



HAL
open science

Fonctions des thiorédoxines sexuelles et contrôle de l'état rédox des protamines chez la drosophile

Samantha Tirmarche

► **To cite this version:**

Samantha Tirmarche. Fonctions des thiorédoxines sexuelles et contrôle de l'état rédox des protamines chez la drosophile. Biologie de la reproduction. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1079 . tel-01398426

HAL Id: tel-01398426

<https://theses.hal.science/tel-01398426v1>

Submitted on 17 Nov 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.



N° d'ordre NNT : xxx

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie

Soutenue publiquement le 23/06/2016, par :
Samantha Tirmarche

Fonctions des thiorédoxines sexuelles et contrôle de l'état rédox des protamines chez la drosophile

Devant le jury composé de :

VIEIRA Cristina, PR, Université Lyon 1, Lyon

Présidente

KHOCHBIN Saadi, DR, Institut Albert Bonniot, Grenoble

Rapporteur

DOSTATNI Nathalie, PR, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Rapporteuse

DREVET Joël, PR, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Examineur

MOLLEREAU Bertrand, PR, École Normale Supérieure de Lyon, Lyon

Examineur

LOPPIN Benjamin, DR, Université Lyon 1, Lyon

Directeur de thèse

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Études et de la Vie Universitaire

Vice-Président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTÉ

Faculté des Médecine Lyon Est - Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles

Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de recherche en Biologie

Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

École Supérieure de Chimie Physique Électronique

Institut Universitaire de technologie de Lyon 1

École Supérieure de Professorat et de l'Éducation

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOUILLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Sans pile, on perd la face.

PIERRE DESPROGRES

Je voudrais commencer par remercier Benjamin d'avoir accepté d'encadrer cette thèse et de m'avoir offert la possibilité de découvrir ce monde étonnant et si complexe qu'est celui des thiorédoxines.

Je tiens également à remercier tous les membres de mon jury : merci à mes rapporteurs de thèse, Nathalie Dostatni et à Saadi Khochbin pour avoir accepté de juger mon travail. Je remercie tout particulièrement Joël Drevet et Bertrand Mollereau qui ont suivi mon travail à travers les différents comités de thèses mais qui ont aussi accepté d'être les examinateurs de ma thèse. Et merci également à Cristina Vieira d'avoir bien voulu présider ma soutenance.

Merci à Béa pour ces petites discussions sur tout et rien (boulettes des étudiants, couture, ...) qui sont si importantes pour égayer les journées au labo. Quant à toi Raphaëlle, ta bonne humeur, ton côté pétillant ainsi que nos papotages à bâtons rompus pendant le tri de femelles vierges vont vraiment me manquer. Merci également à toi Angelo pour tout ces moments partagés. Tu as su dynamiser cette dernière année de thèse et faire en sorte que ce soit une période agréable, à laquelle je repenserai avec plaisir (contrairement à ce que prétend la légende qui dit que la troisième année, c'est l'enfer).

Je n'oublie pas non plus Laetitia et Laure : votre départ du labo a laissé un grand vide. Merci pour les fous rires au labo et en dehors, ainsi que pour tous ces souvenirs heureux que vous me laissez et qui ne seront sans doute pas les derniers.

Ces trois années m'auront également permis de rencontrer des collègues qui sont devenus des amis. Merci à vous Valé, Elsa, Amélie et Jean-André pour les pauses cafés, les soirées films, les soirées jeux, les soirées "juste parce que j'ai envie de vous voir" plus ou moins improvisées.

Mais je ne serai pas où j'en suis aujourd'hui sans toooouuuus les amis plus anciens qui m'ont toujours soutenus. Sarah, ma chère Sarah ... Je n'ai pas de mots pour te remercier. Sache que tu auras toujours une place à part dans mon cœur et que même si tu pars au bout du monde, tu ne te débarrasseras de moi aussi facilement.

Diane, heureusement que tu étais là pour que je puisse râler, parler pendant 3 heures au téléphone sans voir le temps passer, improviser un pastis gascon qui a mobilisé tout mon salon, organiser une soirée beignets en mémoire de ceux dégustés en Australie, découvrir la joie de plumer du gibier, etc, etc, etc ...

Merci aux "Garibaldiens" présents et anciens pour ces soirées films, ces séjours ski, ces après midi/soirées jeux, ces invitations à manger parce "qu'il a une recette de Pierre Hermé/de Philippe Conticini/au sirop d'érable/Thaï à tester". Merci à vous Mathias, Maxime, Vincent L., François et Fred. Et c'est promis François, ça va être festif.

Merci également à tous les anciens "meubles foyers" qui sont désormais loin de Lyon mais toujours présents : Vincent C., Petit Thomas, Thomas L., Robin, Étienne P., Étienne TKR et Anaël. Je garde un souvenir impérissable de tous ces instants partagés qui, vu de l'extérieur ne paraissent pas extraordinaires, mais m'ont apportés une lumière et une chaleur qui m'ont soutenues tout au long de cette thèse et qui continueront à me porter très longtemps.

Pour terminer, il me faut remercier mon foyer et ma famille. Merci à toi Gwen de m'avoir supportée quand je râlais sur une expérience ratée ou une journée pourrie. Et merci de m'avoir prêté pour M. Chat et ses ronrons !

