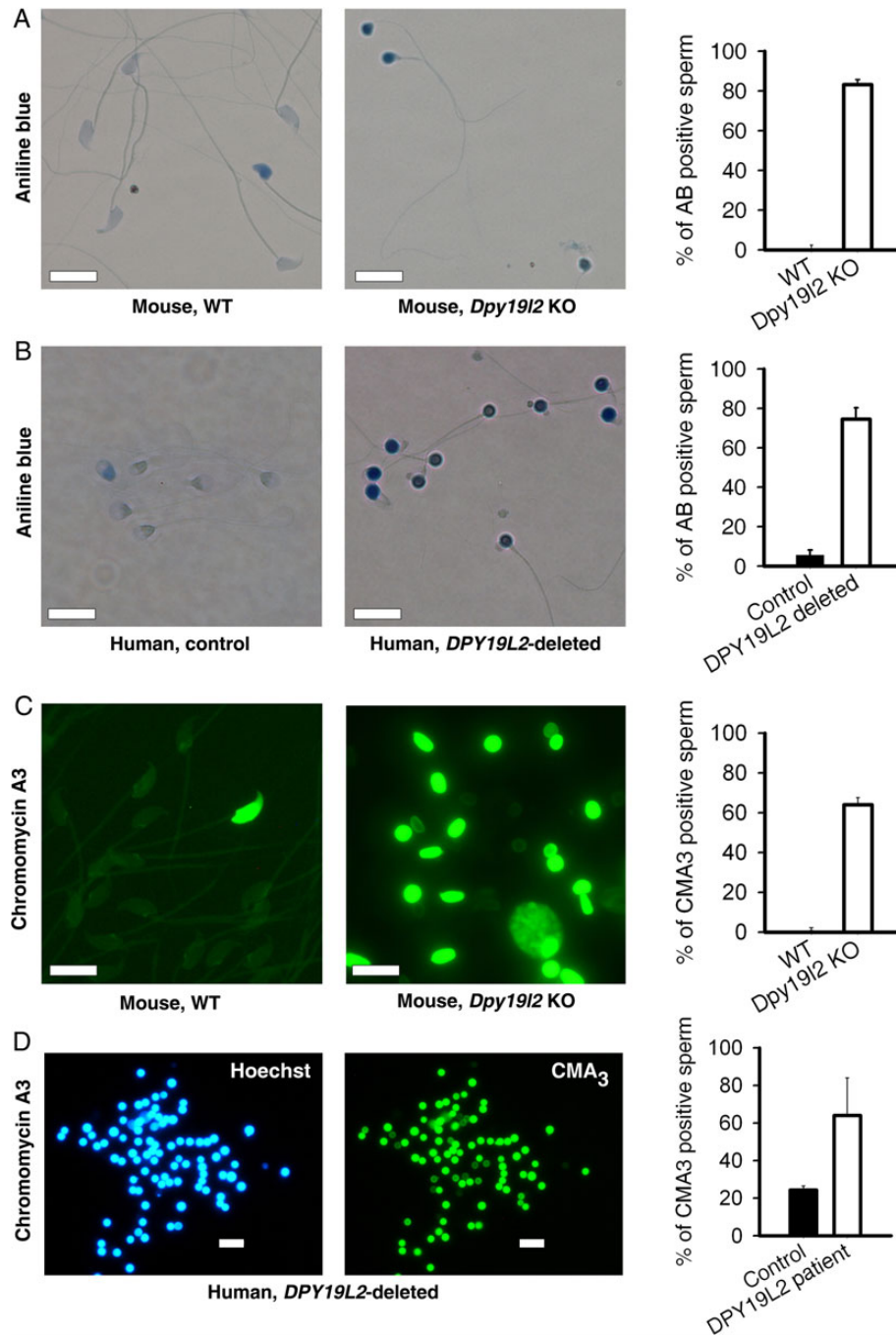


### Absence of protamines increases DNA fragmentation but not oxidative damage during epididymal transit

Sperm DNA compaction based on histone replacement by protamine is further enhanced and stabilized during epididymal maturation by disulfide cross-linking of thiol-rich protamines, allowing paternal genome to be protected from exogenous oxidative stress during sperm storage in the cauda epididymis between two ejaculations and during migration of sperm in the female tract. This disulfide cross-linking involves reactive oxygen species (ROS), produced by the epididymal epithelium. However, ROS also have a detrimental action on sperm lipids and

DNA, and the dramatic lack of protamines in *Dpy1912* KO sperm could increase sperm sensitivity to the stress met during epididymal transit. To test this hypothesis, we measured both DNA fragmentation and oxidative damage in sperm retrieved from the caput to the cauda epididymis. DNA fragmentation was assessed with the TUNEL test and was clearly increased in the spermatozoa from both patients and *Dpy1912* KO mice in comparison to controls. Human and mouse globozoospermic sperm had a similar percentage of TUNEL positive cells (around 30%, Fig. 6A and B). Interestingly, the level of fragmentation was already high in the caput epididymis and increased only slightly during epididymal transit (from  $23.5 \pm 6$  to  $29 \pm 5\%$ ,  $n = 2$ , Fig. 6C), suggesting that the majority of DNA breaks occur during spermatogenesis. Because DNA

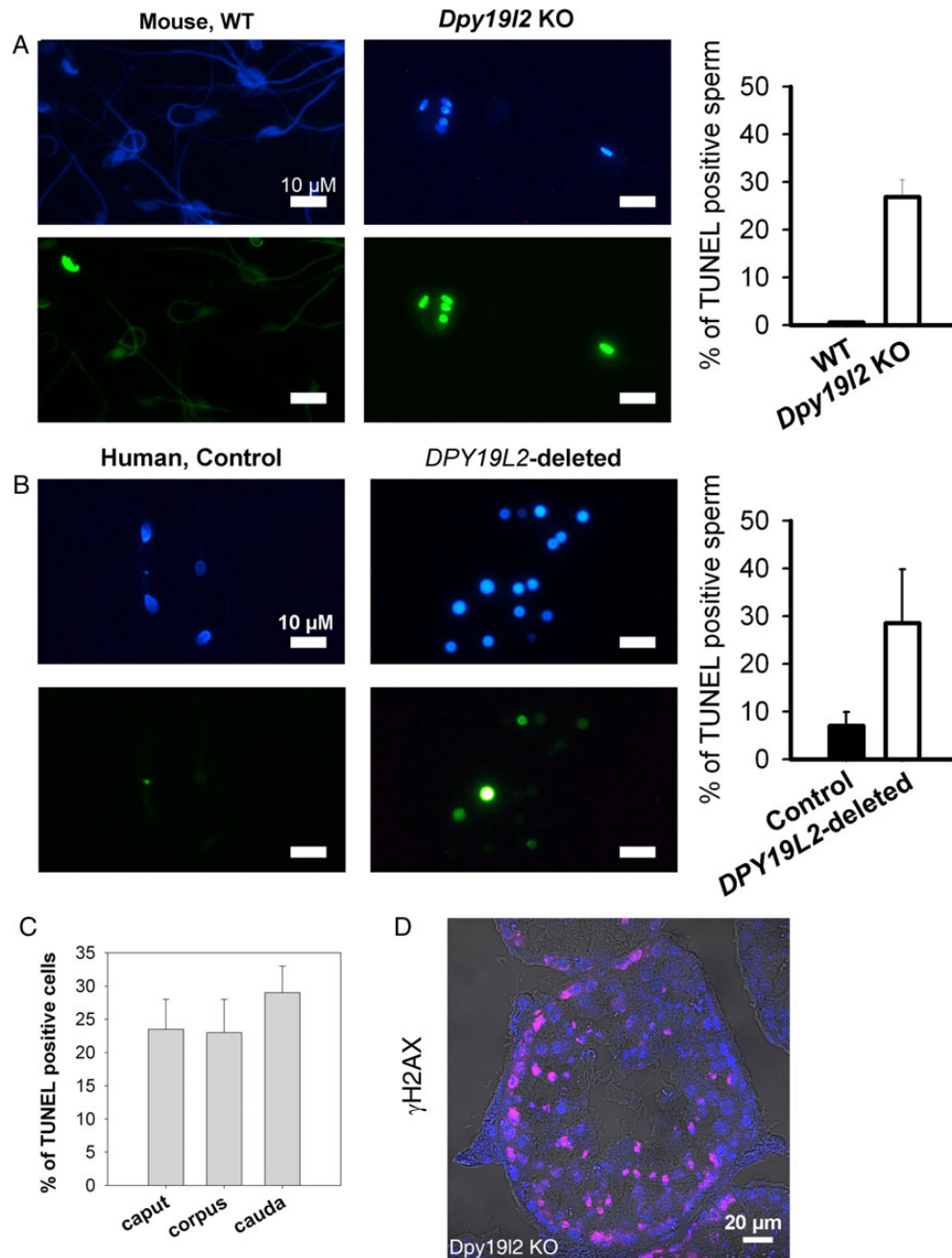




**Figure 5** Compaction of DNA is defective in both *Dpy19l2* KO murine sperm and *DPY19L2*-deleted human sperm. **(A)** Mouse sperm were stained with aniline blue. Unlike WT sperm (left), sperm from *Dpy19l2* KO males were strongly stained (middle). The histogram shows the % of stained cells in WT and *Dpy19l2* KO sperm,  $n = 3$  (right). There was a significant difference between WT and KO sperm ( $P < 0.001$ ). Bars represent mean  $\pm$  SE. **(B)** Similar experiments performed with control human sperm and sperm from *DPY19L2*-deleted patients ( $n = 3$ ). The difference was significant ( $P < 0.001$ ). Bars represent mean  $\pm$  SE. **(C)** Mouse sperm were stained with chromomycin A3. In contrast to WT sperm (left), sperm from *Dpy19l2* KO males were strongly stained (middle). The histogram shows the % of stained cells in WT and *Dpy19l2* KO sperm,  $n = 3$  (right). There was a significant difference between WT and KO sperm ( $P < 0.001$ ). Bars represent mean  $\pm$  SE. **(D)** *DPY19L2*-deleted human sperm were stained with chromomycin A3. The histogram shows the % of stained cells in control and *DPY19L2*-deleted subjects sperm,  $n = 3$  (right). The difference was significant ( $P = 0.003$ ). Bars represent mean  $\pm$  SE.

breaks occur physiologically during spermatogenesis, and histone  $\gamma$ H2Ax is involved in the repair process (Leduc et al., 2008), we measured the occurrence of  $\gamma$ H2Ax in tubule sections by

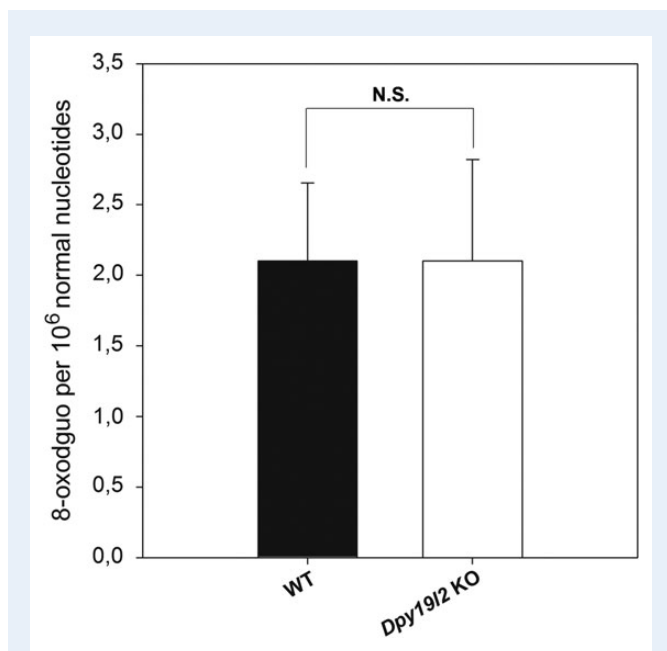
immunohistochemistry in mouse. We did not observe any obvious difference between WT and *Dpy19l2* KO sperm (Fig. 6D), suggesting that the repair pathways are activated, but may be saturated because sperm in the



**Figure 6** DNA of *Dpy19l2*-dependent globozoospermic sperm is fragmented in mouse and human. **(A)** DNA fragmentation analysis with terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. Left, Hoechst and TUNEL stainings in WT sperm. Right, Hoechst and TUNEL stainings in *Dpy19l2* KO sperm. The histogram shows the level of TUNEL positive cells in WT and KO sperm ( $n = 5$ ). There was a significant difference between WT and KO sperm ( $P < 0.001$ ). Bars represent mean  $\pm$  SE. **(B)** Similar experiments with control and *DPY19L2*-deleted sperm in human. Histogram shows the level of TUNEL positive cells in control ( $n = 5$ ) and *DPY19L2*-deleted sperm ( $n = 3$ ). There was a significant difference between control and *DPY19L2*-deleted sperm ( $P = 0.01$ ). Bars represent mean  $\pm$  SE. **(C)** Fragmentation of sperm is slightly increased during epididymal transit ( $n = 2$ ). **(D)** Gamma H2AX histone is expressed during spermatogenesis in tubule sections from *Dpy19l2* KO testis.

caput were already damaged. The oxidative status of 8-OHdG from epididymal sperm was also compared by isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay.

The level of 8-OHdG in WT was similar to previously measured levels of 8-OHdG (Badouard et al., 2008) but, unexpectedly, no difference was observed between WT and *Dpy19l2* KO sperm (Fig. 7).



**Figure 7** Defective protamination does not lead to a higher level of 8-oxodGuo. Levels of 8-oxo-7,8-dihydro-29-deoxyguanosine (8-oxodGuo) were detected with reversed-phase liquid chromatographic separation associated with an electrospray tandem mass spectrometric detection from epididymal sperm from WT or *Dpy1912* KO males ( $n = 3$ ). No significant differences were observed between WT and *Dpy1912* KO males. Bars represent mean  $\pm$  SE.

### Co-injection of PLC $\zeta$ with *Dpy1912* KO globozoospermic sperm rescues OA but not embryonic development

*Dpy1912* KO globozoospermic sperm lack PLC $\zeta$  and its co-injection was expected to rescue OA and thus embryo development. We first verified the ability of PLC $\zeta$  to trigger OA by injecting PLC $\zeta$  cRNA into oocytes incubated with cytochalasin B (CB). CB, which blocks extrusion of the second polar body, allows the generation of diploid (2N) parthenogenotes that show better embryonic development than 1N parthenogenetic embryos (Ma *et al.*, 2005). We also validated Sr<sup>2+</sup>, a common parthenogenetic agent, by incubating CB-treated oocytes in M16 medium containing 10 mM Sr<sup>2+</sup>. As expected, both compounds triggered OA and initiated high rates of embryonic development up to the blastocyst stage (Fig. 8A); this is unlikely due to exposure to CB alone, which failed by itself to induce OA and/or development.

We next performed ICSI with globozoospermic *Dpy1912* KO sperm together with Sr<sup>2+</sup> or PLC $\zeta$  AOA and monitored preimplantation development. As expected, injection of a *Dpy1912* KO sperm head failed to trigger OA (Fig. 8B, black bars). In contrast, injection of PLC $\zeta$  cRNA rescued the activation defect of *Dpy1912* KO sperm and generated ~60% of 2 PN zygotes (Fig. 8B, green bars). Despite these results, embryo development was highly defective with very few embryos reaching the blastocyst stage. Similar results were observed after ICSI with *Dpy1912* KO sperm heads followed by Sr<sup>2+</sup> incubation (Fig. 8B, red bars) and this was despite the fact that Sr<sup>2+</sup> incubation induced robust Ca<sup>2+</sup> responses (Fig. 8C). Together, these results demonstrate that,

besides the activation defect, *Dpy1912*-deficient sperm carry other abnormalities that limit their developmental potential.

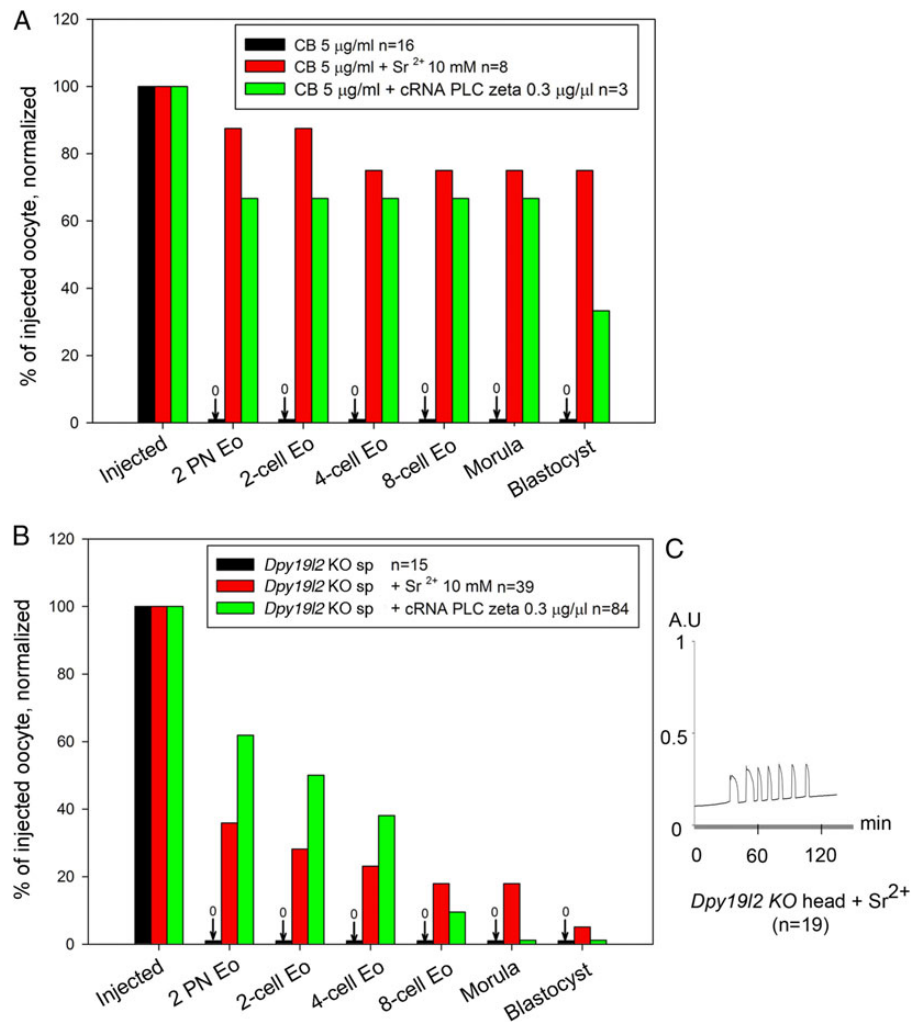
### Subjects with the *DPY19L2*-deleted gene combine a low OA rate and a poor embryo development

The results obtained in mouse show that embryonic development is strongly compromised when embryos are generated by ICSI with a *Dpy1912*-dependent globozoospermic sperm. In human, several teams reported pregnancy with globozoospermic sperm suggesting that embryonic development is less affected than in mouse. In order to evaluate embryo development in human, embryos were scored before implantation at Day 2 or Day 3. Ten embryos obtained following 13 stimulation cycles with 9 males presenting with type I globozoospermia were scored. Although all embryos started their cellular divisions (except for patient T5.1, 3/10), only 2/10 embryos were scored grade I at Day 2 or Day 3 (even blastomeres, fragmentation < 10%, Table I), showing that embryonic development is affected in human as well. Finally, the rate of women who gave birth/number of couples with embryos was 28.5% (2/7).