Merci à David et Jo qui m'ont vue évoluer au cours de toutes ces années et qui ont accepté me soutenir même si je travaille sur des trucs incompréhensibles. Quant à toi maman, merci pour tous tes efforts qui m'ont permis d'aboutir à l'ENS et de réaliser mon objectif : faire de la recherche. Je ne serai pas là sans toi. Et, t'as vu ? Ca y est, je soutiens ma thèse !

Enfin, merci toi Simon pour ta présence, ton soutien et ton amour. Pour citer Jean Ferrat : "Que serais-je sans toi ? "

*The most exciting phrase to hear in science,
the one that heralds new discoveries, is not
"Eureka" but "That's funny..."*

ISAAC ASIMOV

Résumé

Le spermatozoïde des animaux à reproduction sexuée est une cellule extrêmement spécialisée, dont la chromatine très particulière est le siège de nombreux remodelages tant lors de la gamétogenèse que lors de la fécondation. Chez *Drosophila melanogaster* comme chez les mammifères, lors de la spermiogenèse, les histones, qui forment les nucléosomes condensant l'ADN, sont remplacées par des petites protéines basiques spécifiques du noyau spermatique : les protamines. Chez les mammifères, cette architecture est stabilisée par des liaisons disulfures inter-protamines tandis que chez la drosophile, leur existence n'est que supposée. Lors de la fécondation, ces protéines sont éliminées du noyau paternel, qui réincorpore des histones pour former une chromatine fonctionnelle. Cette étape nécessite la réduction des liaisons disulfures des protamines, et implique, chez les mammifères, un tri-peptide réducteur, le glutathion. Toutefois, l'existence des liaisons disulfures ainsi que les mécanismes régissant leur mise en place et leur enlèvement lors de la spermiogenèse et de la fécondation sont mal connus.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la mise en place de la chromatine spermatique et aux remodelages qu'elle subit. J'ai notamment montré que les deux protamine-like Mst35Ba et Mst35Bb sont nécessaires pour la mise en place correcte de la chromatine lors de la spermiogenèse de *D. melanogaster*. J'ai également démontré l'importance de deux thiorédoxines sexuelles tant lors de la spermiogenèse que de la fécondation chez la drosophile.

D'une part, j'ai pu montrer que DHD, qui est une thiorédoxine strictement maternelle, est essentielle à l'éviction des protamines de la chromatine paternelle lors de la fécondation. Sans cette protéine, la décondensation du noyau mâle n'a pas lieu, les protamines ne sont pas enlevées du noyau mâle et le développement zygotique ne peut pas avoir lieu. De plus, j'ai pu démontrer que DHD se localise au niveau du noyau mâle lors de la fécondation, ce qui suggère qu'elle pourrait être directement responsable de la réduction des liaisons disulfures qui stabilisent la chromatine spermatique.

D'autre part, j'ai entamé l'étude fonctionnelle de TrxT, une thiorédoxine produite exclusivement dans les testicules. Ces travaux préliminaires suggèrent que TrxT est nécessaire au bon déroulement de la spermiogenèse. Sans cette protéine, les spermatides subissent des dommages à l'ADN et sont perdues au cours de la spermiogenèse.

Ces travaux mettent donc en évidence l'importance des protamine-like Mst35Ba/b pour l'organisation de la chromatine spermatique, ainsi que que les rôles des thiorédoxines sexuelles lors de la reproduction sexuée. Notamment, ils révèlent l'existence d'une thiorédoxine spécialisée dans la réduction des liaisons disulfures portées par le noyau mâle lors de la fécondation. Ces travaux permettent donc de questionner le mécanisme mis en jeu pour la réduction des liaisons disulfures chez les mammifères.

Mots clefs

Thiorédoxine, Drosophile, SNBPs, Spermiogenèse, Remodelage de la chromatine, Fécondation

Summary

In animal sexual reproduction, the spermatozoon is a very specialized cell. Its very peculiar chromatin is remodeled both during spermiogenesis and fertilization. During mammalian and drosophilian spermiogenesis, histones, which form the nucleosomes involved in DNA condensation, are replaced with sperm specific small nuclear basic proteins : the protamines. In mammals, this sperm-specific architecture is stabilized by disulfide bonds. At fertilization, protamines are removed from the male nucleus and maternally-provided histones are incorporated to form a functional paternal chromatin. In mammals, the reduction of disulfide bonds at fertilization requires glutathione, a reducing tripeptide. However, the mechanisms involved in the incorporation and the removal of protamine disulfide bonds are poorly known.

During my PhD, I addressed the questions of sperm chromatin establishment and of its remodeling at fertilization. I showed that two protamine-like, Mst35Ba and Mst35Bb, are necessary for a normal sperm chromatin architecture. I demonstrated also that two sexual thioredoxins are important for spermiogenesis and fertilization in *D. melanogaster*.

In one hand, I showed that DHD, a female-specific thioredoxin, is essential for protamine eviction at fertilization. Without this protein, male nucleus does not decondense, protamines are not removed from sperm chromatin and zygotic development does not occur. Besides, I demonstrated that DHD localizes on the male nucleus at fertilization. It suggests that DHD could be directly responsible for the reduction of the disulfide bonds which stabilize sperm chromatin.

On the other hand, I began to study the function of TrxT, a testis-specific thioredoxin. My preliminary results suggest that TrxT may be needed for spermiogenesis. Without this protein, DNA damages appear on spermatid nuclei, and those spermatozoa are then eliminated during spermatogenesis.