In globozoospermic patients, the ICSI outcome is highly variable, with some medical teams reporting high pregnancy rates and others reporting low fertilization rates, early abortion and finally an absence of delivery. We wondered if this discrepancy between different medical teams could be due to differences in the presence of an acrosome bud and/or DNA quality. For this purpose, we compared two couples, one with successful delivery at the first stimulation cycle and one with unsuccessful ICSI attempts after three stimulation cycles (Table I). Both couples presented a very low rate of OA (0–14%), in accord with the nearly complete absence of PLC $\zeta$  in the corresponding male (companion article, Escoffier *et al.*, 2014, Fig. 3). Nevertheless, some oocytes could be activated in the absence of AOA (prohibited in France) and 2 embryos were obtained and transferred on Day 3 for one couple. For couple G1, one embryo could be obtained upon the realization of three cycles but could not be transferred due to ovarian hyperstimulation. All embryos were characterized by low grade and high fragmentation levels. We did not measure any difference in the aniline blue and TUNEL stainings, showing that these parameters are not good prognostic markers of successful pregnancy. A difference between CMA<sub>3</sub> rate was observed, but due to the low number of cases, no conclusion could be drawn (Table II).

## Discussion

Our recent work demonstrated that the *DPY19L2* gene is the main genetic cause of human globozoospermia (Ben Khelifa *et al.*, 2011; Coutton *et al.*, 2012, 2013). Remarkably, we also showed that the loss of this gene phenocopies globozoospermia in mice (Pierre *et al.*, 2012) and this KO animal model thus represents an interesting tool to investigate the defective molecular process associated with the loss of *Dpy1912* protein during spermatogenesis, because there is no possibility to use human testis for such studies. *Dpy1912*-dependent globozoospermia is characterized by the absence of an acrosome, preventing the sperm from crossing the *zona pellucida*, and represents the first reason for the sperm infertility. We have shown in the accompanying paper that the defective acrosomal



**Figure 8** Rescue of oocyte activation with PLC $\zeta$  cRNA injection in ICSI performed with *Dpy19l2* KO sperm does not allow recovery of full embryo development. **(A)** In the presence of cytochalasin B (CB), both strontium ( $\text{Sr}^{2+}$ ) incubation (red bars) and phospholipase C (PLC $\zeta$ ) cRNA injection (green bars) were able to induce full oocyte activation, allowing parthenogenetic development of embryos up to the blastocyst stage. Incubation of oocytes with CB only does not activate the oocyte (black bars). *n* corresponds to the number of challenged oocytes (for CB or CB +  $\text{Sr}^{2+}$ ) or injected oocytes that survived the ICSI procedure (CB + cRNA and *Dpy19l2* KO sperm injection). **(B)** *Dpy19l2* KO sperm heads were either injected in MII oocytes and embryos were incubated in the presence of  $\text{Sr}^{2+}$  for 2 h (red bars) or *Dpy19l2* KO sperm heads were co-injected with PLC $\zeta$  cRNA in MII oocytes (green bars). In contrast to CB treatment, injection of *Dpy19l2* KO sperm head is associated with poor blastocyst outcomes in both activation conditions. **(C)**  $\text{Sr}^{2+}$  incubation induced a robust  $\text{Ca}^{2+}$  response. AU: arbitrary units.

biogenesis leads to loss of the sperm factor PLC $\zeta$  as well, making worse the sterility phenotype of these sperm due to the absence of OA. Herein, we describe for the first time the main stages of spermatid condensation in globozoospermic sperm and pin pointed that several stages are defective, which render this sperm more susceptible to DNA defects and that ultimately undermine the developmental potential of zygotes generated using globozoospermic sperm. We thus demonstrated a third molecular cause of sterility associated with globozoospermia. We also noted some differences in phenotype of the disease between human and mice. We indeed showed that the phenotype in the mouse, in terms of embryonic developmental capacity, is more severe than in men.

### Impact of defective DNA condensation of globozoospermic sperm on embryonic development

Previous reports have shown that globozoospermic sperm present defects in condensation, which is likely associated with the increased percentage of DNA fragmentation reported in these types of sperm. Nevertheless, the level of DNA fragmentation reported is quite different between studies with rates ranging from 10 to 37% (Baccetti et al., 1996; Vicari et al., 2002). Importantly, the etiology of these DNA defects in sperm remains unknown. Herein, we showed that defects in several steps of sperm head condensation occur in globozoospermic

**Table 1** ICSI outcomes following 13 stimulation cycles with 9 males presenting with type I globozoospermia due to full deletion of the *DPY19L2* gene.

Patient ID	Age male years	Age female years	Nber MII oocyte (%)	Nber 2 PN embryo (%)	TRANSFER day 2 (D2)		TRANSFER D3		Grade of embryo	Nber of transferred Eo (D2)	Nber of transferred Eo (D3)	Delivery
					Nber of embryos at D2	Quality and % of fragmentation	Nber of embryos at D3	Quality and % of fragmentation				
M1	30	28	14	2 (14.3%)			2	- 6-cell, 10–30% fragmentation - 6-cell, 30–50% fragmentation	G III G III	0	2	1
G1-1	37	29	10	1 (10%)			1	- 5-cell, 10–30% fragmentation	G III	0	0	0
G1-2	37	29	4	0 (0%)			0			0	0	0
G1-3	38	30	5	0 (0%)			0			0	0	0
T1.1	31	27	10	0 (0%)			0			0	0	
T1.2	40	36	6	0			0			0	0	
T3	50	37	8	0 (0%)			0			0	0	
T4	40	36	4	0			0			0	0	
T5.1	36	24	29	10 (34.5%)	3			- 5-cell, 0% fragmentation - 5-cell, 0% fragmentation - 8-cell, 15% fragmentation	G II G II G III	3	0	0
T5.2	38	26	19	1 (5.3%)			1	- 4-cell, 10% fragmentation	G II	0	1	0
T7	30	26	10	1 (10%)			1	- 2-cell (Development delayed)	G IV	0	0	0
T8	42	35	11	1 (9%)			1	- 8-cell, 0% fragmentation	G I	0	1	0
T9	38	28	9	1 (11.1%)	1			- 4-cell, 10% fragmentation	G I	1	0	1

Nber (number), Eo (Embryo). MII: metaphase II oocytes retrieved; PN: pronuclei.

**Table II** Medical history, laboratory investigations and ICSI outcomes of two couples with males presenting with type I globozoospermia due to full deletion of the *DPY19L2* gene.

Patient ID	Age male years	Age female years	History/ habits	Volume ejaculate [sperm]	Sperm mobility	% of globozoospermia	Genotyping	TUNEL % Positive	AB % positive	CMA3 % positive	Nber MII oocytes (%)	Nber 2 PN embryos (%)	Nber of embryos at D3	Quality and grade of embryos	Nber of transferred Eo (D3)	Delivery
M1	30	28	Tobacco	4.8 ml	20% a + b	100%	<i>DPY19L2</i> deleted homoz	29	81.5	50	14	2	2		2	1
			5–10 cig/d	21 M/ml	20% c											
			Bricklayer											- 6-cell, 30–50% fragment (G III)		
G1-1	37	29	Tobacco	3.2 ml	30% a + b	100%	<i>DPY19L2</i> deleted homoz	44	79	ND	10	1	1		0	0
			15 cig/d	28 M/ml												
			Cannabis 2/D													
G1-2	37	29	Tobacco	2 ml	20%a + b	100%	<i>DPY19L2</i> deleted homoz	ND	ND	ND	4	0	0		0	0
			15 cig/d	30 M/ml	10%c											
			Cannabis 2/D													
G1-3	38	30	Tobacco	2.5 ml	20% a + b	100%	<i>DPY19L2</i> deleted homoz	18	79	78	5	0	0		0	0
			5 cig/d	20 M/ml	5%c											
			Cannabis 3/w													

ND: not determined; cig/day: cigarettes per day; TUNEL: terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling; AB: aniline blue; CMA3: chromomycin A<sub>3</sub>; MII: metaphase II oocytes retrieved; PN: pronuclei.

sperm. For instance, during the initial stages of condensation in stage X, the disappearance of acetylated H4 is greatly modified, with WT sperm preserving acetylated H4 histones in the posterior or base of the sperm head, a pattern that was not observed in *Dpy1912* KO sperm, which presented a uniform, circular pattern of H4 distribution. Similarly, the dynamic of arrival of Tnps is different, following a postero-anterior axis with WT sperm, an axis which was not present in *Dpy1912* KO sperm. Lastly, the defect associated with protamination is very pronounced in *Dpy1912* KO sperm, as in these cells protamines were absent inside the nucleus and remained mostly located at the periphery. Together, these defects are likely to impact the developmental potential of embryos generated with globozoospermic sperm. Indeed, recent data show that the paternal genome and epigenome play crucial roles in embryo development (Jenkins and Carrell, 2012). It is known that parent-specific methylation of promoter regions of imprinted genes is required for successful embryo development as well as the specific organization of the paternal epigenome, which is in part determined by protamination and the retention of nucleosomes at specific loci. Defective protamination is associated with various forms of human infertility, reviewed in (Oliva, 2006) and loci retaining nucleosomes enriched in methylated histone H3 are involved in the developmental process and correspond to imprinted genes, HOX genes and microRNA clusters (Hammoud et al., 2009). In late condensing mouse spermatids and sperm, nucleosomes containing testis-specific histone variants H2ALI/L2 remain in pericentric heterochromatin regions, likely guiding the epigenetic reprogramming of these regions (Govin et al., 2007). The perturbations of sperm DNA compaction, as witnessed herein by H4ac, TnpI and protamine studies, therefore likely lead to major sperm epigenetic defects. Moreover, the perturbations of sperm DNA compaction are likely to increase susceptibility to DNA breaks. Altogether, epigenetic defects and DNA breaks likely undermine the developmental potential of embryos generated by ICSI using *Dpy1912* KO sperm or human sperm lacking DPY1912, as showed in this study. Despite its transcriptionally inert state, the sperm nucleus contains diverse RNA populations, mRNAs, and non-coding RNA (ncRNA) that have been transcribed throughout spermatogenesis (Dadoune, 2009). Although the contribution of such sperm RNA to embryonic development or infertility is highly debated, the content of ncRNA in globozoospermic sperm is unknown and may also represent a cause of impaired embryo development.

Interestingly, most of the DNA breaks were already present when sperm reach the epididymis and thus occur inside the testis, during DNA compaction. Moreover, the levels of oxidative damage of WT and *Dpy1912* KO sperm obtained in the cauda epididymides were quite similar, suggesting that the oxidative stress met during epididymal transit does not modify the overall oxidative status of globozoospermic sperm DNA, which is unexpectedly low for a protamine-deficient sperm. These points are important because several studies showed that testicular sperm have a better developmental potential than epididymal sperm in the case of oligo-terato-asthenozoospermia (Weissman et al., 2008; Ben-Ami et al., 2013). Our results suggest that testicular sperm extraction in *Dpy1912*-dependent globozoospermia is not recommended.

## Difference between human and mouse embryonic development

The compromised development of embryos generated by globozoospermic sperm and ICSI and activated by PLC $\zeta$  is more severe in mouse

than in humans. In the murine species, <15.4% of the zygotes reached the 8-cell stage and only 1.9% reached the blastocyst stage; this developmental failure cannot be due to an activation defect or the dose of PLC $\zeta$  (Yu et al., 2008), as CB treated oocytes activated and developed to blastocyst stage with the same dose of PLC $\zeta$ . In contrast, most of the 2-PN human zygotes reached the 8-cell stage, at which time they were transferred. Nevertheless, it is important to note that these human embryos displayed high levels of fragmentation and were mostly given low grades during the evaluation. The rate of grade I embryos is very low (20%) in comparison to that reported for couples with a tuboperitoneal female factor only and normal spermatogram (~50%), a report using the same embryo gradation system (Bukulmez et al., 2000). In spite of this, embryos implanted, developed and two offspring was produced, which is in agreement with previously published results (28 versus 31% in (Kuentz et al., 2013)). It is nevertheless difficult to compare both methods because the number of couples studied in this report is low. Moreover, it is important to stress that these rates are low for young women, compared with a 45.9% (age <35 years) delivery rate in a large study of control cohort patients (Palermo et al., 2009), underlining that human embryos generated with globozoospermic sperm have a compromised development as well. A possible explanation for the different developmental potential between zygotes generated by human or mouse globozoospermic sperm is the degree of nucleosome replacement by protamines during spermatogenesis. Whereas protamination is almost complete in mouse sperm and the presence of nucleosomes associated with DNA is estimated to be ~1%, in humans this is estimated to be ~10–15% (Bench et al., 1996; van der Heijden et al., 2008). We speculate therefore that the reduced level of protamines, which is observed in globozoospermic sperm, may be better tolerated by human sperm than by mouse sperm or that human oocytes are more able to overcome/repair these defects, or a combination of both possibilities, explaining the better developmental potential of human zygotes generated with globozoospermic sperm. It is worth noting that the higher rate of embryonic development arrest observed in the mouse is not due to a differential disruption of the paternal centrosome because mouse sperm are devoid of centrioles and key centrosomal components, and the first mitotic spindle actually depends on the maternal centrosomal material (Schatten et al., 1986). The relationship between fertilization or embryo development and DNA damage was clearly demonstrated in animal models (Ahmadi and Ng, 1999; Fatehi et al., 2006), but this question is more debated in human reproduction, where no linear correlation between sperm DNA damage and pregnancy outcome was clearly shown (Sakkas et al., 1998). The absence of a clear correlation is partly due to i) an absence of a thorough characterization of chromatin defects and DNA damage, due to the use of simple and basic tests and ii) an absence of statistical analysis of the fate of each embryo generated by ICSI because in human only one pregnancy per oocyte cohort is sought, allowing selection of the best embryos (Sakkas and Alvarez, 2010). In the framework of type I globozoospermia, human data, reinforced by those obtained with the *Dpy1912* KO model, enabled us to show that defective compaction, and more particularly protamination, associated with DNA breaks strongly impairs the developmental potential of embryos generated by ICSI using *Dpy1912*-deficient sperm.

In conclusion, in this study we describe for the first time chromatin condensation during mouse spermatogenesis of *Dpy1912*-dependent globozoospermic males and organization of globozoospermic sperm in mouse and human, showing that important modifications occur, severely

limiting the developmental potential of these gametes. Our results and those of others also show that in spite of this, offspring can be conceived with these 'faulty' sperm. In the mouse, an increasing number of publications show clear health and behavioral alterations in progeny generated by ART even from healthy animals (Ecker et al., 2004; Fernandez-Gonzalez et al., 2008; Kohda and Ishino, 2013). Further work would require studying the long-term development of mice generated with globozoospermic sperm to assess the long-term effect of DNA breaks and failed compaction. In the meantime we stress that transferring embryos generated by ICSI using incorrectly compacted sperm combined with DNA breaks should be performed with caution. Similar abnormalities are present in most cases of teratozoospermia. It is therefore imperative that we gain insight into the sperm molecular DNA landscapes that are associated with most cases of human infertility. Methods allowing the detection and negative selection of faulty sperm should then be developed to increase ART success rate and to decrease the risks of deleterious effects on offspring health.

## Acknowledgements

We are grateful to the patients who gave their informed consent to the use of their samples for research. We thank Saadi Khochbin and Sophie Rousseaux for useful discussions and for critical comments on the manuscript. We also thank clinicians from the reproductive clinics (Pascale Hoffman, Ulrike Bergues, Dr B. Courbière) and C. Metton and M.J. Fays-Bernardin for technical assistance and Germetheque support.

## Authors' roles

J.E. performed ICSI experiments. H.C.L. performed calcium imaging experiments. G.M. studied human and mouse DNA defects. S.Y. performed confocal experiments on sperm DNA compaction. R.Z., S.H. and C.M.-G. provided clinical data and human sperm samples. J.-L.R. performed mass spectrometry experiments. C.C. and T.K. were responsible of molecular biology experiments. P.F.R., R.F. and C.A. coordinated the study. P.F.R., R.F. and C.A. contributed to discussion, design and interpretation of data. C.A. wrote the manuscript.

## Funding

This study was supported by grants from Gravit Foundation (to C.A.), from the Agence National de la Recherche (Grant ICG21 to P.F.R. and C.A.) from NIH (Grant number: R01 HD051872 to R.F.).

## Conflict of interest

None declared.

## References

Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;**14**:2279–2285.

Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 2009;**19**:1338–1349.

Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;**28**:587–596.

Badouard C, Menezo Y, Panteix G, Ravanat JL, Douki T, Cadet J, Favier A. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. *Zygote* 2008;**16**:9–13.

Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil Steril* 1997;**68**:118–122.

Ben-Ami I, Raziel A, Strassburger D, Komarovskiy D, Ron-El R, Friedler S. Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men. *Fertil Steril* 2013;**99**:1867–1871.

Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* 1996;**23**:263–271.

Ben Khelifa M, Zouari R, Harbuz R, Halouani L, Arnoult C, Lunardi J, Ray PF. A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2011;**17**:762–768.

Bukulmez O, Yarali H, Yucel A, Sari T, Gurgan T. Intracytoplasmic sperm injection versus *in vitro* fertilization for patients with a tubal factor as their sole cause of infertility: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril* 2000;**73**:38–42.

Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001;**28**:82–86.

Coutton C, Zouari R, Abada F, Ben Khelifa M, Merdassi G, Triki C, Escalier D, Hesters L, Mitchell V, Levy R et al. MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod* 2012;**27**:2549–2558.

Coutton C, Abada F, Karaouzene T, Sanlaville D, Satre V, Lunardi J, Jouk PS, Arnoult C, Thierry-Mieg N, Ray PF. Fine characterisation of a recombination hotspot at the DPY19L2 locus and resolution of the paradoxical excess of duplications over deletions in the general population. *PLoS Genet* 2013;**9**:e1003363.

Dadoune JP. Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech* 2009;**72**:536–551.

Dam AH, Koscinski I, Kremer JA, Moutou C, Jaeger AS, Oudakker AR, Tournaye H, Charlet N, Lagier-Tourenne C, van Bokhoven H et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet* 2007;**81**:813–820.

Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;**101**:1595–1600.

Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006;**27**:176–188.

Fernandez-Gonzalez R, Moreira PN, Perez-Crespo M, Sanchez-Martin M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, de Dios HJ, de Fonseca FR et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;**78**:761–772.

Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte AL et al. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 2012;**31**:3809–3820.

Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S et al. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007;**176**:283–294.



- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;**460**:473–478.
- Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, Merdassi G, Abada F, Escoffier J, Nikas Y *et al.* A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 2011;**88**:351–361.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 2000;**79**:950–960.
- Jenkins TG, Carrell DT. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction* 2012;**143**:727–734.
- Kohda T, Ishino F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;**368**:20120353.
- Kolthur-Seetharam U, Pradeepa MM, Gupta N, Narayanaswamy R, Rao MR. Spatiotemporal organization of AT- and GC-rich DNA and their association with transition proteins TPI and TP2 in rat condensing spermatids. *J Histochem Cytochem* 2009;**57**:951–962.
- Kuentz P, Vanden Meerschaut F, Elinati E, Nasr-Esfahani MH, Gurgan T, Iqbal N, Carre-Pigeon F, Brugnion F, Gitlin SA, Velez dLC *et al.* Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Hum Reprod* 2013;**28**:1054–1061.
- Kyono K, Nakajo Y, Nishinaka C, Hattori H, Kyoya T, Ishikawa T, Abe H, Araki Y. A birth from the transfer of a single vitrified-warmed blastocyst using intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril* 2009;**91**:931–931.
- Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 2008;**78**:324–332.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Devroey P, Van SA. Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod* 1995;**10**:626–629.
- Liu G, Shi QW, Lu GX. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl* 2010;**12**:556–560.
- Lundin K, Sjogren A, Nilsson L, Hamberger L. Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* 1994;**62**:1266–1267.
- Ma SF, Liu XY, Miao DQ, Han ZB, Zhang X, Miao YL, Yanagimachi R, Tan JH. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: a search for the best conditions. *Theriogenology* 2005;**64**:1142–1157.
- Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;**139**:287–301.
- Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debermardi A, Hery P, Curtet S *et al.* Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev* 2013;**27**:1680–1692.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:417–435.
- Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med* 2009;**27**:191–201.
- Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroché J, Yassine S, Novella C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Arnoult C. Absence of Dpy19L2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 2012;**139**:2955–2965.
- Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;**715**:349–356.
- Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;**93**:1027–1036.
- Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, Shoukir Y, Campana A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998;**13**(Suppl 4):11–19. 11–19.
- Schatten H, Schatten G, Mazia D, Balczon R, Simerly C. Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;**83**:105–109.
- Taylor SL, Yoon SY, Morshedi MS, Lacey DR, Jellertette T, Fissore RA, Oehninger S. Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:559–564.
- Tejera A, Molla M, Muriel L, Remohi J, Pellicer A, De Pablo JL. Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril* 2008;**90**:1202–1205.
- van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derjck AA, vand V, Martini E, de Boer BP. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 2008;**8**:34. doi: 10.1186/1471-213X-8-34., 34-38.
- Vicari E, Perdichizzi A, De PA, Burrello N, D'Agata R, Calogero AE. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 2002;**17**:2128–2133.
- Vozdova M, Rybar R, Kloudova S, Prinosilova P, Textl P, Rubes J. Total globozoospermia associated with increased frequency of immature spermatozoa with chromatin defects and aneuploidy: a case report. *Andrologia* 2013;**10**:00–00.
- Weissman A, Horowitz E, Ravhon A, Nahum H, Golan A, Levran D. Pregnancies and live births following ICSI with testicular spermatozoa after repeated implantation failure using ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:605–609.
- Yoshida N, Perry AC. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc* 2007;**2**:296–304.
- Yu Y, Saunders CM, Lai FA, Swann K. Preimplantation development of mouse oocytes activated by different levels of human phospholipase C zeta. *Hum Reprod* 2008;**23**:365–373.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 2004;**38**:200–213.

**Partie 3:**

**DISCUSSION ET  
CONCLUSIONS**



L'infertilité masculine est une préoccupation croissante dans les sociétés modernes. Parmi les différentes causes d'infertilités masculines, certaines ont une origine génétique. C'est le cas de la globozoospermie. Notre équipe a montré que le gène *DPY19L2* était délété à l'état homozygote chez 70% des patients testés, atteints par cette pathologie ((Harbuz et al., 2011) (Coutton et al., 2012). De manière intéressante, ce gène est impliqué dans 60 à 80% des cas de globozoospermie de type I et représente donc la cause majeure de globozoospermie de type I chez l'homme.

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à la compréhension de la pathogénie moléculaire de la globozoospermie de type I, dépendante du gène *DPY19L2*, dont la cause principale est l'altération de la biogenèse de l'acrosome.

Outre l'absence de l'acrosome, des conséquences moléculaires secondaires également sévères sont observées, telles qu'une condensation défectueuse de la chromatine et une réduction du pouvoir activateur du spermatozoïde globozoospermique. Ces deux défauts doivent être pris en considération lors de la proposition des stratégies thérapeutiques pour cette infertilité, vu l'effet délétère que peut avoir une mauvaise condensation de la chromatine, sur l'intégrité du génome paternel transmis à l'embryon et l'importance du signal calcique activateur, généré par le spermatozoïde au moment de la fécondation, sur la survie et la qualité des embryons obtenus (Tesarik, 1998).

### ***1. Le signal calcique est indispensable à la réussite de la fécondation et l'initiation du développement embryonnaire***

L'ICSI est la méthode de choix pour prendre en charge la globozoospermie. Cependant malgré les nombreuses tentatives d'ICSI réalisées pour les patients globozoospermiques (en absence ou en présence de caractérisation génétique), des échecs répétés ont été obtenus (Battaglia, Koehler, Klein, & Tucker, 1997) et la réussite de la fécondation était rare, sauf dans certains cas cliniques (Stone, O'Mahony, Khalaf, Taylor, & Braude, 2000) (Kilani et al., 2004) (Karaca et al., 2014).

En éliminant la possibilité d'un défaut de maturité ovocytaire, une déficience dans le mécanisme d'activation de l'ovocyte a été considérée comme la cause principale de cet échec (Kashir et al., 2011; Vanden Meerschaut, Nikiforaki, Heindryckx, & De Sutter, 2014) (Heytens et al., 2010). L'échec d'activation ovocytaire a été mis en évidence grâce au développement d'un test de fécondation hétérologue par ICSI, qui consiste en l'injection du spermatozoïde du patient atteint dans un ovocyte de souris. Ce test est appelé MOAT pour

« Mouse Oocyte Activation Test ». Le pourcentage d'activation ovocytaire des spermatozoïdes est ensuite évalué d'après le nombre d'embryons deux cellules obtenus 24 h après l'injection (Heindryckx et al., 2005). Ce test est également utilisé pour le diagnostic d'un défaut d'activation ovocytaire chez des patients qui ne souffrent pas nécessairement d'une infertilité comme la globozoospermie, et qui présentent au contraire un spermogramme tout à fait normal, mais qui ont plusieurs échecs de fécondation (Durban et al., 2015; H. C. Lee et al., 2014).

De nombreuses études réalisées sur des patients globozoospermiques, en absence de caractérisation génétique, ont montré que le défaut de fécondance après ICSI est lié à une déficience de la PLC  $\zeta$  (Heytens et al., 2009) (Taylor et al., 2010). Cette déficience est due à une réduction significative et dans certains cas à une absence complète de son expression au niveau des spermatozoïdes globocéphales (Amdani, Jones, & Coward, 2013).

## ***2. Activation ovocytaire artificielle et restauration du signal calcique dans le cadre de la globozoospermie***

Le défaut d'activation ovocytaire chez les patients globozoospermiques est surmonté avec succès en AMP par le recours à l'activation ovocytaire artificielle (AOA) pour « Assisted Oocyte Activation », associée à l'ICSI (Nasr-Esfahani, Deemeh, & Tavalae, 2010). Plusieurs méthodes d'activation ovocytaire artificielle ont été utilisées dans le cas de la globozoospermie, et ont abouti à la naissance d'enfants normaux et sains (Kashir et al., 2010) (Y. Liu et al., 2014). Parmi ces méthodes on peut citer : l'utilisation du chlorure de strontium  $\text{SrCl}_2$  (J. W. Kim et al., 2012), les ionophores (ionophore calcique A23187) (Rybouchkin et al., 1997) (Tejera et al., 2008) et les impulsions électriques (Egashira, Murakami, Haigo, Horiuchi, & Kuramoto, 2009). Cependant parmi ces procédés variés, la méthode la plus adaptée en AMP est l'activation artificielle des ovocytes via le ionophore calcique (Kuentz et al., 2013) (Karaca, Akpak, Oral, Durmus, & Yilmaz, 2015). Une naissance a été également obtenue pour la première fois dans une tentative d'ICSI après activation électrique des ovocytes humains (Egashira et al., 2009). Dans certains cas rares, la réussite de la fécondation par ICSI était également obtenue, en absence de toute activation ovocytaire artificielle (Coetzee, Windt, Menkveld, Kruger, & Kitshoff, 2001).

Toutefois, de nombreuses contraintes existent quant à l'utilisation des stimuli activateurs artificiels dans l'AMP chez l'homme. Une comparaison entre les différents agents activateurs a été réalisée en utilisant la souris comme modèle animal, dans le but d'évaluer

l'efficacité et la sécurité de l'utilisation de ces agents dans les techniques d'AMP. Bien que l'extrapolation de ces résultats à l'homme doit être toujours faite avec prudence, aucun résultat négatif n'a été retrouvé au niveau du développement pré et post-implantatoire chez la souris (Vanden Meerschaut et al., 2013). De nombreuses études réalisées par différentes équipes ont montré que les enfants nés après AOA en utilisant l'ionophore calcique A23187 comme agent activateur étaient en bonne santé et ne présentaient aucune malformation à la naissance (Kuentz et al., 2013). De même le suivi à long terme de la croissance de ces enfants, après plusieurs années, montrent qu'ils n'ont pas de problème de santé liés spécifiquement à l'ICSI associée à l'AOA (Yoon et al., 2013)

Cette pratique cumule, cependant, deux risques pour l'enfant à naître : 1/ une activation ovocytaire déficiente, basée sur une entrée massive de calcium qui ne mime pas la signalisation calcique complexe physiologique de l'activation ovocytaire (Vanden Meerschaut et al., 2014) et 2/ l'utilisation des agents activateurs de nature chimique, qui peuvent avoir un effet cytotoxique, tératogène et mutagène sur les embryons et les descendants (Chithiwala et al., 2015).

Pour augmenter l'efficacité du traitement et assurer la sécurité des descendants, dans les techniques d'AMP humaine, il serait plus judicieux utiliser la PLC  $\zeta$  comme agent thérapeutique activateur. Cet agent, qui se trouve naturellement dans le spermatozoïde reproduit lorsqu'il est injecté seul une signalisation calcique physiologique aboutissant à la formation de blastocyste de qualité (Nomikos et al., 2013). Cela est particulièrement important surtout que des études récentes ont montré l'effet crucial des fréquences des oscillations calciques, leur amplitude et leur durée sur l'efficacité et la qualité du développement embryonnaire (Kashir, Jones, & Coward, 2012) ainsi que sur le profil épigénétique et l'expression de nombreux gènes indispensables au développement embryonnaire précoce (Ozil, Banrezes, Toth, Pan, & Schultz, 2006; Toth, Huneau, Banrezes, & Ozil, 2006). Cependant, le développement post-implantatoire suite à l'utilisation d'une protéine recombinante humaine n'a pas encore été évalué, et la production d'une protéine recombinante humaine active, stable et sous une forme purifiée appropriée et adaptée pour une utilisation clinique reste un challenge à réaliser.

### ***3. Effet de l'endommagement du génome paternel sur le développement embryonnaire***

L'activation artificielle des ovocytes améliore le taux de fécondation et de grossesse clinique après ICSI chez les hommes infertiles atteints par la globozoospermie. Toutefois ce

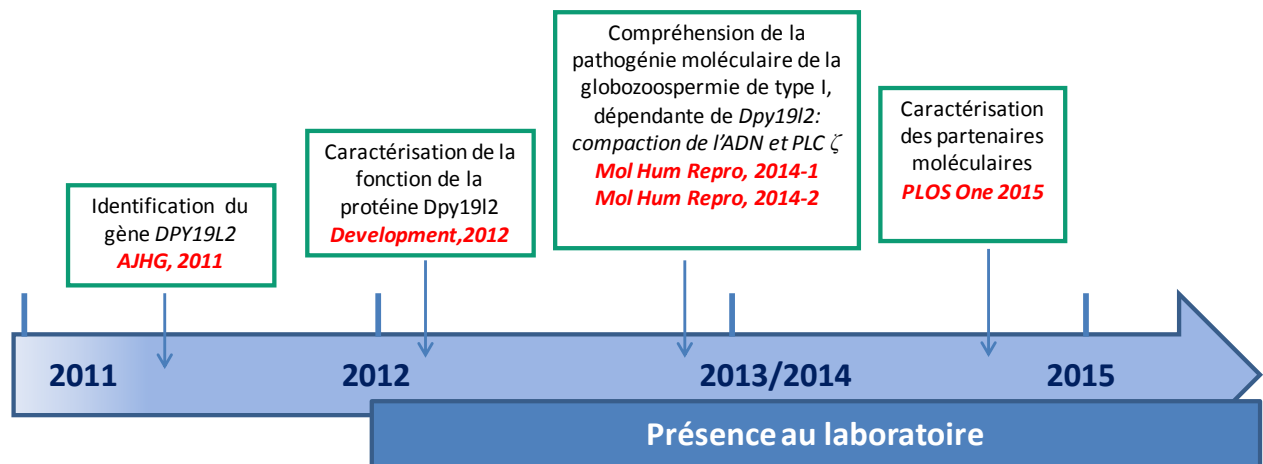
traitement ne semble pas résoudre complètement le mauvais pronostic de ces patients. Ceci est dû à l'endommagement du génome paternel et au degré élevé de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes associés à cette pathologie par rapport aux spermatozoïdes normaux.

Dans le cas de la globozoospermie dépendante du gène *Dpy19l2*, nous avons trouvé que l'endommagement du génome a eu lieu dès la présence des spermatozoïdes au niveau des testicules, avant leur transit dans l'épididyme. Cela signifie que l'origine de ces cassures peut être une activité incontrôlée de la TOP2B, dont l'activation fait partie du processus normal de la condensation du génome spermatique ou une déficience de ses inhibiteurs. La présence de ces lésions peut être associée à une altération du système de réparation de l'ADN qui a abouti à la persistance des cassures non réparées au niveau du spermatozoïde mature. De même, le défaut de protamination observé rend l'ADN, non protégé par les protamines, instable et plus vulnérable et donc facilement susceptible à l'endommagement.

Quel que soit l'origine de ces endommagements, l'utilisation de tels spermatozoïdes en AMP fait courir le risque d'une fécondation avec un spermatozoïde porteur de lésions de l'ADN. (Gandini et al., 2004). Bien que l'ovocyte possède des systèmes de réparation qui interviennent après la fécondation des deux gamètes, il existe un seuil au-delà duquel leur capacité à réparer l'endommagement n'est plus possible. De plus, les processus de réparation de l'ovocyte peuvent être imparfaits lorsque par exemple les taux de fragmentation sont très élevés. Globalement, cela entraîne des échecs d'implantation, des fausses couches et des avortements spontanés. Cependant certaines grossesses vont à terme malgré les erreurs génétiques et sont à l'origine de malformation des enfants (Fauser et al., 2014; S. E. Lewis & Aitken, 2005).

Afin d'évaluer l'utilisation d'une telle pratique médicale, qui représente aujourd'hui la seule méthode efficace permettant d'aboutir à une grossesse dans le cadre de la globozoospermie de type I, il est crucial de caractériser les défauts des spermatozoïdes, en ciblant plus particulièrement l'intégrité génétique et épigénétique du génome du future embryon (Evenson & Wixon, 2006).

## CONCLUSIONS:



- Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'identification de la fonction de la protéine *Dpy19l2* et à son importance dans la stabilisation l'ancrage de l'acrosome au noyau spermatique de grâce au modèle de souris KO pour *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> (Pierre et al., 2012).
- J'ai cherché également à étudier les partenaires moléculaires qui interagissent avec elle afin de maintenir l'attachement de l'acrosome à l'EN. Je me suis intéressée à l'étude de la protéine *Sun5* également nommée *SPAG4L*, initialement située au niveau de la membrane nucléaire interne en regard de l'acrosome par une autre équipe (Frohnert et al.2011). Les résultats que j'ai obtenus ont montré que contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature *Sun5* est située dans la membrane nucléaire interne mais du côté postérieur et à l'opposé de l'acrosome. *Sun5* ne peut pas être donc un partenaire fonctionnel de *Dpy19l2*. De manière intéressante, dans le modèle globozoospermique déficient pour le gène *Dpy19l2*, on assiste à une redistribution de *Sun5* vers la zone occupée initialement par l'acrosome, pour former ainsi un anneau périnucléaire. Ceci suggère l'existence d'un facteur empêchant la présence de *Sun5* au niveau de la jonction acrosome/EN. De manière plus générale, aucune protéine *Sun* n'est présente dans la région sous acrosomale et les complexes LINC sont donc exclus de cette région. De ce fait, *Dpy19l2* est la seule protéine, identifiée à ce jour, impliquée dans l'attachement de l'acrosome au noyau, et les complexes LINC ne sont pas impliqués. *Dpy19l2* pourrait être ainsi un membre d'un nouveau type de complexe permettant le maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire et l'attachement de certains organites à l'EN. Dans la suite du travail, il serait donc nécessaire de chercher les partenaires cd *Dpy19l2* impliqués dans ce complexe macromoléculaire nécessaire à l'ancrage de l'acrosome sur le noyau et plus particulièrement localisé dans la membrane nucléaire externe.



○ J'ai étudié les principales causes qui sous-tendent l'échec de la fécondation après ICSI, en utilisant des spermatozoïdes globocéphales *Dpy1912*<sup>-/-</sup> :

○ En évaluant le pouvoir fécondant des spermatozoïdes globocéphales, j'ai pu mettre en évidence que les spermatozoïdes *Dpy1912*<sup>-/-</sup> étaient incapables de déclencher l'activation ovocytaire. La perte du pouvoir activateur des spermatozoïdes globocéphales est due à l'absence de PLC $\zeta$ , probablement perdue au cours de la spermiogenèse chez ces spermatozoïdes. En effet, en étudiant la localisation exacte de la PLC  $\zeta$  par microscopie électronique, nous avons montré pour la première fois, qu'elle est située au niveau de la thèque périnucléaire, près de la membrane acrosomale interne. Dans le spermatozoïde globocéphale cette structure n'est pas présente car le détachement de l'acrosome au cours de la spermiogénèse déficiente entraîne un arrachement de la membrane nucléaire externe. La protéine ne peut donc se maintenir dans ces spermatozoïdes et se retrouve probablement éliminée lors de l'éjection du corps résiduel permettant la réduction de volume du spermatozoïde.