This work shows the importance of Mst35Ba/b for the sperm chromatin organization and highlights the role of thioredoxins in sexual reproduction success. It especially reveals the existence of a thioredoxin dedicated to disulfide bonds reduction at fertilization. This work therefore questions the mechanisms involved in disulfide bonds reduction in mammals.

Keywords

Thioredoxin, Drosophila, SNBPs, Spermiogenesis, Chromatin remodelling, Fertilization

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
ABRÉVIATIONS	17
CHAPITRE 1. AVANT PROPOS	19
CHAPITRE 2. INTRODUCTION	21
1 Généralités sur la chromatine	21
1.1 L'ADN	21
1.2 Les histones	21
1.3 Les différents niveaux de repliement de la chromatine	22
1.4 Propriétés de la chromatine nucléosomée	23
2 Structure et particularité de la chromatine spermatique	25
2.1 Le spermatozoïde est une cellule extrêmement spécialisée	25
2.2 Les protamines : caractéristiques et évolution	25
2.2.1 Les différents types de SNBPs	26
2.2.2 Apparition et évolution des SNBPs	29
2.2.3 Description des SNBPs chez les mammifères et les drosophiles	30
2.3 Organisation de la chromatine spermatique	33
2.4 Rôles possibles de la protamination de la chromatine	35
3 La spermatogenèse	37
3.1 Présentation générale du remodelage chromatinien et de ses mécanismes moléculaires	37
3.2 La spermatogenèse chez la drosophile	44
3.2.1 Organisation de l'appareil reproducteur mâle	44
3.2.2 Les étapes cytologiques de la spermatogenèse	44
4 Le déroulement de l'ovogenèse	47
4.1 Organisation de l'appareil reproducteur femelle	47
4.2 Les étapes de l'ovogenèse	47
5 Fécondation et embryogenèse	49
5.1 Les différentes étapes du remodelage de la chromatine paternelle lors de la fécondation	49
5.1.1 L'éviction des SNBPs	49
5.1.2 Le réassemblage d'une chromatine nucléosomée	51
5.2 Les événements de la fécondation et de l'embryogenèse précoce chez la drosophile	52

5.2.1	Entrée du spermatozoïde et activation de l'ovocyte	52
5.2.2	La formation du zygote	53
5.2.3	Le développement embryonnaire précoce	54
6	Importance des systèmes de maintien de l'homéostasie rédox	57
6.1	Le glutathion	57
6.1.1	Synthèse et recyclage du glutathion	57
6.1.2	Rôles du glutathion	57
6.2	Le système thiorédoxine	58
6.2.1	Présentation des thiorédoxines	58
6.2.2	Rôle des thiorédoxines dans le maintien de l'homéostasie rédox	60
6.3	Rôles des systèmes rédox lors de la reproduction sexuée chez les mammifères	61
6.4	Les thiorédoxines chez la drosophile	62
	OBJECTIFS DE THÈSE	65
	CHAPITRE 3. RÉSULTATS	67
1	Analyse fonctionnelle de Mst35Ba et Mst35Bb	67
1.1	Introduction	67
1.2	Résumé des résultats	67
1.3	Présentation de l'article publié	68
2	Deadhead, une thiorédoxine strictement maternelle, réduit les ponts disulfures des SNBPs	77
2.1	Introduction	77
2.2	Résumé des résultats	77
2.3	Présentation de l'article	78
2.4	Résultats supplémentaires	103
2.4.1	DHD ne semble pas contrôler le recyclage du glutathion oxydé	103
2.4.2	Trx-2 ne semble pas pouvoir remplacer DHD	106
3	TrxT est nécessaire au bon déroulement de la spermiogenèse	109
3.1	Étude phénotypique du mutant <i>TrxT</i>	109
3.2	Les défauts observés ne semblent pas être dus à un problème d'homéostasie du glutathion	114
3.3	Le transgène <i>P[dhd^{WT}]</i> ne sauve pas le phénotype causé par l'absence de TrxT.	115
	CHAPITRE 4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	117
1	Condensation de l'ADN spermatique et rôle des différentes SNBPs	117
1.1	Mst35Ba/b est nécessaire à la structure de la chromatine spermatique	117
1.2	Rôle des domaines HMG dans la condensation de l'ADN	118
2	DHD est requise pour la réduction des ponts disulfures du noyau spermatique	118
2.1	Le noyau spermatique de drosophile est stabilisé par des liaisons disulfures et non pas par des ions Zn^{2+}	118

2.2	DHD pourrait être spécifique de la réduction des SNBPs . . .	119
2.3	La réduction des liaisons disulfures pourrait-elle être prise en charge une protéine réductrice chez les mammifères?	119
3	Importance et rôle des liaisons disulfures pour la chromatine spermatique	120
4	Remodelage de la chromatine spermatique à la fécondation .	120
5	Contrôle de la production de DHD	121
6	Rôle de TrxT lors de la spermiogenèse	122
6.1	Visualisation de TrxT	122
6.2	Comment sont mises en place les liaisons disulfures des SNBPs? 123	
6.3	L'absence de TrxT entraîne-t-elle bien une augmentation de H_2O_2 ?	123
6.4	TrxT est-elle responsable du recyclage de peroxyrédoxines dans les testicules?	124
6.5	Comment TrxT est-elle recyclée?	124
CHAPITRE 5.	CONCLUSION	127
CHAPITRE 6.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	129
BIBLIOGRAPHIE		139

Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ARNi : ARN interférence
ARNm : ARN messenger
DHD : Deadhead
DTT : Dithiolthréitol
GPx : Glutathione Peroxidase
GR : Glutathion Réductase
Grx : Glutarédoxine
GSC : Germline Stem Cell
GSH : Glutathion
GSSG : Disulfide de glutathion
HMG : High Mobility Group
mBrB : Monobromobimane
Prx : Peroxyrédoxine
ROS : Reactive Oxygen Species
SNBPs : Small Nuclear Basic Proteins
snGPx : sperm nucleus Glutathione Peroxidase
Trx : Thiorédoxine
TrxR : Thiorédoxine Réductase
TrxT : ThioredoxinT
ZGA : Zygotic Genome Activation

Avant Propos

La molécule d'ADN est présente dans toutes les cellules vivantes et porte l'information génétique nécessaire à la vie de ces cellules. Chez les animaux à reproduction sexuée, cette molécule est transmise d'une génération à une autre par les gamètes haploïdes mâles et femelles, qui assurent la transmission d'une information génétique intacte tout en permettant le brassage génétique indispensable à la diversité génétique d'une espèce.

Chez les animaux, la fécondation est la rencontre de ces deux cellules extrêmement spécialisées : l'œuf et le spermatozoïde, qui sont le produit de la méiose. Le spermatozoïde subit également un remodelage drastique tant de la cellule en elle-même que de la chromatine qu'elle contient : il acquiert une forme unique, indispensable au transport du matériel génétique paternel, et subit un remaniement drastique de la chromatine qu'il transporte. En effet, au cours de la spermatogenèse, les histones qui compactent l'ADN des cellules somatiques sont remplacées par des petites protéines basiques spécifiques des spermatozoïdes : les SNBPs (Sperm Nuclear Basic Proteins). Ces SNBPs permettent une compaction très forte du matériel génétique paternel et contribuent certainement à la protection et au maintien de l'intégrité du génome jusqu'au moment de la fécondation. Toutefois, cette structure chromatiniennne unique du gamète mâle est incompatible avec les activités nucléaires indispensables au développement embryonnaire et à la vie cellulaire, telles que la réplication, la transcription, la réparation de l'ADN, etc ... C'est pourquoi au moment de la fécondation, il est indispensable que les protamines soient enlevées de l'ADN paternel et remplacées par des histones fournies par le gamète femelle. Pourtant, bien qu'ils soient essentiels à la transmission et à l'intégration du matériel génétique mâle, les processus impliqués dans les remodelages de la chromatine spermatique lors de la spermatogenèse et de la fécondation sont mal connus.

Pour étudier les mécanismes sous-jacents à la formation, au maintien de l'intégrité ainsi qu'à l'incorporation des chromosomes paternels lors de la formation du zygote, mon équipe d'accueil étudie des mutations à effet parental qui affectent spécifiquement ces étapes chez *Drosophila melanogaster*. En effet, ce modèle est particulièrement bien adapté à l'étude de la formation du zygote tant par l'aisance d'élevage de cette espèce, par la facilité de récolte des œufs qui sont pondus juste après la fécondation que par le séquençage complet du génome de *Drosophila melanogaster* et de la disponibilité de nombreux outils génétiques.

Pour élucider les mécanismes moléculaires intervenant dans le remodelage de la chromatine paternelle, j'ai eu la chance de pouvoir caractériser la fonction de la protéine Deadhead (DHD) dont le mutant a été isolé il y a maintenant plus de 20 ans. La souche mutante avec laquelle j'ai travaillé est porteuse d'une délétion touchant deux gènes codant pour des thiorédoxines : *deadhead* (*dhd*) et *ThioredoxinT* (*TrxT*). Ces deux thiorédoxines sont exprimées spécifiquement et respectivement dans les lignées germinales des femelles et des mâles adultes. Je me suis tout d'abord intéressée au rôle de DHD. En effet, les femelles qui n'expriment pas cette thiorédoxine maternelle pondent des œufs qui n'éclosent pas. Au cours de cette thèse, j'ai ainsi pu montrer le rôle et l'importance de DHD lors du remodelage de la chromatine spermatique au moment de la fécondation.

Durant cette étude, j'ai été amenée à caractériser une autre souche, construite au sein du laboratoire. Cette lignée, nommée $\Delta Mst35B$, porte une délétion qui affecte uniquement deux gènes codant pour des protéines spécifiques du spermatozoïde de drosophile appelée "protamine-like" et m'a ensuite été utile pour l'étude du remodelage de la chromatine lors de la fécondation.

Enfin, j'ai commencé à m'intéresser au rôle de TrxT au cours de la spermiogenèse. Cette étude m'a permis d'aborder la question de l'importance de la fine régulation du niveau rédox au cours de la spermatogenèse.

Dans cette introduction, je commencerai par décrire brièvement la chromatine somatique pour ensuite exposer les particularités de la chromatine spermatique et des SNBPs qui la constituent. Ensuite, j'exposerai le déroulement de la gamétogenèse, et plus particulièrement le remodelage que subit la chromatine spermatique avant de retracer les événements de la fécondation et de l'embryogenèse, en insistant sur le remodelage chromatinien qui a lieu au cours de la fécondation. Enfin, j'aborderai l'importance des processus d'oxydoréduction au sein des processus cellulaires, et plus particulièrement lors des événements de la reproduction, avant de détailler les rôles et partenaires des thiorédoxines, qui constituent le centre de ma thèse.

Introduction

C'est à l'heure du commencement qu'il faut tout particulièrement veiller à ce que les équilibres soient précis. Et cela, chaque sœur du Bene Gesserit le sait bien.

FRANK HERBERT
Dune

1 Généralités sur la chromatine

1.1 L'ADN

La molécule d'ADN a été isolée pour la première fois en 1869 par Friedrich Miescher et nommée "nucléine", nom qui fut conservé dans l'appellation "Acide Désoxyribonucléique" (ADN) [Miescher, 1871]. Les avancées majeures qui suivirent vers le milieu du 20^{ème} siècle permirent de décrire les propriétés génétiques et structurales de cette molécule présente dans toutes cellules vivantes. On sait désormais que l'ADN se présente sous la forme d'une double hélice anti-parallèle de 2 nm de diamètre [Watson and Crick, 1953] (Figure 1, (A)). Cette molécule, qui est le support de l'information génétique, est constituée de bases complémentaires dont l'enchaînement constitue le code génétique [Crick et al., 1961]. Chez les organismes eucaryotes, la molécule d'ADN est associée aux histones, formant ainsi la chromatine.

1.2 Les histones

Les histones furent décrites pour la première fois par Albrecht Kossel en 1884 [Kossel, 1884]. Ce sont des petites protéines basiques, ce qui leur permet de lier l'ADN. Cette basicité est due à la richesse de ces protéines en résidus lysine et arginine (environ 25 % de leurs résidus). Les histones sont conservées depuis la levure jusque chez les métazoaires. On en dénombre cinq types : les quatre histones "de cœur" H2A, H2B, H3 et H4 ainsi que l'histone de liaison H1. Les histones "de cœur" sont nommées ainsi car elles forment le cœur du nucléosome tandis que l'histone H1 est dite de liaison car elle lie l'ADN aux histones de cœur. Les histones de cœur se ressemblent beaucoup du point de vue structural : elles possèdent un domaine central nommé "histone-fold" ainsi qu'une queue N-terminale non structurée (Figure 1, (B)) [Luger et al., 1997]. Le domaine "histone-fold" intervient dans l'interaction inter-histones, tandis que le domaine N-terminal peut être le siège de modifications post-traductionnelles. Ces modifications sont notamment nécessaires

pour le recrutement de protéines à la chromatine, mais peuvent également changer la conformation de la chromatine et la force d'interaction entre les histones et l'ADN (pour une revue, voir [Tessarz and Kouzarides, 2014]).

Pour chaque type d'histones de cœur, on peut distinguer les histones canoniques des variants d'histone. Alors que les histones canoniques sont des protéines dont le taux d'évolution est très faible, les variants d'histones présentent des différences de séquence protéique parfois très importantes [Kamakaka and Biggins, 2005]. Chez l'homme, la souris et la drosophile, les histones canoniques sont codées par plusieurs gènes organisés en clusters tandis que les gènes des variants d'histones sont généralement présents en une ou deux copies réparties de manière isolées dans le génome [Lifton et al., 1978; Hentschel and Birnstiel, 1981; Marzluff et al., 2002].

Des analyses de cristallographie ont permis de décrire finement la structure des nucléosomes [Luger et al., 1997; Richmond and Davey, 2003]. Comme prédit par [Olins and Olins, 1974], le nucléosome est formé de deux histones "de cœur" de chaque type autour desquelles est enroulé 147 pb d'ADN (Figure 1, (B)).

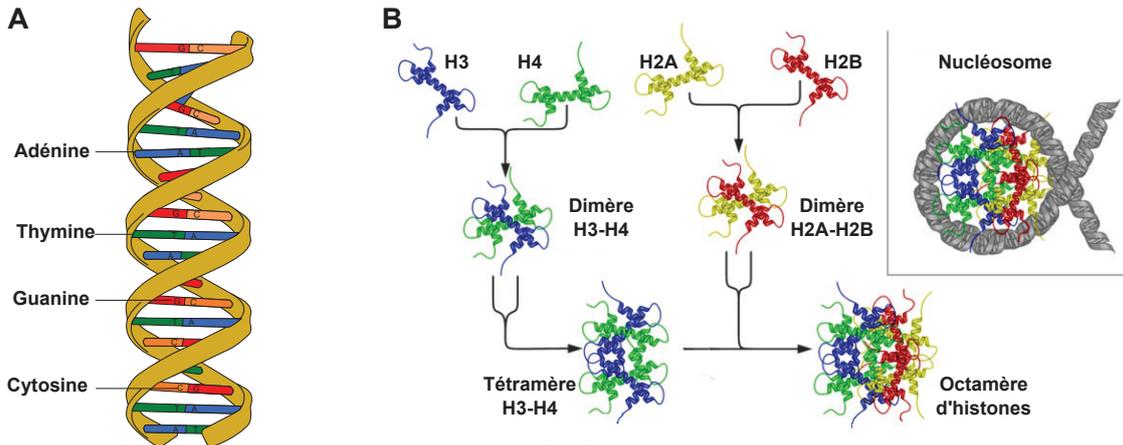


FIGURE 1. **Constituants de la chromatine.** (A) Structure de la double hélice d'ADN. Les deux brins d'ADN sont orientés de manière anti-parallèle l'un par rapport à l'autre. Ils sont constitués de bases azotées (adénine, thymine, guanine et cytosine) qui peuvent s'apparier. Modifié d'après <http://fr.wikipedia.org>. (B) Assemblage d'un nucléosome. Les histones H3 et H4 s'associent pour créer un dimère H3-H4, tandis H2A et H2B interagissent pour former un dimère H2A-H2B. Ensuite, deux dimères H3-H4 s'unissent pour donner un tétramère de H3-H4, qui va interagir avec deux dimères H2A-H2B pour former un octamère d'histones. Un nucléosome est composé de cet octamère d'histones et de 147 pb d'ADN entourées autour de ce complexe protéique. Tiré de <http://en.wikipedia.org>.