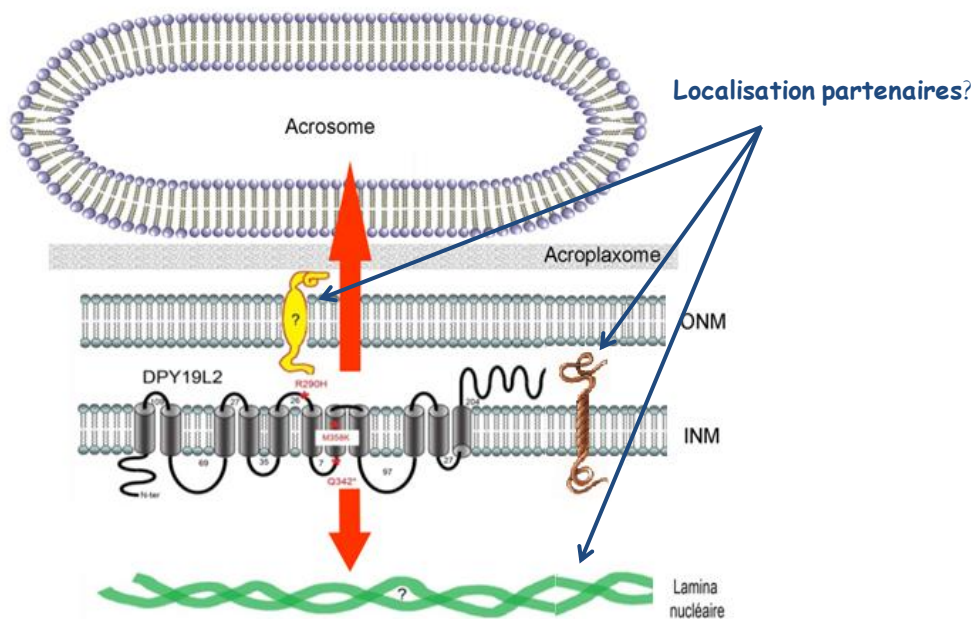
○ J'ai aussi montré que la restauration du pouvoir fécondant des spermatozoïdes par l'injection de l'ARNm de la PLC  $\zeta$  en même temps que les spermatozoïdes *Dpy1912*<sup>-/-</sup> dans les ovocytes MII de souris, ne permet pas un développement embryonnaire normal. Ceci suggère que le spermatozoïde globocéphale possède d'autres défauts incompatibles avec un développement embryonnaire normal tel qu'un défaut de compaction de son génome. En étudiant les principales étapes impliquées dans la compaction du génome spermatique, j'ai pu montrer que l'ADN spermatique renferme des défauts multiples qui sont : la rétention des histones, un défaut de protamination et un taux élevé de cassures de l'ADN. Ces trois défauts, qui sont trop nombreux pour être réparés par l'ovocyte, perturbent l'intégrité de l'information génétique et épigénétique que le spermatozoïde doit transmettre pour assurer un développement optimal de l'embryon.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggèrent que l'échec du développement embryonnaire dans le cas de la globozoospermie dépendante du gène *Dpy1912* est dû à l'association d'un défaut d'activation ovocytaire et d'une baisse dramatique de la qualité de l'information génétique et épigénétique du spermatozoïde.

## PERSPECTIVES :

La globozoospermie est un phénotype complexe. Outre les résultats que j'ai obtenus, de nombreuses questions restent sans réponse et méritent d'être investiguées. La poursuite de ce travail peut ainsi se porter sur :

- *La caractérisation des partenaires moléculaires de Dpy19l2.*



**Figure 54 :** Modèle représentant les différentes localisations que peut avoir le (s) partenaire (s) de Dpy19l2, permettant ensemble d'ancrer l'acrosome au noyau en stabilisant la jonction acroplaxome-lamina nucléaire.

La fixation de l'acrosome sur le noyau peut être due à la formation d'un complexe unique spécifique au spermatozoïde et qui reste donc à dévoiler. Il existe d'autres acteurs moléculaires agissant en coordination avec Dpy19l2 et qui restent encore à caractériser. Ces partenaires peuvent être soit des protéines de l'enveloppe nucléaire interne, des protéines de l'enveloppe nucléaire externe voir même des protéines associées à la chromatine et impliquées dans la condensation de la chromatine (**Figure 54**).

La recherche de ces partenaires se fera grâce à des techniques classiques comme le double hybride ou des « pull Down » associés à la spectrométrie de masse. De même l'application de la technique Chip on Chip permettra de mettre en évidence une interaction potentielle de Dpy19l2 avec l'ADN.

- *Identification des principales causes de l'inaccessibilité des protamines au noyau spermatique :*

- Etude du transport nucléo-cytoplasmique. Etude comparative de la distribution des pores nucléaires à travers la membrane nucléaire et les différentes importines qui peuvent être impliquées.

- Etude de l'expression et la localisation des protéines kinases responsables de la phosphorylation des protamines 1 et 2, qui sont respectivement SRPK1 et Camk4. En effet la phosphorylation des protamines joue un rôle essentiel sur leur déposition sur l'ADN.
- Identification du type de protéines histones retenues au niveau du noyau spermatique *Dpy1912*<sup>-/-</sup> chez l'homme et chez la souris en comparant aux spermatozoïdes contrôles.
- La déficience en protamines et le taux élevé de fragmentation de l'ADN peuvent engendrer des altérations génétiques et épigénétiques modifiant la régulation de l'expression des gènes indispensables au développement embryonnaire précoce. Il serait important d' :
  - Etudier le profil de méthylation de l'ADN spermatique et zygotique (étude de la 5-hydroxyméthylcytosine). Une étude récente montre en effet une différence du profil de méthylation (particulièrement une hypométhylation) de certains gènes entre un patient globozoospermique et un contrôle (X. X. Wang et al., 2015).
  - Identifier les causes des fragmentations excessives de l'ADN : protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, expression de la TOP2B...
  - Réaliser une comparaison transcriptomique des petits ARN entre les spermatozoïdes WT et *Dpy1912*<sup>-/-</sup>. Cela pourrait permettre d'Identifier des petits ARN cruciaux pour le développement de l'embryon.
- ***Rôle de Dpy1912 dans la glycosylation des protéines spermatiques***

Une étude récente en 2013 montre que l'orthologue Dpy19 de *Dpy1912* chez le vers *C. elegans* est une OST (oligosaccharide transférase) de type manosyltransférase (Buettner, Ashikov, Tiemann, Lehle, & Bakker, 2013). Le domaine catalytique de cette enzyme est fortement conservé chez *Dpy1912* au niveau de son extrémité C-terminal luminale. Ceci montre que la protéine *Dpy1912* pourrait être impliquée dans la glycosylation des protéines spermatiques. La caractérisation d'une fonction glycosylation de *Dpy1912* est une question majeure et prioritaire. Pour ce faire, je compte dans un premier temps comparer le profil de glycosylation des spermatozoïdes WT et KO. Dans l'hypothèse où certaines protéines ne seraient plus glycosylées en absence de *Dpy1912*, je les caractériserai par spectrométrie de masse. Ces glycosylations sont peut être à l'origine des défauts observés comme le détachement de l'acrosome, la perte de la PLC  $\zeta$  et les défauts de compaction.



- Abou-Haila, A., & Tulsiani, D. R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys*, *379*(2), 173-182. doi: 10.1006/abbi.2000.1880
- Acharyya, S., Kanjilal, S., & Bhattacharyya, A. K. (2005). Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J Exp Biol*, *43*(11), 1016-1022.
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, *16*(1), 3-13. doi: 10.1093/molehr/gap059
- Alfonso, P. J., & Kistler, W. S. (1993). Immunohistochemical localization of spermatid nuclear transition protein 2 in the testes of rats and mice. *Biol Reprod*, *48*(3), 522-529.
- Allais-Bonnet, A., & Pailhoux, E. (2014). Role of the prion protein family in the gonads. *Front Cell Dev Biol*, *2*, 56. doi: 10.3389/fcell.2014.00056
- Alvarez Sedo, C., Rawe, V. Y., & Chemes, H. E. (2012). Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Hum Reprod*, *27*(7), 1912-1921. doi: 10.1093/humrep/des126
- Amdani, S. N., Jones, C., & Coward, K. (2013). Phospholipase C zeta (PLCzeta): oocyte activation and clinical links to male factor infertility. *Adv Biol Regul*, *53*(3), 292-308. doi: 10.1016/j.jbior.2013.07.005
- An, J. Y., Kim, E. A., Jiang, Y., Zakrzewska, A., Kim, D. E., Lee, M. J., . . . Kwon, Y. T. (2010). UBR2 mediates transcriptional silencing during spermatogenesis via histone ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(5), 1912-1917. doi: 10.1073/pnas.0910267107
- Anderson, D. J., & Hetzer, M. W. (2007). Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*, *9*(10), 1160-1166. doi: 10.1038/ncb1636
- Arimitsu, N., Kogure, T., Baba, T., Nakao, K., Hamamoto, H., Sekimizu, K., . . . Tani, K. (2011). p125/Sec23-interacting protein (Sec23ip) is required for spermiogenesis. *FEBS Lett*, *585*(14), 2171-2176. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.050
- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S. A., Paradowska, A., Platts, A. E., . . . Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res*, *19*(8), 1338-1349. doi: 10.1101/gr.094953.109
- Atorino, L., Alvarez-Gonzalez, R., Cardone, A., Lepore, I., Farina, B., & Quesada, P. (2000). Metabolic changes in the poly(ADP-ribosylation) pathway of differentiating rat germinal cells. *Arch Biochem Biophys*, *381*(1), 111-118. doi: 10.1006/abbi.2000.1926
- Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2010). Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst Biol Reprod Med*, *56*(1), 44-61. doi: 10.3109/19396360903490790
- Baarends, W. M., Hoogerbrugge, J. W., Roest, H. P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J. H., & Grootegoed, J. A. (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol*, *207*(2), 322-333. doi: 10.1006/dbio.1998.9155
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*, *8*(9), 227. doi: 10.1186/gb-2007-8-9-227
- Bao, X., Wang, Y., Li, X., Li, X. M., Liu, Z., Yang, T., . . . Li, X. D. (2014). Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *Elife*, *3*. doi: 10.7554/eLife.02999
- Battaglia, D. E., Koehler, J. K., Klein, N. A., & Tucker, M. J. (1997). Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil Steril*, *68*(1), 118-122.
- Baumann, K. (2015). Post-translational modifications: Crotonylation versus acetylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *16*(5), 265. doi: 10.1038/nrm3992
- Bedford-Guaus, S. J., McPartlin, L. A., Xie, J., Westmiller, S. L., Buffone, M. G., & Roberson, M. S. (2011). Molecular cloning and characterization of phospholipase C zeta in equine sperm and testis reveals species-specific differences in expression of catalytically active protein. *Biol Reprod*, *85*(1), 78-88. doi: 10.1095/biolreprod.110.089466

- Behnen, M., Murk, K., Kursula, P., Cappallo-Obermann, H., Rothkegel, M., Kierszenbaum, A. L., & Kirchhoff, C. (2009). Testis-expressed profilins 3 and 4 show distinct functional characteristics and localize in the acroplaxome-manchette complex in spermatids. *BMC Cell Biol*, *10*, 34. doi: 10.1186/1471-2121-10-34
- Ben-Yosef, D., & Shalgi, R. (2001). Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol Med*, *7*(4), 163-169.
- Bench, G., Corzett, M. H., Kramer, C. E., Grant, P. G., & Balhorn, R. (2000). Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. *Mol Reprod Dev*, *56*(4), 512-519. doi: 10.1002/1098-2795(200008)56:4<512::AID-MRD9>3.0.CO;2-M
- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, *12*(2), 142-148.
- Berkovits, B. D., & Wolgemuth, D. J. (2013). The role of the double bromodomain-containing BET genes during mammalian spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol*, *102*, 293-326. doi: 10.1016/B978-0-12-416024-8.00011-8
- Berruti, G., & Paiardi, C. (2011). Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*, *1*(2), 95-98. doi: 10.4161/spmg.1.2.16820
- Bianchi, F., Rousseaux-Prevost, R., Sautiere, P., & Rousseaux, J. (1992). P2 protamines from human sperm are zinc -finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun*, *182*(2), 540-547.
- Boissonneault, G. (2002). Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett*, *514*(2-3), 111-114.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, *22*(6), 1506-1512. doi: 10.1093/humrep/dem046
- Bonne, G. (2014). Nuclear envelope proteins in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol*, *29*, 93-94. doi: 10.1016/j.semcd.2014.04.023
- Borg, C. L., Wolski, K. M., Gibbs, G. M., & O'Bryan, M. K. (2010). Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum Reprod Update*, *16*(2), 205-224. doi: 10.1093/humupd/dmp032
- Borrego-Pinto, J., Jegou, T., Osorio, D. S., Aurade, F., Gorjanacz, M., Koch, B., . . . Gomes, E. R. (2012). Samp1 is a component of TAN lines and is required for nuclear movement. *J Cell Sci*, *125*(Pt 5), 1099-1105. doi: 10.1242/jcs.087049
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., & Saad, A. (2012). Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa. *Andrologia*, *44*(2), 130-135. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01115.x
- Brewer, L., Corzett, M., & Balhorn, R. (2002). Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem*, *277*(41), 38895-38900. doi: 10.1074/jbc.M204755200
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E. J., Roloff, T. C., . . . Peters, A. H. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol*, *17*(6), 679-687. doi: 10.1038/nsmb.1821
- Buettner, F. F., Ashikov, A., Tiemann, B., Lehle, L., & Bakker, H. (2013). C. elegans DPY-19 is a C-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol Cell*, *50*(2), 295-302. doi: 10.1016/j.molcel.2013.03.003
- Buffone, M. G., Foster, J. A., & Gerton, G. L. (2008). The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int J Dev Biol*, *52*(5-6), 511-522. doi: 10.1387/ijdb.072532mb
- Burke, B. (2012). It takes KASH to hitch to the SUN. *Cell*, *149*(5), 961-963. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.004
- Camozzi, D., Capanni, C., Cenni, V., Mattioli, E., Columbaro, M., Squarzone, S., & Lattanzi, G. (2014). Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics. Focus on laminopathies. *Nucleus*, *5*(5), 427-440. doi: 10.4161/nucl.36289

- Caron, C., Govin, J., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2005). How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol*, 38, 65-89.
- Caron, N., Veilleux, S., & Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev*, 58(4), 437-443. doi: 10.1002/1098-2795(20010401)58:4<437::AID-MRD12>3.0.CO;2-Q
- Carrell, D. T., Emery, B. R., & Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update*, 13(3), 313-327. doi: 10.1093/humupd/dml057
- Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., & Whitaker, M. (1994). Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*, 120(12), 3507-3517.
- Carson, A. R., Cheung, J., & Scherer, S. W. (2006). Duplication and relocation of the functional DPY19L2 gene within low copy repeats. *BMC Genomics*, 7, 45. doi: 10.1186/1471-2164-7-45
- Cebesoy, F. B., Aydos, K., & Unlu, C. (2006). Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl*, 52(5), 397-402. doi: 10.1080/01485010600666953
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, 70, 369-413. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369
- Chang, W., Worman, H. J., & Gundersen, G. G. (2015). Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol*, 208(1), 11-22. doi: 10.1083/jcb.201409047
- Chauviere, M., Martinage, A., Debarle, M., Sautiere, P., & Chevaillier, P. (1992). Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *Eur J Biochem*, 204(2), 759-765.
- Chi, Y. H., Chen, C. Y., & Jeang, K. T. (2012). Reversal of laminopathies: the curious case of SUN1. *Nucleus*, 3(5), 418-421. doi: 10.4161/nucl.21714
- Chithiwala, Z. H., Lee, H. C., Hill, D. L., Jellerette-Nolan, T., Fissore, R., Grow, D., & Dumesic, D. A. (2015). Phospholipase C-zeta deficiency as a cause for repetitive oocyte fertilization failure during ovarian stimulation for in vitro fertilization with ICSI: a case report. *J Assist Reprod Genet*. doi: 10.1007/s10815-015-0531-1
- Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W. D., Goulding, E. H., Stein, P., Xu, Z., . . . Eddy, E. M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod*, 69(1), 211-217. doi: 10.1095/biolreprod.102.015115
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y. C., Hecht, N. B., & Eddy, E. M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*, 28(1), 82-86. doi: 10.1038/88313
- Choi, Y. C., Aizawa, A., & Hecht, N. B. (1997). Genomic analysis of the mouse protamine 1, protamine 2, and transition protein 2 gene cluster reveals hypermethylation in expressing cells. *Mamm Genome*, 8(5), 317-323.
- Coetzee, K., Windt, M. L., Menkveld, R., Kruger, T. F., & Kitshoff, M. (2001). An intracytoplasmic sperm injection pregnancy with a globozoospermic male. *J Assist Reprod Genet*, 18(5), 311-313.
- Coutton, C., Escoffier, J., Martinez, G., Arnoult, C., & Ray, P. F. (2015). Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update*, 21(4), 455-485. doi: 10.1093/humupd/dmv020
- Coutton, C., Zouari, R., Abada, F., Ben Khelifa, M., Merdassi, G., Triki, C., . . . Ray, P. F. (2012). MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum Reprod*, 27(8), 2549-2558. doi: 10.1093/humrep/des160
- Cox, L. J., Larman, M. G., Saunders, C. M., Hashimoto, K., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction*, 124(5), 611-623.
- Crisp, M., & Burke, B. (2008). The nuclear envelope as an integrator of nuclear and cytoplasmic architecture. *FEBS Lett*, 582(14), 2023-2032. doi: 10.1016/j.febslet.2008.05.001

- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., . . . Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*, *172*(1), 41-53. doi: 10.1083/jcb.200509124
- Cutter, A. R., & Hayes, J. J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett*. doi: 10.1016/j.febslet.2015.05.016
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., & Poirier, G. G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*, *342* ( Pt 2), 249-268.
- Dadoune, J. P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*, *61*(1), 56-75. doi: 10.1002/jemt.10317
- Dale, B., Wilding, M., Coppola, G., & Tosti, E. (2010). How do spermatozoa activate oocytes? *Reprod Biomed Online*, *21*(1), 1-3. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.02.015
- Dam, A. H., Feenstra, I., Westphal, J. R., Ramos, L., van Golde, R. J., & Kremer, J. A. (2007). Globozoospermia revisited. *Hum Reprod Update*, *13*(1), 63-75. doi: 10.1093/humupd/dml047
- Dam, A. H., Kosciński, I., Kremer, J. A., Moutou, C., Jaeger, A. S., Oudakker, A. R., . . . Viville, S. (2007). Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet*, *81*(4), 813-820. doi: 10.1086/521314
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Trevino, C. L. (2011). Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa. *Physiol Rev*, *91*(4), 1305-1355. doi: 10.1152/physrev.00028.2010
- De Braekeleer, M., Nguyen, M. H., Morel, F., & Perrin, A. (2015). Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *J Assist Reprod Genet*, *32*(4), 615-623. doi: 10.1007/s10815-015-0433-2
- de Mateo, S., Ramos, L., de Boer, P., Meistrich, M., & Oliva, R. (2011). Protamine 2 precursors and processing. *Protein Pept Lett*, *18*(8), 778-785.
- Debarle, M., Martinage, A., Sautiere, P., & Chevillier, P. (1995). Persistence of protamine precursors in mature sperm nuclei of the mouse. *Mol Reprod Dev*, *40*(1), 84-90. doi: 10.1002/mrd.1080400111
- Dechat, T., Adam, S. A., & Goldman, R. D. (2009). Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function. *Adv Enzyme Regul*, *49*(1), 157-166. doi: 10.1016/j.advenzreg.2008.12.003
- Derijck, A. A., van der Heijden, G. W., Giele, M., Philippens, M. E., van Bavel, C. C., & de Boer, P. (2006). gammaH2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *DNA Repair (Amst)*, *5*(8), 959-971. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.043
- Dhar, S., Thota, A., & Rao, M. R. (2012). Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J Biol Chem*, *287*(9), 6387-6405. doi: 10.1074/jbc.M111.288167
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., & Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev Cell*, *12*(6), 863-872. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.018
- Dirican, E. K., Isik, A., Vicdan, K., Sozen, E., & Suludere, Z. (2008). Clinical pregnancies and livebirths achieved by intracytoplasmic injection of round headed acrosomeless spermatozoa with and without oocyte activation in familial globozoospermia: case report. *Asian J Androl*, *10*(2), 332-336. doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00248.x
- Dover, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M. A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M., & Shilatifard, A. (2002). Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. *J Biol Chem*, *277*(32), 28368-28371. doi: 10.1074/jbc.C200348200
- Ducibella, T., Schultz, R. M., & Ozil, J. P. (2006). Role of calcium signals in early development. *Semin Cell Dev Biol*, *17*(2), 324-332. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.02.010
- Durban, M., Barragan, M., Colodron, M., Ferrer-Buitrago, M., De Sutter, P., Heindryckx, B., . . . Vassena, R. (2015). PLCzeta disruption with complete fertilization failure in normozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, *32*(6), 879-886. doi: 10.1007/s10815-015-0496-0
- Egashira, A., Murakami, M., Haigo, K., Horiuchi, T., & Kuramoto, T. (2009). A successful pregnancy and live birth after intracytoplasmic sperm injection with globozoospermic sperm and



- electrical oocyte activation. *Fertil Steril*, 92(6), 2037 e2035-2039. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.08.013
- Elinati, E., Kuentz, P., Redin, C., Jaber, S., Vanden Meerschaut, F., Makarian, J., . . . Viville, S. (2012). Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum Mol Genet*, 21(16), 3695-3702. doi: 10.1093/hmg/dds200
- Elkhatib, R., Longepied, G., Paci, M., Achard, V., Grillo, J. M., Levy, N., . . . Metzler-Guillemain, C. (2015). Nuclear envelope remodelling during human spermiogenesis involves somatic B-type lamins and a spermatid-specific B3 lamin isoform. *Mol Hum Reprod*, 21(3), 225-236. doi: 10.1093/molehr/gau111
- Elsevier, S. M., Noiran, J., & Carre-Eusebe, D. (1991). Processing of the precursor of protamine P2 in mouse. Identification of intermediates by their insolubility in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Eur J Biochem*, 196(1), 167-175.
- Evenson, D. P., & Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65(5), 979-991. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.011
- Fang, S., & Weissman, A. M. (2004). A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci*, 61(13), 1546-1561. doi: 10.1007/s00018-004-4129-5
- Fantz, D. A., Hatfield, W. R., Horvath, G., Kistler, M. K., & Kistler, W. S. (2001). Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod*, 64(2), 425-431.
- Faraone-Mennella, M. R. (2005). Chromatin architecture and functions: the role(s) of poly(ADP-RIBOSE) polymerase and poly(ADPribosyl)ation of nuclear proteins. *Biochem Cell Biol*, 83(3), 396-404. doi: 10.1139/o05-042
- Farrington, J. E., Patel, R., & Ward, W. S. (1991). DNA attachment to the hamster sperm nuclear matrix and nuclear annulus. *Ann N Y Acad Sci*, 637, 164-174.
- Fausser, B. C., Devroey, P., Diedrich, K., Balaban, B., Bonduelle, M., Delemarre-van de Waal, H. A., . . . Evian Annual Reproduction Workshop, G. (2014). Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online*, 28(2), 162-182. doi: 10.1016/j.rbmo.2013.10.013
- Ferrer, M., Rodriguez, H., Zara, L., Yu, Y., Xu, W., & Oko, R. (2012). MMP2 and acrosin are major proteinases associated with the inner acrosomal membrane and may cooperate in sperm penetration of the zona pellucida during fertilization. *Cell Tissue Res*, 349(3), 881-895. doi: 10.1007/s00441-012-1429-1
- Ferrer, M., Xu, W., & Oko, R. (2012). The composition, protein genesis and significance of the inner acrosomal membrane of eutherian sperm. *Cell Tissue Res*, 349(3), 733-748. doi: 10.1007/s00441-012-1433-5
- Frohnert, C., Schweizer, S., & Hoyer-Fender, S. (2011). SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol Hum Reprod*, 17(4), 207-218. doi: 10.1093/molehr/gaq099
- Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., & Rosado, A. (2000). Sperm chromatin. *Arch Androl*, 45(3), 215-225.
- Fujihara, Y., Satouh, Y., Inoue, N., Isotani, A., Ikawa, M., & Okabe, M. (2012). SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development*, 139(19), 3583-3589. doi: 10.1242/dev.081778
- Fujimoto, S., Yoshida, N., Fukui, T., Amanai, M., Isobe, T., Itagaki, C., . . . Perry, A. C. (2004). Mammalian phospholipase C $\zeta$  induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol*, 274(2), 370-383. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.025
- Funaki, T., Kon, S., Tanabe, K., Natsume, W., Sato, S., Shimizu, T., . . . Satake, M. (2013). The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the trans-Golgi network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis. *Mol Biol Cell*, 24(17), 2633-2644. doi: 10.1091/mbc.E13-05-0234

- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P., Leter, G., . . . Spano, M. (2004). Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*, *19*(6), 1409-1417. doi: 10.1093/humrep/deh233
- Garcia, B. A., Hake, S. B., Diaz, R. L., Kauer, M., Morris, S. A., Recht, J., . . . Hunt, D. F. (2007). Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem*, *282*(10), 7641-7655. doi: 10.1074/jbc.M607900200
- Garcia, J., Noriega-Hoces, L., & Gonzales, G. F. (2007). Sperm chromatin stability and its relationship with fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in an assisted reproduction program. *J Assist Reprod Genet*, *24*(12), 587-593. doi: 10.1007/s10815-007-9174-1
- Gatewood, J. M., Cook, G. R., Balhorn, R., Bradbury, E. M., & Schmid, C. W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*, *236*(4804), 962-964.
- Gaucher, J., Bousouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., . . . Khochbin, S. (2012). Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J*, *31*(19), 3809-3820. doi: 10.1038/emboj.2012.233
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Bousouar, F., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J*, *277*(3), 599-604. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x
- Geiman, T. M., & Robertson, K. D. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J Cell Biochem*, *87*(2), 117-125. doi: 10.1002/jcb.10286
- Gerace, L., & Huber, M. D. (2012). Nuclear lamina at the crossroads of the cytoplasm and nucleus. *J Struct Biol*, *177*(1), 24-31. doi: 10.1016/j.jsb.2011.11.007
- Gerlitz, G., & Bustin, M. (2011). The role of chromatin structure in cell migration. *Trends Cell Biol*, *21*(1), 6-11. doi: 10.1016/j.tcb.2010.09.002
- Gob, E., Meyer-Natus, E., Benavente, R., & Alsheimer, M. (2011). Expression of individual mammalian Sun1 isoforms depends on the cell type. *Commun Integr Biol*, *4*(4), 440-442. doi: 10.4161/cib.4.4.15369
- Gob, E., Schmitt, J., Benavente, R., & Alsheimer, M. (2010). Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One*, *5*(8), e12072. doi: 10.1371/journal.pone.0012072
- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T., & Adam, S. A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*, *14*(9), 505-514. doi: 10.1016/j.tcb.2004.07.016
- Gotzmann, J., & Foisner, R. (1999). Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, *9*(3-4), 257-265.
- Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2014). Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J Mol Biol*, *426*(20), 3342-3349. doi: 10.1016/j.jmb.2014.02.023
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem*, *271*(17), 3459-3469. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04266.x
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., . . . Caron, C. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol*, *176*(3), 283-294. doi: 10.1083/jcb.200604141
- Govin, J., & Khochbin, S. (2013). Histone variants and sensing of chromatin functional states. *Nucleus*, *4*(6), 438-442. doi: 10.4161/nucl.27088
- Govin, J., Lestrat, C., Caron, C., Pivot-Pajot, C., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2006). Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. *Ernst Schering Res Found Workshop*(57), 155-172.
- Green, G. R., Balhorn, R., Poccia, D. L., & Hecht, N. B. (1994). Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev*, *37*(3), 255-263. doi: 10.1002/mrd.1080370303

- Grimes, S. R., Jr., Meistrich, M. L., Platz, R. D., & Hnilica, L. S. (1977). Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. *Exp Cell Res*, *110*(1), 31-39.
- Gruenbaum, Y., Goldman, R. D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., . . . Enosh, A. (2003). The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol*, *226*, 1-62.
- Gruenbaum, Y., & Medalia, O. (2015). Lamins: the structure and protein complexes. *Curr Opin Cell Biol*, *32*, 7-12. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.009
- Gruenbaum, Y., Wilson, K. L., Harel, A., Goldberg, M., & Cohen, M. (2000). Review: nuclear lamins-- structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol*, *129*(2-3), 313-323. doi: 10.1006/jsbi.2000.4216
- Grzmil, P., Boinska, D., Kleene, K. C., Adham, I., Schluter, G., Kamper, M., . . . Engel, W. (2008). Prm3, the fourth gene in the mouse protamine gene cluster, encodes a conserved acidic protein that affects sperm motility. *Biol Reprod*, *78*(6), 958-967. doi: 10.1095/biolreprod.107.065706
- Guilluy, C., & Burrridge, K. (2015). Nuclear mechanotransduction: forcing the nucleus to respond. *Nucleus*, *6*(1), 19-22. doi: 10.1080/19491034.2014.1001705
- Gungor-Ordueri, N. E., Celik-Ozenci, C., & Cheng, C. Y. (2014). Fascin 1 is an actin filament-bundling protein that regulates ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *307*(9), E738-753. doi: 10.1152/ajpendo.00113.2014
- Gupta, N., Madapura, M. P., Bhat, U. A., & Rao, M. R. (2015). Mapping of Post-translational Modifications of Transition Proteins, TP1 and TP2, and Identification of Protein Arginine Methyltransferase 4 and Lysine Methyltransferase 7 as Methyltransferase for TP2. *J Biol Chem*, *290*(19), 12101-12122. doi: 10.1074/jbc.M114.620443
- Gusse, M., Sautiere, P., Belaiche, D., Martinage, A., Roux, C., Dadoune, J. P., & Chevaillier, P. (1986). Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta*, *884*(1), 124-134.
- Haince, J. F., Kozlov, S., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Hendzel, M. J., Lavin, M. F., & Poirier, G. G. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem*, *282*(22), 16441-16453. doi: 10.1074/jbc.M608406200
- Halet, G., Tunwell, R., Balla, T., Swann, K., & Carroll, J. (2002). The dynamics of plasma membrane PtdIns(4,5)P(2) at fertilization of mouse eggs. *J Cell Sci*, *115*(Pt 10), 2139-2149.
- Hammoud, S. S., Nix, D. A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D. T., & Cairns, B. R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*, *460*(7254), 473-478. doi: 10.1038/nature08162
- Haque, F., Lloyd, D. J., Smallwood, D. T., Dent, C. L., Shanahan, C. M., Fry, A. M., . . . Shackleton, S. (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*, *26*(10), 3738-3751. doi: 10.1128/MCB.26.10.3738-3751.2006
- Harbuz, R., Zouari, R., Pierre, V., Ben Khelifa, M., Kharouf, M., Coutton, C., . . . Ray, P. F. (2011). A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet*, *88*(3), 351-361. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.02.007
- Hayasaka, S., Terada, Y., Suzuki, K., Murakawa, H., Tachibana, I., Sankai, T., . . . Okamura, K. (2008). Intramanchette transport during primate spermiogenesis: expression of dynein, myosin Va, motor recruiter myosin Va, Villa-Rab27a/b interacting protein, and Rab27b in the manchette during human and monkey spermiogenesis. *Asian J Androl*, *10*(4), 561-568. doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00392.x
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A. K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., . . . Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol*, *79*(12), 950-960. doi: 10.1078/0171-9335-00123
- He, H., & Lehming, N. (2003). Global effects of histone modifications. *Brief Funct Genomic Proteomic*, *2*(3), 234-243.

- Heid, H., Figge, U., Winter, S., Kuhn, C., Zimbelmann, R., & Franke, W. (2002). Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res*, 279(2), 177-187.
- Heidaran, M. A., Showman, R. M., & Kistler, W. S. (1988). A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J Cell Biol*, 106(5), 1427-1433.
- Heidari, M. M., Khatami, M., Talebi, A. R., & Moezzi, F. (2014). Mutation analysis of TNP1 gene in infertile men with varicocele. *Iran J Reprod Med*, 12(4), 257-262.
- Heindryckx, B., Van der Elst, J., De Sutter, P., & Dhont, M. (2005). Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Hum Reprod*, 20(8), 2237-2241. doi: 10.1093/humrep/dei029
- Hetzer, M. W. (2010). The nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(3), a000539. doi: 10.1101/cshperspect.a000539
- Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S. Y., . . . De Sutter, P. (2009). Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod*, 24(10), 2417-2428. doi: 10.1093/humrep/dep207
- Heytens, E., Schmitt-John, T., Moser, J. M., Jensen, N. M., Soleimani, R., Young, C., . . . De Sutter, P. (2010). Reduced fertilization after ICSI and abnormal phospholipase C zeta presence in spermatozoa from the wobbler mouse. *Reprod Biomed Online*, 21(6), 742-749. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.07.006
- Hicks, S. N., Jezyk, M. R., Gershburg, S., Seifert, J. P., Harden, T. K., & Sondek, J. (2008). General and versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Mol Cell*, 31(3), 383-394. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.018
- Ho, H. C. (2010). Redistribution of nuclear pores during formation of the redundant nuclear envelope in mouse spermatids. *J Anat*, 216(4), 525-532. doi: 10.1111/j.1469-7580.2009.01204.x
- Horn, H. F., Kim, D. I., Wright, G. D., Wong, E. S., Stewart, C. L., Burke, B., & Roux, K. J. (2013). A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J Cell Biol*, 202(7), 1023-1039. doi: 10.1083/jcb.201304004
- Hou, H., & Yu, H. (2010). Structural insights into histone lysine demethylation. *Curr Opin Struct Biol*, 20(6), 739-748. doi: 10.1016/j.sbi.2010.09.006
- Huang, W. P., & Ho, H. C. (2006). Role of microtubule-dependent membrane trafficking in acrosomal biogenesis. *Cell Tissue Res*, 323(3), 495-503. doi: 10.1007/s00441-005-0097-9
- Hud, N. V., Allen, M. J., Downing, K. H., Lee, J., & Balhorn, R. (1993). Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, 193(3), 1347-1354. doi: 10.1006/bbrc.1993.1773
- Inagaki, M., Irie, K., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., & Takai, Y. (2006). Role of cell adhesion molecule nectin-3 in spermatid development. *Genes Cells*, 11(9), 1125-1132. doi: 10.1111/j.1365-2443.2006.01006.x
- Isermann, P., & Lammerding, J. (2013). Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease. *Curr Biol*, 23(24), R1113-1121. doi: 10.1016/j.cub.2013.11.009
- Ito, C., Yamatoya, K., Yoshida, K., Kyono, K., Yao, R., Noda, T., & Toshimori, K. (2010). Appearance of an oocyte activation-related substance during spermatogenesis in mice and humans. *Hum Reprod*, 25(11), 2734-2744. doi: 10.1093/humrep/deq216
- Ito, M., Shikano, T., Kuroda, K., & Miyazaki, S. (2008). Relationship between nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. *Cell Calcium*, 44(4), 400-410.
- Jahn, D., Schramm, S., Benavente, R., & Alsheimer, M. (2010). Dynamic properties of meiosis-specific lamin C2 and its impact on nuclear envelope integrity. *Nucleus*, 1(3), 273-283. doi: 10.4161/nucl.1.3.11800
- Jiang, X. Z., Yang, M. G., Huang, L. H., Li, C. Q., & Xing, X. W. (2011). SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol*, 30(11), 875-882. doi: 10.1089/dna.2010.1161

- Jodar, M., & Oliva, R. (2014). Protamine alterations in human spermatozoa. *Adv Exp Med Biol*, 791, 83-102. doi: 10.1007/978-1-4614-7783-9\_6
- Johnson, G. D., Lalancette, C., Linnemann, A. K., Leduc, F., Boissonneault, G., & Krawetz, S. A. (2011). The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction*, 141(1), 21-36. doi: 10.1530/REP-10-0322
- Kang-Decker, N., Mantchev, G. T., Juneja, S. C., McNiven, M. A., & van Deursen, J. M. (2001). Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science*, 294(5546), 1531-1533. doi: 10.1126/science.1063665
- Karaca, N., Akpak, Y. K., Oral, S., Durmus, T., & Yilmaz, R. (2015). A successful healthy childbirth in a case of total globozoospermia with oocyte activation by calcium ionophore. *J Reprod Infertil*, 16(2), 116-120.
- Karaca, N., Yilmaz, R., Kanten, G. E., Kervancioglu, E., Solakoglu, S., & Kervancioglu, M. E. (2014). First successful pregnancy in a globozoospermic patient having homozygous mutation in SPATA16. *Fertil Steril*, 102(1), 103-107. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.002
- Kashir, J., Heindryckx, B., Jones, C., De Sutter, P., Parrington, J., & Coward, K. (2010). Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility. *Hum Reprod Update*, 16(6), 690-703. doi: 10.1093/humupd/dmq018
- Kashir, J., Jones, C., & Coward, K. (2012). Calcium oscillations, oocyte activation, and phospholipase C zeta. *Adv Exp Med Biol*, 740, 1095-1121. doi: 10.1007/978-94-007-2888-2\_50
- Kashir, J., Jones, C., Lee, H. C., Rietdorf, K., Nikiforaki, D., Durrans, C., . . . Coward, K. (2011). Loss of activity mutations in phospholipase C zeta (PLCzeta) abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes. *Hum Reprod*, 26(12), 3372-3387. doi: 10.1093/humrep/der336
- Kashir, J., Konstantinidis, M., Jones, C., Lemmon, B., Lee, H. C., Hamer, R., . . . Coward, K. (2012). A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLCzeta) leads to male infertility. *Hum Reprod*, 27(1), 222-231. doi: 10.1093/humrep/der384
- Kashir, J., Nomikos, M., Lai, F. A., & Swann, K. (2014). Sperm-induced Ca<sup>2+</sup> release during egg activation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 450(3), 1204-1211. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.078
- Kasioulis, I., Syred, H. M., Tate, P., Finch, A., Shaw, J., Seawright, A., . . . Yeyati, P. L. (2014). Kdm3a lysine demethylase is an Hsp90 client required for cytoskeletal rearrangements during spermatogenesis. *Mol Biol Cell*, 25(8), 1216-1233. doi: 10.1091/mbc.E13-08-0471
- Kato, A., Nagata, Y., & Todokoro, K. (2004). Delta-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis. *Dev Biol*, 269(1), 196-205. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.01.026
- Ketema, M., & Sonnenberg, A. (2011). Nesprin-3: a versatile connector between the nucleus and the cytoskeleton. *Biochem Soc Trans*, 39(6), 1719-1724. doi: 10.1042/BST20110669
- Ketema, M., Wilhelmsen, K., Kuikman, I., Janssen, H., Hodzic, D., & Sonnenberg, A. (2007). Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J Cell Sci*, 120(Pt 19), 3384-3394. doi: 10.1242/jcs.014191
- Khan, A. U., & Hampsey, M. (2002). Connecting the DOTs: covalent histone modifications and the formation of silent chromatin. *Trends Genet*, 18(8), 387-389.
- Kierszenbaum, A. L. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev*, 58(4), 357-358. doi: 10.1002/1098-2795(20010401)58:4<357::AID-MRD1>3.0.CO;2-T
- Kierszenbaum, A. L. (2002). Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail. *Mol Reprod Dev*, 63(1), 1-4. doi: 10.1002/mrd.10179
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., & Tres, L. L. (2003). Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell*, 14(11), 4628-4640. doi: 10.1091/mbc.E03-04-0226
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., & Tres, L. L. (2007). Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 33-43.

- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., & Tres, L. L. (2008). Expression of Fer testis (FerT) tyrosine kinase transcript variants and distribution sites of FerT during the development of the acrosome-acroplaxome-manchette complex in rat spermatids. *Dev Dyn*, 237(12), 3882-3891. doi: 10.1002/dvdy.21789
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., & Tres, L. L. (2011). Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis*, 1(3), 221-230. doi: 10.4161/spmg.1.3.18018
- Kierszenbaum, A. L., Rivkin, E., Tres, L. L., Yoder, B. K., Haycraft, C. J., Bornens, M., & Rios, R. M. (2011). GMAP210 and IFT88 are present in the spermatid golgi apparatus and participate in the development of the acrosome-acroplaxome complex, head-tail coupling apparatus and tail. *Dev Dyn*, 240(3), 723-736. doi: 10.1002/dvdy.22563
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol*, 67(4), 271-284.
- Kierszenbaum, A. L., Tres, L. L., Rivkin, E., Kang-Decker, N., & van Deursen, J. M. (2004). The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b- containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. *Biol Reprod*, 70(5), 1400-1410. doi: 10.1095/biolreprod.103.025346
- Kilani, Z., Ismail, R., Ghunaim, S., Mohamed, H., Hughes, D., Brewis, I., & Barratt, C. L. (2004). Evaluation and treatment of familial globozoospermia in five brothers. *Fertil Steril*, 82(5), 1436-1439. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.03.064
- Kim, D. I., Birendra, K. C., & Roux, K. J. (2015). Making the LINC: SUN and KASH protein interactions. *Biol Chem*, 396(4), 295-310. doi: 10.1515/hsz-2014-0267
- Kim, J. W., Choi, J. L., Yang, S. H., Yoon, S. H., Jung, J. H., & Lim, J. H. (2012). Live birth after SrCl(2) oocyte activation in previous repeated failed or low fertilization rates after ICSI of frozen-thawed testicular spermatozoa: case report. *J Assist Reprod Genet*, 29(12), 1393-1396. doi: 10.1007/s10815-012-9887-7
- Kitamura, K., Iguchi, N., Kaneko, Y., Tanaka, H., & Nishimune, Y. (2004). Characterization of a novel postacrosomal perinuclear theca-specific protein, CYPT1. *Biol Reprod*, 71(6), 1927-1935. doi: 10.1095/biolreprod.104.032789
- Knott, J. G., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Schultz, R. M., & Williams, C. J. (2005). Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase Czeta in triggering Ca<sup>2+</sup> oscillations during fertilization. *Biol Reprod*, 72(4), 992-996. doi: 10.1095/biolreprod.104.036244
- Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., . . . Durocher, D. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, 318(5856), 1637-1640. doi: 10.1126/science.1150034
- Kolthur-Seetharam, U., Pradeepa, M. M., Gupta, N., Narayanaswamy, R., & Rao, M. R. (2009). Spatiotemporal organization of AT- and GC-rich DNA and their association with transition proteins TP1 and TP2 in rat condensing spermatids. *J Histochem Cytochem*, 57(10), 951-962. doi: 10.1369/jhc.2009.953414
- Koscinski, I., Elinati, E., Fossard, C., Redin, C., Muller, J., Velez de la Calle, J., . . . Viville, S. (2011). DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet*, 88(3), 344-350. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.01.018
- Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T., & Miyazaki, S. (2004). Recombinant phospholipase Czeta has high Ca<sup>2+</sup> sensitivity and induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. *J Biol Chem*, 279(11), 10408-10412. doi: 10.1074/jbc.M313801200
- Kouchi, Z., Shikano, T., Nakamura, Y., Shirakawa, H., Fukami, K., & Miyazaki, S. (2005). The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. *J Biol Chem*, 280(22), 21015-21021. doi: 10.1074/jbc.M412123200
- Kracklauer, M. P., Link, J., & Alsheimer, M. (2013). LINCing the nuclear envelope to gametogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 102, 127-157. doi: 10.1016/B978-0-12-416024-8.00005-2
- Kracklauer, M. P., Wiora, H. M., Deery, W. J., Chen, X., Bolival, B., Jr., Romanowicz, D., . . . Beckingham, K. M. (2010). The Drosophila SUN protein Spag4 cooperates with the coiled-coil

- protein Yuri Gagarin to maintain association of the basal body and spermatid nucleus. *J Cell Sci*, 123(Pt 16), 2763-2772. doi: 10.1242/jcs.066589
- Kremling, H., Luerssen, H., Adham, I. M., Klemm, U., Tsaousidou, S., & Engel, W. (1989). Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals. *Differentiation*, 40(3), 184-190.
- Kuentz, P., Vanden Meerschaut, F., Elinati, E., Nasr-Esfahani, M. H., Gurgan, T., Iqbal, N., . . . Viville, S. (2013). Assisted oocyte activation overcomes fertilization failure in globozoospermic patients regardless of the DPY19L2 status. *Hum Reprod*, 28(4), 1054-1061. doi: 10.1093/humrep/det005
- Kundu, T. K., & Rao, M. R. (1996). Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatid protein TP2. *Biochemistry*, 35(49), 15626-15632. doi: 10.1021/bi961271i
- Kuo, P. L., Chiang, H. S., Wang, Y. Y., Kuo, Y. C., Chen, M. F., Yu, I. S., . . . Lin, Y. H. (2013). SEPT12-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation. *Int J Mol Sci*, 14(11), 22102-22116. doi: 10.3390/ijms141122102
- Lacoste, N., & Cote, J. (2003). [The epigenetic code of histones]. *Med Sci (Paris)*, 19(10), 955-959. doi: 10.1051/medsci/20031910955
- Lahn, B. T., Tang, Z. L., Zhou, J., Barndt, R. J., Parvinen, M., Allis, C. D., & Page, D. C. (2002). Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 8707-8712. doi: 10.1073/pnas.082248899
- Lan, F., Nottke, A. C., & Shi, Y. (2008). Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol*, 20(3), 316-325. doi: 10.1016/j.ceb.2008.03.004
- Larman, M. G., Saunders, C. M., Carroll, J., Lai, F. A., & Swann, K. (2004). Cell cycle-dependent Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci*, 117(Pt 12), 2513-2521. doi: 10.1242/jcs.01109
- Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G. B., & Boissonneault, G. (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod*, 78(2), 324-332. doi: 10.1095/biolreprod.107.064162
- Lee, H. C., Arny, M., Grow, D., Dumesic, D., Fissore, R. A., & Jellerette-Nolan, T. (2014). Protein phospholipase C Zeta1 expression in patients with failed ICSI but with normal sperm parameters. *J Assist Reprod Genet*, 31(6), 749-756. doi: 10.1007/s10815-014-0229-9
- Lee, J. S., Hale, C. M., Panorchan, P., Khatau, S. B., George, J. P., Tseng, Y., . . . Wirtz, D. (2007). Nuclear lamin A/C deficiency induces defects in cell mechanics, polarization, and migration. *Biophys J*, 93(7), 2542-2552. doi: 10.1529/biophysj.106.102426
- Lee, K., Haugen, H. S., Clegg, C. H., & Braun, R. E. (1995). Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26), 12451-12455.
- Lee, N. P., & Cheng, C. Y. (2004). Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development? *Hum Reprod Update*, 10(4), 349-369. doi: 10.1093/humupd/dmh026
- Lei, K., Zhu, X., Xu, R., Shao, C., Xu, T., Zhuang, Y., & Han, M. (2012). Inner nuclear envelope proteins SUN1 and SUN2 play a prominent role in the DNA damage response. *Curr Biol*, 22(17), 1609-1615. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.043
- Lewis, J. D., Abbott, D. W., & Ausio, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol*, 81(3), 131-140. doi: 10.1139/o03-045
- Lewis, S. E., & Aitken, R. J. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, 322(1), 33-41. doi: 10.1007/s00441-005-1097-5
- Li, N., Mruk, D. D., Wong, C. K., Han, D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2015). Formin 1 Regulates Ectoplasmic Specialization in the Rat Testis Through Its Actin Nucleation and Bundling Activity. *Endocrinology*, 156(8), 2969-2983. doi: 10.1210/en.2015-1161

- Li, W., Tang, W., Teves, M. E., Zhang, Z., Zhang, L., Li, H., . . . Zhang, Z. (2015). A MEIG1/PACRG complex in the manchette is essential for building the sperm flagella. *Development*, *142*(5), 921-930. doi: 10.1242/dev.119834
- Lin, F., & Worman, H. J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*, *268*(22), 16321-16326.
- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., & Primakoff, P. (1994). A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol*, *125*(5), 1157-1163.
- Lin, Y. N., Roy, A., Yan, W., Burns, K. H., & Matzuk, M. M. (2007). Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol Cell Biol*, *27*(19), 6794-6805. doi: 10.1128/MCB.01029-07
- Liu, G., Shi, Q. W., & Lu, G. X. (2010). A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl*, *12*(4), 556-560. doi: 10.1038/aja.2010.47
- Liu, J., Nagy, Z., Joris, H., Tournaye, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (1995). Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum Reprod*, *10*(3), 626-629.
- Liu, Q., Pante, N., Misteli, T., Elsagga, M., Crisp, M., Hodzic, D., . . . Roux, K. J. (2007). Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *J Cell Biol*, *178*(5), 785-798. doi: 10.1083/jcb.200704108
- Liu, Y., DeBoer, K., de Kretser, D. M., O'Donnell, L., O'Connor, A. E., Merriner, D. J., . . . O'Bryan, M. K. (2015). LRGUK-1 is required for basal body and manchette function during spermatogenesis and male fertility. *PLoS Genet*, *11*(3), e1005090. doi: 10.1371/journal.pgen.1005090
- Liu, Y., Han, X. J., Liu, M. H., Wang, S. Y., Jia, C. W., Yu, L., . . . Li, W. (2014). Three-day-old human unfertilized oocytes after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection can be activated by calcium ionophore a23187 or strontium chloride and develop to blastocysts. *Cell Rerogram*, *16*(4), 276-280. doi: 10.1089/cell.2013.0081
- Lombardi, M. L., & Lammerding, J. (2011). Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem Soc Trans*, *39*(6), 1729-1734. doi: 10.1042/BST20110686
- Lu, L. Y., Wu, J., Ye, L., Gavriline, G. B., Saunders, T. L., & Yu, X. (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*, *18*(3), 371-384. doi: 10.1016/j.devcel.2010.01.010
- Ma, T., Keller, J. A., & Yu, X. (2011). RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *43*(5), 339-345. doi: 10.1093/abbs/gmr016
- Maeno, H., Sugimoto, K., & Nakajima, N. (1995). Genomic structure of the mouse gene (*Lmnb1*) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*, *30*(2), 342-346. doi: 10.1006/geno.1995.9868
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, *131*(5), 887-900. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.040
- Malcuit, C., Kurokawa, M., & Fissore, R. A. (2006). Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol*, *206*(3), 565-573. doi: 10.1002/jcp.20471
- Malik, H. S., & Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat Struct Biol*, *10*(11), 882-891. doi: 10.1038/nsb996
- Manandhar, G., & Toshimori, K. (2003). Fate of postacrosomal perinuclear theca recognized by monoclonal antibody MN13 after sperm head microinjection and its role in oocyte activation in mice. *Biol Reprod*, *68*(2), 655-663.
- Mao, H. T., & Yang, W. X. (2013). Modes of acrosin functioning during fertilization. *Gene*, *526*(2), 75-79. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.058
- Marcon, L., & Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod*, *70*(4), 910-918. doi: 10.1095/biolreprod.103.022541



- Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., . . . Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(8), 2808-2813. doi: 10.1073/pnas.0406060102
- Martin-Coello, J., Gomendio, M., & Roldan, E. R. (2011). Protamine 3 shows evidence of weak, positive selection in mouse species (genus *Mus*)--but it is not a protamine. *Biol Reprod*, *84*(2), 320-326. doi: 10.1095/biolreprod.110.086454
- Martins, R. P., Finan, J. D., Guilak, F., & Lee, D. A. (2012). Mechanical regulation of nuclear structure and function. *Annu Rev Biomed Eng*, *14*, 431-455. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124638
- Martins, R. P., & Krawetz, S. A. (2007). Nuclear organization of the protamine locus. *Soc Reprod Fertil Suppl*, *64*, 1-12.
- Mattout, A., Goldberg, M., Tzur, Y., Margalit, A., & Gruenbaum, Y. (2007). Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci*, *120*(Pt 1), 77-85. doi: 10.1242/jcs.03325
- McGee, M. D., Rillo, R., Anderson, A. S., & Starr, D. A. (2006). UNC-83 IS a KASH protein required for nuclear migration and is recruited to the outer nuclear membrane by a physical interaction with the SUN protein UNC-84. *Mol Biol Cell*, *17*(4), 1790-1801. doi: 10.1091/mbc.E05-09-0894
- Meetei, A. R., Ullas, K. S., Vasupradha, V., & Rao, M. R. (2002). Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatid protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry*, *41*(1), 185-195.
- Mehlmann, L. M., Carpenter, G., Rhee, S. G., & Jaffe, L. A. (1998). SH2 domain-mediated activation of phospholipase Cgamma is not required to initiate Ca<sup>2+</sup> release at fertilization of mouse eggs. *Dev Biol*, *203*(1), 221-232. doi: 10.1006/dbio.1998.9051
- Mehlmann, L. M., Chattopadhyay, A., Carpenter, G., & Jaffe, L. A. (2001). Evidence that phospholipase C from the sperm is not responsible for initiating Ca<sup>2+</sup> release at fertilization in mouse eggs. *Dev Biol*, *236*(2), 492-501. doi: 10.1006/dbio.2001.0329
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R., & Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*, *111*(8), 483-488. doi: 10.1007/s00412-002-0227-z
- Meistrich, M. L., Trostle-Weige, P. K., Lin, R., Bhatnagar, Y. M., & Allis, C. D. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol Reprod Dev*, *31*(3), 170-181. doi: 10.1002/mrd.1080310303
- Meistrich, M. L., Trostle-Weige, P. K., & Russell, L. D. (1990). Abnormal manchette development in spermatids of *azh/azh* mutant mice. *Am J Anat*, *188*(1), 74-86. doi: 10.1002/aja.1001880109
- Mendoza-Lujambio, I., Burfeind, P., Dixkens, C., Meinhardt, A., Hoyer-Fender, S., Engel, W., & Neesen, J. (2002). The Hook1 gene is non-functional in the abnormal spermatozoon head shape (*azh*) mutant mouse. *Hum Mol Genet*, *11*(14), 1647-1658.
- Meyer-Ficca, M. L., Ihara, M., Lonchar, J. D., Meistrich, M. L., Austin, C. A., Min, W., . . . Meyer, R. G. (2011). Poly(ADP-ribose) metabolism is essential for proper nucleoprotein exchange during mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*, *84*(2), 218-228. doi: 10.1095/biolreprod.110.087361
- Meyer-Ficca, M. L., Lonchar, J., Credidio, C., Ihara, M., Li, Y., Wang, Z. Q., & Meyer, R. G. (2009). Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol Reprod*, *81*(1), 46-55. doi: 10.1095/biolreprod.108.075390
- Meyer-Ficca, M. L., Lonchar, J. D., Ihara, M., Meistrich, M. L., Austin, C. A., & Meyer, R. G. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*, *84*(5), 900-909. doi: 10.1095/biolreprod.110.090035
- Meyer-Ficca, M. L., Meyer, R. G., Jacobson, E. L., & Jacobson, M. K. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol*, *37*(5), 920-926. doi: 10.1016/j.biocel.2004.09.011