1.3 Les différents niveaux de repliement de la chromatine

L'ADN humain compte 3 400 Mbp tandis que celui de la drosophile en comporte 118 Mbp. Ces longues molécules d'ADN vont subir différents niveaux d'enroulement

et de repliement qui vont permettre de raccourcir la taille de la molécule de près de 10 000 fois (Figure 2).

La double hélice d'ADN est enroulée une première fois autour d'octamère d'histones formant ainsi les nucléosomes. Ces nucléosomes sont la sous-unité répétée de base de la chromatine [Kornberg, 1974, 1977]. Ce premier niveau de compaction donne naissance à une fibre chromatinienne de 10 nm de diamètre, également appelée "fibre en collier de perles". Le niveau de condensation suivant résulte des interactions entre les queues d'histones des différents nucléosomes. Ces interactions permettent à la fibre de 10 nm de diamètre de s'enrouler pour créer une fibre de 30 nm de diamètre [Finch and Klug, 1976; Zhu and Li, 2016]. Ce serait la forme de chromatine majoritaire dans les cellules interphasiques. Cette fibre formerait des boucles liées à une matrice protéique pour donner naissance à une fibre de 300 nm de diamètre. Enfin, les domaines en boucle s'enrouleraient, compactant encore davantage la chromatine. Ce dernier niveau de compaction aboutirait à un chromosome de 1 400 nm d'épaisseur, visible lors des métaphases de mitose ou de méiose.

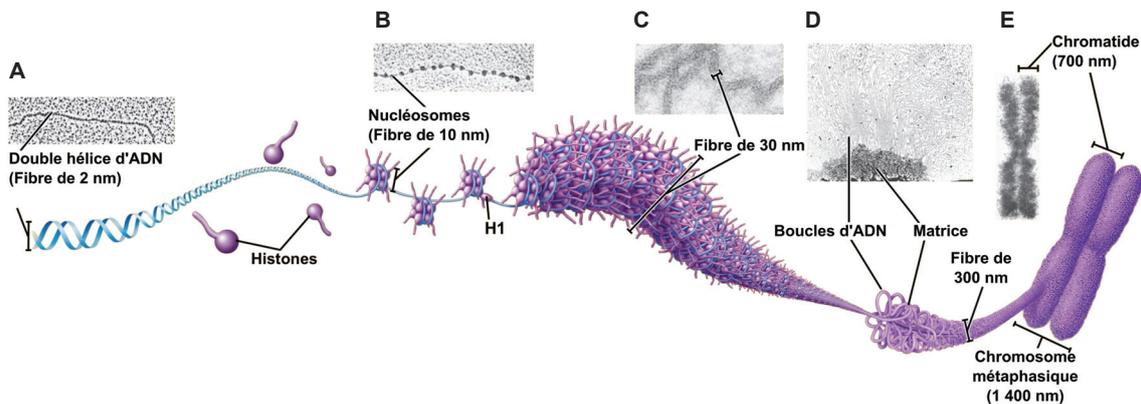


FIGURE 2. **Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.** L'ADN (A) est enroulé en une succession de nucléosomes (B), formant ainsi la chromatine, qui est repliée une première fois pour former une fibre de 30 nm de diamètre enroulée en solénoïde (C). Cette fibre peut subir un niveau de compaction supérieur pour créer une fibre de 300 nm d'épaisseur (D) qui, une fois enroulée sur elle-même aboutit à l'architecture des chromosomes métaphasiques (E). Modifié d'après [Reece et al., 2011].

1.4 Propriétés de la chromatine nucléosomée

Le rôle des histones n'est pas uniquement de condenser l'ADN : elles permettent également de réguler des processus cellulaires tels que la compartimentation de la chromatine en euchromatine ou hétérochromatine, le maintien des identités chromosomiques, la réplication ou la réparation de l'ADN, la régulation de l'expression génétique, la ségrégation chromosomique lors de la mitose, etc ... (pour une revue, voir [Pirrotta, 2016]). La présence d'histones comme constituants de la chromatine est donc essentielle à la vie cellulaire. C'est pourquoi leur réincorporation au sein

du noyau mâle lors de la fécondation et le remodelage correct de la chromatine paternelle à cette occasion constitue une étape clef de la formation du zygote.

2 Structure et particularité de la chromatine spermatique

2.1 Le spermatozoïde est une cellule extrêmement spécialisée

Le spermatozoïde est la cellule reproductrice haploïde mâle intervenant dans la reproduction sexuée. Sa structure est étroitement associée à sa fonction. En effet, chez les animaux, le gamète mâle est composé d'un noyau contenant l'information génétique paternelle, d'un acrosome permettant l'entrée dans l'ovocyte, d'un corps basal contenant les centrioles nécessaires au développement embryonnaire ainsi que d'une pièce intermédiaire comportant les mitochondries nécessaires à son déplacement et d'un appareil locomoteur lui permettant d'atteindre l'ovocyte, le flagelle. Cette structuration du spermatozoïde est conservée entre les mammifères et la drosophile, même si il existe quelques variations de forme et de taille (Figure 3). Chez l'homme par exemple, le flagelle mesure 50-60 μm en moyenne [Mortimer, 1985], contre 1,8 mm chez *Drosophila melanogaster* [Fuller, 1993]. De même, le noyau spermatique apparaît beaucoup plus rond chez l'homme que chez la drosophile, où le noyau du spermatozoïde présente une forme en aiguille. L'extrême condensation de l'ADN spermatique est due au remplacement des histones par des petites protéines très basiques spécifiques du spermatozoïdes : les SNBPs (pour Small Nuclear Basic Proteins), dont la nature varie selon les organismes.

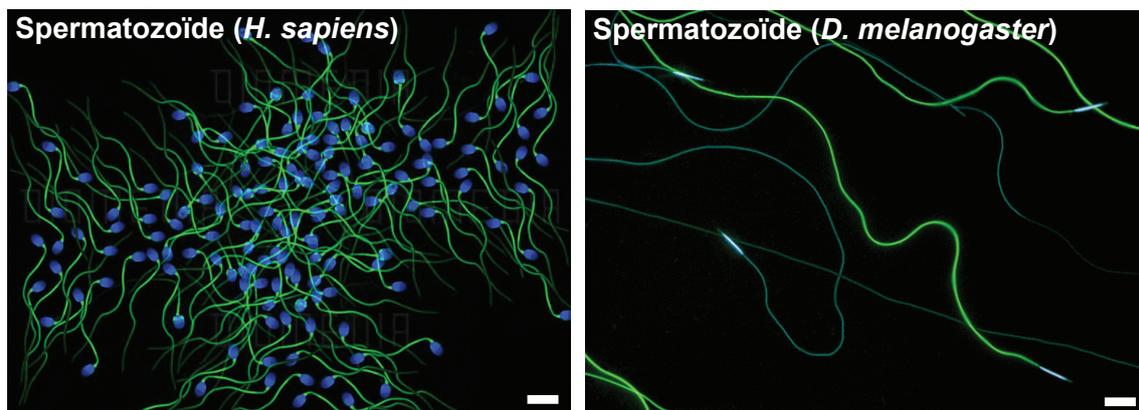


FIGURE 3. Les spermatozoïdes de *Drosophila melanogaster* présente un flagelle extrêmement long et un noyau morphologiquement bien différent par rapport aux spermatozoïdes humains. Images en fluorescence de spermatozoïdes humains (gauche) et de drosophile (droite). Les flagelles sont marquées en vert et l'ADN en bleu, ce qui permet de visualiser les noyaux. Barres d'échelle : 10 μm . Tirés de <http://www.diomedia.com> (gauche) et [Price et al., 1999] (droite).

2.2 Les protamines : caractéristiques et évolution

Grâce aux travaux historiques de Miescher [Miescher, 1874] puis de Kossel [Kossel, 1884, 1897], il est connu depuis le 19^e siècle que la chromatine spermatique est

organisée non pas par des histones canoniques mais par de petites protéines basiques spécifiques du spermatozoïdes : les SNBPs. Historiquement, ces protéines ont été découvertes chez le saumon et définies comme "une base organique" associée à la "nucléine".

2.2.1 Les différents types de SNBPs

Mêmes si toutes les SNBPs sont basiques, leur composition varie fortement selon les organismes, ce qui contraste avec la conservation de la séquence et de la structure des histones. Pour prendre en compte cette hétérogénéité, les SNBPs ont été divisées en trois groupes : le type "histone", le type "protamine" et le type "protamine-like" [Eirén-López et al., 2006; Eirín-López and Ausió, 2009].

Les SNBPs de type "histone" sont des protéines spermatiques très semblables aux histones somatiques. Ce groupe inclut des variants des histones spécifiques du spermatozoïde, comme les histones spH1 et spH2B chez les Échinodermes. On retrouve ces SNBPs de type "histone" dans tout le règne animal, depuis les Éponges jusqu'aux Vertébrés [Ausió, 1999]. Parmi les SNBPs de type "histone" les mieux étudiées, on retrouve celles de certains amphibiens comme *Rana catesbeiana* et *Rana ridibunda* [Kasinsky et al., 1985; Itoh et al., 1997], certaines éponges (*Neofibularia nolitangere*) [Ausió et al., 1997] ou encore certains types de poissons comme la Myxine brune (*Eptatretus stoutii*) et la Lamproie du pacifique (*Lampetra tridentata*) [Saperas et al., 1997].

Par contre, les protamines vraies sont de composition et de structure très hétérogènes. Ce sont de petites protéines basiques enrichies en arginine (>30 % du contenu protéique) (Table 1) [Rooney et al., 2000; Lewis et al., 2003]. Elles sont présentes chez de nombreux Vertébrés, depuis les mammifères (comme la souris ou l'homme, voir Table 2), jusqu'à certains poissons comme le saumon (*Oncorhynchus keta*), mais également chez certains Invertébrés comme le calmar (*Loligo opalescens*) par exemple [Lewis et al., 2003].

Enfin, les SNBPs de type "protamine-like" seraient un intermédiaire entre le type "histone" et les protamines vraies, notamment du point de vue structurel. Ces protéines possèdent un plus fort pourcentage en résidus lysine et arginine que les histones (35-50 % Arg + Lys) et sont de structures très diverses. Initialement décrites chez les bivalves comme *Mytilus californianus* [Jutglar et al., 1991; Carlos et al., 1993] ou *Ensis minor*, [Bandiera et al., 1995] on les retrouve chez de nombreuses espèces, notamment chez *Drosophila melanogaster* (Table 2) [Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005; Eren-Ghiani et al., 2015], mais également chez les Vertébrés [Ausió, 1999].