- Meyer-Ficca, M. L., Scherthan, H., Burkle, A., & Meyer, R. G. (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma*, *114*(1), 67-74. doi: 10.1007/s00412-005-0344-6
- Mika, S., & Rost, B. (2005). NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Res*, *33*(Database issue), D160-163. doi: 10.1093/nar/gki132
- Miller, T., Krogan, N. J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., . . . Shilatifard, A. (2001). COMPASS: a complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(23), 12902-12907. doi: 10.1073/pnas.231473398
- Miyagawa, Y., Nishimura, H., Tsujimura, A., Matsuoka, Y., Matsumiya, K., Okuyama, A., . . . Tanaka, H. (2005). Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl*, *26*(6), 779-786. doi: 10.2164/jandrol.05069
- Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., & Mikoshiba, K. (1992). Block of Ca<sup>2+</sup> wave and Ca<sup>2+</sup> oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, *257*(5067), 251-255.
- Miyazaki, T., Mori, M., Yoshida, C. A., Ito, C., Yamatoya, K., Moriishi, T., . . . Komori, T. (2013). Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem Cell Biol*, *139*(2), 339-354. doi: 10.1007/s00418-012-1031-3
- Mochida, K., Rivkin, E., Gil, M., & Kierszenbaum, A. L. (2000). Keratin 9 is a component of the perinuclear ring of the manchette of rat spermatids. *Dev Biol*, *227*(2), 510-519. doi: 10.1006/dbio.2000.9911
- Mochida, K., Tres, L. L., & Kierszenbaum, A. L. (1998). Isolation of the rat spermatid manchette and its perinuclear ring. *Dev Biol*, *200*(1), 46-56. doi: 10.1006/dbio.1998.8942
- Mochida, K., Tres, L. L., & Kierszenbaum, A. L. (1999). Structural and biochemical features of fractionated spermatid manchettes and sperm axonemes of the *azh/azh* mutant mouse. *Mol Reprod Dev*, *52*(4), 434-444. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4<434::AID-MRD13>3.0.CO;2-D
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., . . . Khochbin, S. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev*, *27*(15), 1680-1692. doi: 10.1101/gad.220095.113
- Montellier, E., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2012). [Cross-fire over the nucleosome: molecular basis of post-meiotic male haploid genome compaction]. *Med Sci (Paris)*, *28*(5), 485-489. doi: 10.1051/medsci/2012285012
- Montellier, E., Rousseaux, S., Zhao, Y., & Khochbin, S. (2012). Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: post-meiotic male-specific gene expression. *Bioessays*, *34*(3), 187-193. doi: 10.1002/bies.201100141
- Moreno, R. D., Palomino, J., & Schatten, G. (2006). Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. *Dev Biol*, *293*(1), 218-227. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.02.001
- Morimoto, A., Shibuya, H., Zhu, X., Kim, J., Ishiguro, K., Han, M., & Watanabe, Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol*, *198*(2), 165-172. doi: 10.1083/jcb.201204085
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A. L., . . . Petosa, C. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature*, *461*(7264), 664-668. doi: 10.1038/nature08397
- Mountjoy, J. R., Xu, W., McLeod, D., Hyndman, D., & Oko, R. (2008). RAB2A: a major subacrosomal protein of bovine spermatozoa implicated in acrosomal biogenesis. *Biol Reprod*, *79*(2), 223-232. doi: 10.1095/biolreprod.107.065060
- Mueller, S., Rosenquist, T. A., Takai, Y., Bronson, R. A., & Wimmer, E. (2003). Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration. *Biol Reprod*, *69*(4), 1330-1340. doi: 10.1095/biolreprod.102.014670

- Mulugeta Achame, E., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J. W., Sleddens-Linkels, E., Ooms, M., Sun, Z. W., . . . Baarends, W. M. (2010). The ubiquitin-conjugating enzyme HR6B is required for maintenance of X chromosome silencing in mouse spermatocytes and spermatids. *BMC Genomics*, *11*, 367. doi: 10.1186/1471-2164-11-367
- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*, *5*(12), 2375-2390. doi: 10.1002/pro.5560051201
- Nasr-Esfahani, M. H., Deemeh, M. R., & Tavalae, M. (2010). Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, *94*(2), 520-526. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.03.061
- Nelson, J. E., & Krawetz, S. A. (1994). Characterization of a human locus in transition. *J Biol Chem*, *269*(49), 31067-31073.
- Noblanc, A., Damon-Soubeyrand, C., Karrich, B., Henry-Berger, J., Cadet, R., Saez, F., . . . Kocer, A. (2013). DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med*, *65*, 719-723. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.044
- Noblanc, A., Kocer, A., & Drevet, J. R. (2012). [Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis]. *Med Sci (Paris)*, *28*(5), 519-525. doi: 10.1051/medsci/2012285017
- Nomikos, M., Blayney, L. M., Larman, M. G., Campbell, K., Rossbach, A., Saunders, C. M., . . . Lai, F. A. (2005). Role of phospholipase C-zeta domains in Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations. *J Biol Chem*, *280*(35), 31011-31018. doi: 10.1074/jbc.M500629200
- Nomikos, M., Elgmati, K., Theodoridou, M., Calver, B. L., Cumbes, B., Nounesis, G., . . . Lai, F. A. (2011). Male infertility-linked point mutation disrupts the Ca<sup>2+</sup> oscillation-inducing and PIP(2) hydrolysis activity of sperm PLCzeta. *Biochem J*, *434*(2), 211-217. doi: 10.1042/BJ20101772
- Nomikos, M., Elgmati, K., Theodoridou, M., Calver, B. L., Nounesis, G., Swann, K., & Lai, F. A. (2011). Phospholipase Czeta binding to PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> requires the XY-linker region. *J Cell Sci*, *124*(Pt 15), 2582-2590. doi: 10.1242/jcs.083485
- Nomikos, M., Kashir, J., Swann, K., & Lai, F. A. (2013). Sperm PLCzeta: from structure to Ca<sup>2+</sup> oscillations, egg activation and therapeutic potential. *FEBS Lett*, *587*(22), 3609-3616. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.008
- Nomikos, M., Mulgrew-Nesbitt, A., Pallavi, P., Mihalyne, G., Zaitseva, I., Swann, K., . . . McLaughlin, S. (2007). Binding of phosphoinositide-specific phospholipase C-zeta (PLC-zeta) to phospholipid membranes: potential role of an unstructured cluster of basic residues. *J Biol Chem*, *282*(22), 16644-16653. doi: 10.1074/jbc.M701072200
- Nomikos, M., Swann, K., & Lai, F. A. (2012). Starting a new life: sperm PLC-zeta mobilizes the Ca<sup>2+</sup> signal that induces egg activation and embryo development: an essential phospholipase C with implications for male infertility. *Bioessays*, *34*(2), 126-134. doi: 10.1002/bies.201100127
- O'Donnell, L., Nicholls, P. K., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., & Stanton, P. G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*, *1*(1), 14-35. doi: 10.4161/spmg.1.1.14525
- O'Donnell, L., & O'Bryan, M. K. (2014). Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, *30*, 45-54. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.01.003
- Ocampo, J., Mondragon, R., Roa-Espitia, A. L., Chiquete-Felix, N., Salgado, Z. O., & Mujica, A. (2005). Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue Cell*, *37*(4), 293-308. doi: 10.1016/j.tice.2005.03.003
- Oki, M., Aihara, H., & Ito, T. (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem*, *41*, 319-336.
- Oko, R., & Sutovsky, P. (2009). Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol*, *83*(1-2), 2-7. doi: 10.1016/j.jri.2009.05.008
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, *12*(4), 417-435. doi: 10.1093/humupd/dml009

- Oliva, R., & Dixon, G. H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 40, 25-94.
- Ooga, M., Suzuki, M. G., & Aoki, F. (2015). Involvement of histone H2B monoubiquitination in the regulation of mouse preimplantation development. *J Reprod Dev*, 61(3), 179-184. doi: 10.1262/jrd.2014-137
- Ooi, S. L., & Henikoff, S. (2007). Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr Opin Cell Biol*, 19(3), 257-265. doi: 10.1016/j.ceb.2007.04.015
- Ozil, J. P., Banrezes, B., Toth, S., Pan, H., & Schultz, R. M. (2006). Ca<sup>2+</sup> oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol*, 300(2), 534-544. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.041
- Padmakumar, V. C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A. A., . . . Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*, 118(Pt 15), 3419-3430. doi: 10.1242/jcs.02471
- Paiardi, C., Pasini, M. E., Gioria, M., & Berruti, G. (2011). Failure of acrosome formation and globozoospermia in the wobbler mouse, a Vps54 spontaneous recessive mutant. *Spermatogenesis*, 1(1), 52-62. doi: 10.4161/spmg.1.1.14698
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810), 17-18.
- Papoutsopoulou, S., Nikolakaki, E., Chalepakis, G., Kruft, V., Chevaillier, P., & Giannakouros, T. (1999). SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res*, 27(14), 2972-2980.
- Parrington, J., Jones, M. L., Tunwell, R., Devader, C., Katan, M., & Swann, K. (2002). Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca<sup>2+</sup> release in eggs. *Reproduction*, 123(1), 31-39.
- Pascal, J. M., & Ellenberger, T. (2015). The rise and fall of poly(ADP-ribose): An enzymatic perspective. *DNA Repair (Amst)*, 32, 10-16. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.04.008
- Perrin, A., Coat, C., Nguyen, M. H., Talagas, M., Morel, F., Amice, J., & De Braekeleer, M. (2013). Molecular cytogenetic and genetic aspects of globozoospermia: a review. *Andrologia*, 45(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1439-0272.2012.01308.x
- Peterson, C. L., & Laniel, M. A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol*, 14(14), R546-551. doi: 10.1016/j.cub.2004.07.007
- Pierre, V., Martinez, G., Coutton, C., Delaroche, J., Yassine, S., Novella, C., . . . Arnoult, C. (2012). Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development*, 139(16), 2955-2965. doi: 10.1242/dev.077982
- Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A., & Maenpaa, P. H. (1994). Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. *Biol Reprod*, 50(5), 981-986.
- Pirhonen, A., Valtonen, P., Linnala-Kankkunen, A., & Maenpaa, P. H. (1993). In vitro phosphorylation sites of stallion and bull P1-protamines for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase and protein kinase C. *Biol Reprod*, 48(4), 821-827.
- Pittoggi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrossi, F., Giordano, R., . . . Spadafora, C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci*, 112 ( Pt 20), 3537-3548.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol*, 23(15), 5354-5365.
- Pons, D., de Vries, F. R., van den Elsen, P. J., Heijmans, B. T., Quax, P. H., & Jukema, J. W. (2009). Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 30(3), 266-277. doi: 10.1093/eurheartj/ehn603
- Pouton, C. W., Wagstaff, K. M., Roth, D. M., Moseley, G. W., & Jans, D. A. (2007). Targeted delivery to the nucleus. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(8), 698-717. doi: 10.1016/j.addr.2007.06.010

- Pradeepa, M. M., & Rao, M. R. (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 63, 1-10.
- Puglisi, R., Maccari, I., Pipolo, S., Conrad, M., Mangia, F., & Boitani, C. (2012). The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *J Cell Physiol*, 227(4), 1420-1427. doi: 10.1002/jcp.22857
- Puglisi, R., Maccari, I., Pipolo, S., Mangia, F., & Boitani, C. (2014). The nuclear form of glutathione peroxidase 4 colocalizes and directly interacts with protamines in the nuclear matrix during mouse sperm chromatin assembly. *Spermatogenesis*, 4, e28460. doi: 10.4161/spmg.28460
- Qi, Y., Jiang, M., Yuan, Y., Bi, Y., Zheng, B., Guo, X., . . . Sha, J. (2013). ADP-ribosylation factor-like 3, a manchette-associated protein, is essential for mouse spermiogenesis. *Mol Hum Reprod*, 19(5), 327-335. doi: 10.1093/molehr/gat001
- Qian, M. X., Pang, Y., Liu, C. H., Haratake, K., Du, B. Y., Ji, D. Y., . . . Qiu, X. B. (2013). Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair and spermatogenesis. *Cell*, 153(5), 1012-1024. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.032
- Quenet, D., El Ramy, R., Schreiber, V., & Dantzer, F. (2009). The role of poly(ADP-ribosylation) in epigenetic events. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(1), 60-65. doi: 10.1016/j.biocel.2008.07.023
- Quimby, B. B., & Corbett, A. H. (2001). Nuclear transport mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, 58(12-13), 1766-1773.
- Ramadan, W. M., Kashir, J., Jones, C., & Coward, K. (2012). Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLCzeta): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun Signal*, 10(1), 12. doi: 10.1186/1478-811X-10-12
- Ramalho-Santos, J., Moreno, R. D., Wessel, G. M., Chan, E. K., & Schatten, G. (2001). Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. *Exp Cell Res*, 267(1), 45-60. doi: 10.1006/excr.2000.5119
- Ramalho-Santos, J., Schatten, G., & Moreno, R. D. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, 67(4), 1043-1051.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1839(3), 155-168. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.08.004
- Razafsky, D., & Hodzic, D. (2009). Bringing KASH under the SUN: the many faces of nucleocytoskeletal connections. *J Cell Biol*, 186(4), 461-472. doi: 10.1083/jcb.200906068
- Richburg, J. H., Myers, J. L., & Bratton, S. B. (2014). The role of E3 ligases in the ubiquitin-dependent regulation of spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 30, 27-35. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.03.001
- Roest, H. P., van Klaveren, J., de Wit, J., van Gurp, C. G., Koken, M. H., Vermey, M., . . . Hoeijmakers, J. H. (1996). Inactivation of the HR23B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell*, 86(5), 799-810.
- Roth, S. Y., Denu, J. M., & Allis, C. D. (2001). Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 70, 81-120. doi: 10.1146/annurev.biochem.70.1.81
- Rothballer, A., & Kutay, U. (2013). The diverse functional LINC of the nuclear envelope to the cytoskeleton and chromatin. *Chromosoma*, 122(5), 415-429. doi: 10.1007/s00412-013-0417-x
- Rouleau, M., Aubin, R. A., & Poirier, G. G. (2004). Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci*, 117(Pt 6), 815-825. doi: 10.1242/jcs.01080
- Rousseaux, S., Caron, C., Govin, J., Lestrat, C., Faure, A. K., & Khochbin, S. (2005). Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*, 345(2), 139-153. doi: 10.1016/j.gene.2004.12.004
- Rousseaux, S., Faure, A. K., Caron, C., Lestrat, C., Govin, J., Hennebicq, S., . . . Khochbin, S. (2004). [Organizing the sperm nucleus]. *Gynecol Obstet Fertil*, 32(9), 785-791. doi: 10.1016/j.gyobfe.2004.07.003

- Rousseaux, S., Faure, A. K., Thevenon, J., Escoffier, E., Lestrat, C., Govin, J., . . . Khochbin, S. (2006). [Epigenetics of the sperm cell]. *Gynecol Obstet Fertil*, 34(9), 831-835. doi: 10.1016/j.gyobfe.2006.07.012
- Rousseaux, S., Gaucher, J., Thevenon, J., Caron, C., Vitte, A. L., Curtet, S., . . . Khochbin, S. (2009). [Spermiogenesis: histone acetylation triggers male genome reprogramming]. *Gynecol Obstet Fertil*, 37(6), 519-522. doi: 10.1016/j.gyobfe.2009.04.003
- Rousseaux, S., Petosa, C., Muller, C. W., & Khochbin, S. (2010). [A novel key element in post-meiotic male genome reprogramming]. *Med Sci (Paris)*, 26(2), 130-132. doi: 10.1051/medsci/2010262130
- Rousseaux, S., Reynoird, N., Escoffier, E., Thevenon, J., Caron, C., & Khochbin, S. (2008). Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online*, 16(4), 492-503.
- Roux, C., Berdin, A., & Amiot, C. (2014). [Medically assisted procreation. Main biological, medical and ethical aspects ]. *Rev Prat*, 64(10), 1435-1444.
- Roux, K. J., & Burke, B. (2007). Nuclear envelope defects in muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, 1772(2), 118-127. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.06.001
- Roux, K. J., Crisp, M. L., Liu, Q., Kim, D., Kozlov, S., Stewart, C. L., & Burke, B. (2009). Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2194-2199. doi: 10.1073/pnas.0808602106
- Rybouchkin, A. V., Van der Straeten, F., Quatacker, J., De Sutter, P., & Dhont, M. (1997). Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. *Fertil Steril*, 68(6), 1144-1147.
- Sabari, B. R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H. E., . . . Allis, C. D. (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Mol Cell*, 58(2), 203-215. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.029
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., . . . Lai, F. A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15), 3533-3544.
- Schirmer, E. C., & Foisner, R. (2007). Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res*, 313(10), 2167-2179. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.03.012
- Schluter, G., Celik, A., Obata, R., Schlicker, M., Hofferbert, S., Schlung, A., . . . Engel, W. (1996). Sequence analysis of the conserved protamine gene cluster shows that it contains a fourth expressed gene. *Mol Reprod Dev*, 43(1), 1-6. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199601)43:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-W
- Schutz, W., Alsheimer, M., Ollinger, R., & Benavente, R. (2005). Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp Cell Res*, 307(2), 285-291. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.03.023
- Schutz, W., Benavente, R., & Alsheimer, M. (2005). Dynamic properties of germ line-specific lamin B3: the role of the shortened rod domain. *Eur J Cell Biol*, 84(7), 649-662. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.03.001
- Sermondade, N., Hafhouf, E., Dupont, C., Bechoua, S., Palacios, C., Eustache, F., . . . Sifer, C. (2011). Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Hum Reprod*, 26(11), 2944-2949. doi: 10.1093/humrep/der258
- Shaman, J. A., Yamauchi, Y., & Ward, W. S. (2007a). Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl*, 53(3), 135-140. doi: 10.1080/01485010701329378
- Shaman, J. A., Yamauchi, Y., & Ward, W. S. (2007b). Sperm DNA fragmentation: awakening the sleeping genome. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 3), 626-628. doi: 10.1042/BST0350626
- Shaman, J. A., Yamauchi, Y., & Ward, W. S. (2007c). The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem*, 102(3), 680-688. doi: 10.1002/jcb.21321

- Shang, E., Nickerson, H. D., Wen, D., Wang, X., & Wolgemuth, D. J. (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*(19), 3507-3515. doi: 10.1242/dev.004481
- Shao, X., Tarnasky, H. A., Lee, J. P., Oko, R., & van der Hoorn, F. A. (1999). Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev Biol*, *211*(1), 109-123. doi: 10.1006/dbio.1999.9297
- Sharma, R. K., Said, T., & Agarwal, A. (2004). Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*, *6*(2), 139-148.
- Sheng, K., Liang, X., Huang, S., & Xu, W. (2014). The role of histone ubiquitination during spermatogenesis. *Biomed Res Int*, *2014*, 870695. doi: 10.1155/2014/870695
- Shinagawa, T., Huynh, L. M., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Kwak, H. G., . . . Ishii, S. (2015). Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development*, *142*(7), 1287-1292. doi: 10.1242/dev.121830
- Singh, G. (1992). Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int J Fertil*, *37*(2), 99-102.
- Sone, Y., Ito, M., Shirakawa, H., Shikano, T., Takeuchi, H., Kinoshita, K., & Miyazaki, S. (2005). Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun*, *330*(3), 690-694. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.032
- Sosa, B. A., Kutay, U., & Schwartz, T. U. (2013). Structural insights into LINC complexes. *Curr Opin Struct Biol*, *23*(2), 285-291. doi: 10.1016/j.sbi.2013.03.005
- Sosa, B. A., Rothballer, A., Kutay, U., & Schwartz, T. U. (2012). LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell*, *149*(5), 1035-1047. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.046
- Sotolongo, B., Huang, T. T., Isenberger, E., & Ward, W. S. (2005). An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl*, *26*(2), 272-280.
- Sotolongo, B., Lino, E., & Ward, W. S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod*, *69*(6), 2029-2035. doi: 10.1095/biolreprod.103.020594
- Spano, M., Seli, E., Bizzaro, D., Manicardi, G. C., & Sakkas, D. (2005). The significance of sperm nuclear DNA strand breaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol*, *17*(3), 255-260.
- Starr, D. A. (2011). KASH and SUN proteins. *Curr Biol*, *21*(11), R414-415. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.022
- Starr, D. A. (2012). Laminopathies: too much SUN is a bad thing. *Curr Biol*, *22*(17), R678-680. doi: 10.1016/j.cub.2012.06.070
- Starr, D. A., & Fridolfsson, H. N. (2010). Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *26*, 421-444. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104037
- Starr, D. A., & Han, M. (2002). Role of ANC-1 in tethering nuclei to the actin cytoskeleton. *Science*, *298*(5592), 406-409. doi: 10.1126/science.1075119
- Stewart-Hutchinson, P. J., Hale, C. M., Wirtz, D., & Hodzic, D. (2008). Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res*, *314*(8), 1892-1905. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.02.022
- Stewart, C. L., Roux, K. J., & Burke, B. (2007). Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science*, *318*(5855), 1408-1412. doi: 10.1126/science.1142034
- Stone, S., O'Mahony, F., Khalaf, Y., Taylor, A., & Braude, P. (2000). A normal livebirth after intracytoplasmic sperm injection for globozoospermia without assisted oocyte activation: case report. *Hum Reprod*, *15*(1), 139-141.
- Suh, P. G., Park, J. I., Manzoli, L., Cocco, L., Peak, J. C., Katan, M., . . . Ryu, S. H. (2008). Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*, *41*(6), 415-434.

- Sun, X., Kovacs, T., Hu, Y. J., & Yang, W. X. (2011). The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep*, *38*(6), 3993-4001. doi: 10.1007/s11033-010-0517-0
- Sun, Z. W., & Allis, C. D. (2002). Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, *418*(6893), 104-108. doi: 10.1038/nature00883
- Sung, M. T., & Dixon, G. H. (1970). Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *67*(3), 1616-1623.
- Suzuki-Toyota, F., Ito, C., Toyama, Y., Maekawa, M., Yao, R., Noda, T., & Toshimori, K. (2004). The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice. *Arch Histol Cytol*, *67*(4), 361-371.
- Swann, K. (1990). A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, *110*(4), 1295-1302.
- Swann, K. (1994). Ca<sup>2+</sup> oscillations and sensitization of Ca<sup>2+</sup> release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium*, *15*(4), 331-339.
- Swann, K. (1996). Soluble sperm factors and Ca<sup>2+</sup> release in eggs at fertilization. *Rev Reprod*, *1*(1), 33-39.
- Swann, K., & Lai, F. A. (2013). PLCzeta and the initiation of Ca(2+) oscillations in fertilizing mammalian eggs. *Cell Calcium*, *53*(1), 55-62. doi: 10.1016/j.ceca.2012.11.001
- Swann, K., Larman, M. G., Saunders, C. M., & Lai, F. A. (2004). The cytosolic sperm factor that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction*, *127*(4), 431-439. doi: 10.1530/rep.1.00169
- Swann, K., Parrington, J., & Jones, K. T. (2001). Potential role of a sperm-derived phospholipase C in triggering the egg-activating Ca<sup>2+</sup> signal at fertilization. *Reproduction*, *122*(6), 839-846.
- Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., & Lai, F. A. (2006). PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol*, *17*(2), 264-273. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.03.009
- Swann, K., & Yu, Y. (2008). The dynamics of calcium oscillations that activate mammalian eggs. *Int J Dev Biol*, *52*(5-6), 585-594. doi: 10.1387/ijdb.072530ks
- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F. R., & Gasser, S. M. (2004). The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet*, *38*, 305-345. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.142705
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J. S., Montellier, E., . . . Zhao, Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, *146*(6), 1016-1028. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.008
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., . . . Nishimune, Y. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*, *25*(16), 7107-7119. doi: 10.1128/MCB.25.16.7107-7119.2005
- Tapley, E. C., Ly, N., & Starr, D. A. (2011). Multiple mechanisms actively target the SUN protein UNC-84 to the inner nuclear membrane. *Mol Biol Cell*, *22*(10), 1739-1752. doi: 10.1091/mbc.E10-08-0733
- Tapley, E. C., & Starr, D. A. (2013). Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*, *25*(1), 57-62. doi: 10.1016/j.ceb.2012.10.014
- Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C., & Borini, A. (2007). Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, *14*(6), 746-757.
- Taylor, S. L., Yoon, S. Y., Morshedi, M. S., Lacey, D. R., Jellerette, T., Fissore, R. A., & Oehninger, S. (2010). Complete globozoospermia associated with PLCzeta deficiency treated with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online*, *20*(4), 559-564. doi: 10.1016/j.rbmo.2009.12.024
- Tejera, A., Molla, M., Muriel, L., Remohi, J., Pellicer, A., & De Pablo, J. L. (2008). Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertil Steril*, *90*(4), 1202 e1201-1205. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.056



- Tesarik, J. (1998). Oocyte activation after intracytoplasmic injection of mature and immature sperm cells. *Hum Reprod*, *13 Suppl 1*, 117-127.
- Tesarik, J., Sousa, M., & Testart, J. (1994). Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, *9*(3), 511-518.
- Theodoridou, M., Nomikos, M., Parthimos, D., Gonzalez-Garcia, J. R., Elgmati, K., Calver, B. L., . . . Lai, F. A. (2013). Chimeras of sperm PLCzeta reveal disparate protein domain functions in the generation of intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in mammalian eggs at fertilization. *Mol Hum Reprod*, *19*(12), 852-864. doi: 10.1093/molehr/gat070
- Tian, X., & Fang, J. (2007). Current perspectives on histone demethylases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *39*(2), 81-88.
- Toshimori, K., & Ito, C. (2003). Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol*, *66*(5), 383-396.
- Toth, S., Huneau, D., Banrezes, B., & Ozil, J. P. (2006). Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction*, *131*(1), 27-34. doi: 10.1530/rep.1.00764
- Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Maekawa, M., Ito, C., & Toshimori, K. (2008). Disruption of ectoplasmic specializations between Sertoli cells and maturing spermatids by anti-nectin-2 and anti-nectin-3 antibodies. *Asian J Androl*, *10*(4), 577-584. doi: 10.1111/j.1745-7262.2008.00357.x
- Tulsiani, D. R., Abou-Haila, A., Loeser, C. R., & Pereira, B. M. (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res*, *240*(2), 151-164. doi: 10.1006/excr.1998.3943
- Turner, J. M. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*, *134*(10), 1823-1831. doi: 10.1242/dev.000018
- Turner, J. M., Mahadevaiah, S. K., Elliott, D. J., Garchon, H. J., Pehrson, J. R., Jaenisch, R., & Burgoyne, P. S. (2002). Meiotic sex chromosome inactivation in male mice with targeted disruptions of Xist. *J Cell Sci*, *115*(Pt 21), 4097-4105.
- Tzur, Y. B., Wilson, K. L., & Gruenbaum, Y. (2006). SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(10), 782-788. doi: 10.1038/nrm2003
- Ullas, K. S., & Rao, M. R. (2003). Phosphorylation of rat spermatidal protein TP2 by sperm-specific protein kinase A and modulation of its transport into the haploid nucleus. *J Biol Chem*, *278*(52), 52673-52680. doi: 10.1074/jbc.M308365200
- van der Heijden, G. W., Derijck, A. A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., & de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev Biol*, *298*(2), 458-469. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.06.051
- van der Heijden, G. W., Ramos, L., Baart, E. B., van den Berg, I. M., Derijck, A. A., van der Vlag, J., . . . de Boer, P. (2008). Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol*, *8*, 34. doi: 10.1186/1471-213X-8-34
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., De Roo, C., Lierman, S., Qian, C., Schmitt-John, T., . . . Heindryckx, B. (2013). Comparison of pre- and post-implantation development following the application of three artificial activating stimuli in a mouse model with round-headed sperm cells deficient for oocyte activation. *Hum Reprod*, *28*(5), 1190-1198. doi: 10.1093/humrep/det038
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., Heindryckx, B., & De Sutter, P. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. *Reprod Biomed Online*, *28*(5), 560-571. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.01.008
- Verdel, A., & Khochbin, S. (1999). Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem*, *274*(4), 2440-2445.
- Verstraeten, V. L., Broers, J. L., Ramaekers, F. C., & van Steensel, M. A. (2007). The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Curr Med Chem*, *14*(11), 1231-1248.

- Vicari, E., Perdichizzi, A., De Palma, A., Burrello, N., D'Agata, R., & Calogero, A. E. (2002). Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod*, *17*(8), 2128-2133.
- Vilfan, I. D., Conwell, C. C., & Hud, N. V. (2004). Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem*, *279*(19), 20088-20095. doi: 10.1074/jbc.M312777200
- Vlcek, S., & Foisner, R. (2007). A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta*, *1773*(5), 661-674. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.07.002
- Wakai, T., & Fissore, R. A. (2013). Ca(2+) homeostasis and regulation of ER Ca(2+) in mammalian oocytes/eggs. *Cell Calcium*, *53*(1), 63-67. doi: 10.1016/j.ceca.2012.11.010
- Wakai, T., Vanderheyden, V., & Fissore, R. A. (2011). Ca<sup>2+</sup> signaling during mammalian fertilization: requirements, players, and adaptations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(4). doi: 10.1101/cshperspect.a006767
- Wang, J., Teves, M. E., Shen, X., Nagarkatti-Gude, D. R., Hess, R. A., Henderson, S. C., . . . Zhang, Z. (2012). Mouse RC/BTB2, a member of the RCC1 superfamily, localizes to spermatid acrosomal vesicles. *PLoS One*, *7*(6), e39846. doi: 10.1371/journal.pone.0039846
- Wang, X., Lu, G., Li, L., Yi, J., Yan, K., Wang, Y., . . . Shao, G. (2014). HUWE1 interacts with BRCA1 and promotes its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, *444*(4), 549-554. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.075
- Wang, X. X., Sun, B. F., Jiao, J., Chong, Z. C., Chen, Y. S., Wang, X. L., . . . Li, D. (2015). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine modification pattern is a novel epigenetic feature of globozoospermia. *Oncotarget*, *6*(9), 6535-6543.
- Ward, M. A., & Ward, W. S. (2004). A model for the function of sperm DNA degradation. *Reprod Fertil Dev*, *16*(5), 547-554. doi: 10.10371/RD03072
- Ward, W. S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*, *16*(1), 30-36. doi: 10.1093/molehr/gap080
- Ward, W. S. (2011). Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod*, *84*(5), 841-843. doi: 10.1095/biolreprod.111.090951
- Ward, W. S., & Coffey, D. S. (1989). Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol Reprod*, *41*(2), 361-370.
- Ward, W. S., & Coffey, D. S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, *44*(4), 569-574.
- Ward, W. S., Kimura, Y., & Yanagimachi, R. (1999). An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. *Biol Reprod*, *60*(3), 702-706.
- Watanabe, K., Takebayashi, H., Bepari, A. K., Esumi, S., Yanagawa, Y., & Tamamaki, N. (2011). Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates the radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development*, *138*(22), 4979-4990. doi: 10.1242/dev.068155
- Weake, V. M., & Workman, J. L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell*, *29*(6), 653-663. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.014
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., . . . Sonnenberg, A. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*, *171*(5), 799-810. doi: 10.1083/jcb.200506083
- Williams, C. J., Mehlmann, L. M., Jaffe, L. A., Kopf, G. S., & Schultz, R. M. (1998). Evidence that Gq family G proteins do not function in mouse egg activation at fertilization. *Dev Biol*, *198*(1), 116-127.
- Wilson, R. H., & Coverley, D. (2013). Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes Cells*, *18*(1), 17-31. doi: 10.1111/gtc.12010
- Worman, H. J., Ostlund, C., & Wang, Y. (2010). Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(2), a000760. doi: 10.1101/cshperspect.a000760

- Wu, A. T., Sutovsky, P., Xu, W., van der Spoel, A. C., Platt, F. M., & Oko, R. (2007). The postacrosomal assembly of sperm head protein, PAWP, is independent of acrosome formation and dependent on microtubular manchette transport. *Dev Biol*, *312*(2), 471-483. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.08.051
- Wu, H., Smyth, J., Luzzi, V., Fukami, K., Takenawa, T., Black, S. L., . . . Fissore, R. A. (2001). Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol Reprod*, *64*(5), 1338-1349.
- Wykes, S. M., & Krawetz, S. A. (2003). Conservation of the PRM1 --> PRM2 --> TNP2 domain. *DNA Seq*, *14*(5), 359-367.
- Xiao, N., Kam, C., Shen, C., Jin, W., Wang, J., Lee, K. M., . . . Xia, J. (2009). PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest*, *119*(4), 802-812. doi: 10.1172/JCI36230
- Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D., & Seldin, D. C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat Genet*, *23*(1), 118-121. doi: 10.1038/12729
- Yamauchi, Y., Shaman, J. A., & Ward, W. S. (2011). Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl*, *13*(1), 31-35. doi: 10.1038/aja.2010.75
- Yan, H. H., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2007). Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis? *Bioessays*, *29*(1), 36-48. doi: 10.1002/bies.20513
- Yan, W. (2009). Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol Cell Endocrinol*, *306*(1-2), 24-32. doi: 10.1016/j.mce.2009.03.003
- Yan, W., Ma, L., Burns, K. H., & Matzuk, M. M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(18), 10546-10551. doi: 10.1073/pnas.1837812100
- Yang, W. X., & Sperry, A. O. (2003). C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod*, *69*(5), 1719-1729. doi: 10.1095/biolreprod.102.014878
- Yao, R., Ito, C., Natsume, Y., Sugitani, Y., Yamanaka, H., Kuretake, S., . . . Noda, T. (2002). Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(17), 11211-11216. doi: 10.1073/pnas.162027899
- Yeh, C. H., Kuo, P. L., Wang, Y. Y., Wu, Y. Y., Chen, M. F., Lin, D. Y., . . . Lin, Y. H. (2015). SEPT12/SPAG4/LAMINB1 complexes are required for maintaining the integrity of the nuclear envelope in postmeiotic male germ cells. *PLoS One*, *10*(3), e0120722. doi: 10.1371/journal.pone.0120722
- Yelick, P. C., Balhorn, R., Johnson, P. A., Corzett, M., Mazrimas, J. A., Kleene, K. C., & Hecht, N. B. (1987). Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol*, *7*(6), 2173-2179.
- Yoneda, A., Kashima, M., Yoshida, S., Terada, K., Nakagawa, S., Sakamoto, A., . . . Watanabe, T. (2006). Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C zeta. *Reproduction*, *132*(3), 393-401. doi: 10.1530/rep.1.01018
- Yoon, H. J., Bae, I. H., Kim, H. J., Jang, J. M., Hur, Y. S., Kim, H. K., . . . Lim, J. H. (2013). Analysis of clinical outcomes with respect to spermatozoan origin after artificial oocyte activation with a calcium ionophore. *J Assist Reprod Genet*, *30*(12), 1569-1575. doi: 10.1007/s10815-013-0110-2
- Yoshida, T., Ioshii, S. O., Imanaka-Yoshida, K., & Izutsu, K. (1994). Association of cytoplasmic dynein with manchette microtubules and spermatid nuclear envelope during spermiogenesis in rats. *J Cell Sci*, *107* ( Pt 3), 625-633.
- Yoshii, T., Kuji, N., Komatsu, S., Iwahashi, K., Tanaka, Y., Yoshida, H., . . . Yoshimura, Y. (2005). Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod*, *11*(9), 677-681. doi: 10.1093/molehr/gah217
- Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L. C., & Parrington, J. (2009). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril*, *91*(5 Suppl), 2230-2242. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.05.021

- Young, S. G., Jung, H. J., Lee, J. M., & Fong, L. G. (2014). Nuclear lamins and neurobiology. *Mol Cell Biol*, *34*(15), 2776-2785. doi: 10.1128/MCB.00486-14
- Yu, J., Starr, D. A., Wu, X., Parkhurst, S. M., Zhuang, Y., Xu, T., . . . Han, M. (2006). The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during *Drosophila* oogenesis. *Dev Biol*, *289*(2), 336-345. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.10.027
- Yu, Y., Nomikos, M., Theodoridou, M., Nounesis, G., Lai, F. A., & Swann, K. (2012). PLCzeta causes Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P<sub>2</sub>. *Mol Biol Cell*, *23*(2), 371-380. doi: 10.1091/mbc.E11-08-0687
- Yu, Y. E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C. R., Deng, J. M., Russell, L. D., . . . Meistrich, M. L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(9), 4683-4688.
- Yudin, A. I., Vandevoort, C. A., Li, M. W., & Overstreet, J. W. (1999). PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol Reprod Dev*, *53*(3), 350-362. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199907)53:3<350::AID-MRD11>3.0.CO;2-9
- Zamudio, N. M., Chong, S., & O'Bryan, M. K. (2008). Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction*, *136*(2), 131-146. doi: 10.1530/REP-07-0576
- Zewe, M., Hoger, T. H., Fink, T., Lichter, P., Krohne, G., & Franke, W. W. (1991). Gene structure and chromosomal localization of the murine lamin B2 gene. *Eur J Cell Biol*, *56*(2), 342-350.
- Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., . . . Shanahan, C. M. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci*, *114*(Pt 24), 4485-4498.
- Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., . . . Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron*, *64*(2), 173-187. doi: 10.1016/j.neuron.2009.08.018
- Zhao, M., Shirley, C. R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., . . . Meistrich, M. L. (2004). Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis*, *38*(4), 200-213. doi: 10.1002/gene.20019
- Zhao, M., Shirley, C. R., Mounsey, S., & Meistrich, M. L. (2004). Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod*, *71*(3), 1016-1025. doi: 10.1095/biolreprod.104.028191
- Zhao, M., Shirley, C. R., Yu, Y. E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., . . . Meistrich, M. L. (2001). Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol*, *21*(21), 7243-7255. doi: 10.1128/MCB.21.21.7243-7255.2001
- Zhen, Y. Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A. A., & Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, *115*(Pt 15), 3207-3222.
- Zhong, Z., Wilson, K. L., & Dahl, K. N. (2010). Beyond lamins other structural components of the nucleoskeleton. *Methods Cell Biol*, *98*, 97-119. doi: 10.1016/S0091-679X(10)98005-9
- Zhou, J., Du, Y. R., Qin, W. H., Hu, Y. G., Huang, Y. N., Bao, L., . . . Xu, G. L. (2009). RIM-BP3 is a manchette-associated protein essential for spermiogenesis. *Development*, *136*(3), 373-382. doi: 10.1242/dev.030858
- Zhou, W., Wang, X., & Rosenfeld, M. G. (2009). Histone H2A ubiquitination in transcriptional regulation and DNA damage repair. *Int J Biochem Cell Biol*, *41*(1), 12-15. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.016
- Zhu, F., Gong, F., Lin, G., & Lu, G. (2013). DPY19L2 gene mutations are a major cause of globozoospermia: identification of three novel point mutations. *Mol Hum Reprod*, *19*(6), 395-404. doi: 10.1093/molehr/gat018