Homo Sapiens

P1 (51 AA)	MARYRCCRSQ	SRSRYRQRQ	RSRRRRRRSC	QTRRRAMRCC	RPRYRPRCRR
	H				
P2 (57 AA)	RTHGQSHYRR	RHCSRRRLHR	IHRQHRSCR	RRKRRSCRHR	RRHRRGCRTR
	KRTCRRH				
P3 (54 AA)	GQSHYRRRH	SRRRLHRIHR	RQHRSCRRRK	RRSCRHRRRH	RRGCRTKRT
	CRRH				
P4 (56 AA)	THGQSHYRRR	HCSRRRLHRI	HRRQHRSCR	RKRRSCRHR	RHRRGCRTRK
	RTCRRH				

Mus musculus

P1 (51 AA)	MARYRCCRSK	SRSRERRRR	RCRRRRRRCC	RRRRRRCCRR	RRSYTIRCKK
	Y				
P2 (63 AA)	RGHHHRHR	CSRKRLHRIH	KRRRSRRRR	RHSCRHRRRH	RRGCRRSRRR
	RRCRCKCRR	HHH			

Drosophila melanogaster

Mst35Ba (146 AA)	MSSNNVNECK	SLWNGIISIS	AKDESPKGLT	EMCNHPIRRA	PQKCKPMKSC
	AKPRRKAACA	KATRPKVKCA	PRQKCSKQGP	VTNNAYLNFV	RSFRKKHCNL
	KPRELIAKAA	KAWARLSENR	KDRYRRMACK	VTTSERHKRR	RICQQY
Mst35Bb (144 AA)	MSSNNVNECK	SLWNGIISIS	AKDESPKGLT	EMCNHPKRRRA	PPKCKPMKSC
	AKPRRKRACA	KATRPKVKCA	PSQKCSKQGP	VTNNAYLNFV	RFFRKKHCNDL
	KPQELIAEAR				
Mst77F (215 AA)	MSNLKQKDSK	PEVAVTKSVK	TYKKSIEYVN	SDASDIEEDI	NRAEDEYASS
	SGFVNFLRDF	KKRYGEYYSN	NEIRRAAETR	WNEMSFHRHC	QYSAEPLDTF
	HVEPNSVSSL	QRSSEGEHRM	HSEISGCADT	FFGAGGSNSC	TPRKENKCSK
	PRVRKSCP KP	RAKTSKQRRS	CGKPKPKGAR	PRKACPRPRK	KMECGKAKAK
	PRCLKPKSSK	PKCSM			
Prt199C (201 AA)	MGRKRGRKEY	CPPIYKRQKV	ARVTNNGYLN	FMTEYKKRFY	GLSPQDMVHY
	AAKQWTQLSM	AEKEAFKSKK	PSTITLKSPA	QYVACEMKSD	VAGGQOSSCQ
	RQSPSARLRE	SERRSSRSKT	LCRSAKNRQR	GKPKPQOSKR	RLSHMGSAVA
	YIHFLRKFOR	KNTELRTIDL	LKTATRLWCR	LPERHRHAFE	RPLWIVTIGK
	S				

TABLE 2. Les SNBPs de l'homme, de la souris et de drosophile sont basiques et riches en résidus cystéines. Les protamines de l'homme et de la souris sont riches en arginine (bleu) tandis que les SBNPs de drosophile sont enrichies en lysine (vert). Les résidus histidines (basiques) sont en marron tandis que les cystéines sont surlignées en rose. Les séquences protéiques ont été obtenues sur <http://www.uniprot.org/>.

2.2.2 Apparition et évolution des SNBPs

À la vue d'une si grande diversité de protéines pour une même fonction, on peut se demander comment ces différences ont pu apparaître.

Évolution des SNBPs

L'hypothèse communément admise est que les protamines vraies ont évolué à partir des protamine-like, qui seraient elles mêmes issues des histones. Cette hypothèse est notamment soutenue par des études sur les Bivalves et sur les Chordés, qui révèlent la similarité de leurs protamine-like avec l'histone H1 [Ausió, 1999; Lewis et al., 2004; Eirín-López et al., 2006]. Ainsi, il semblerait que les SNBPs évoluent très rapidement et que la transition "Histone" → "Protamine-like" → "Protamine vraie" ait eu lieu plusieurs fois indépendamment.

Enrichissement en arginine des protamines

Les protamines vraies se distinguent des protamine-like notamment par leur enrichissement en arginine et non en lysine. La comparaison des SNBPs de *Ciona intestinalis* et *Styela montereyensis*, deux espèces d'ascidies qui ont respectivement des SNBPs de type "histone" et de type "protamine vraie", apporte une proposition de mécanisme pour cette transition depuis des SNBPs riches en lysine vers des protamines riches en arginine [Lewis et al., 2004; Saperas and Ausió, 2013]. En effet, des codons successifs de la lysine, AAG, peuvent facilement être transformé en ceux de l'arginine, AGA, par l'apparition d'une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture lors de la traduction.

Il faut également noter que les protamines vraies font partie des protéines évoluant le plus rapidement : la position de résidus arginine ainsi que la taille de la protéine sont fortement variables [Rooney et al., 2000] (Table 1). Chez les mammifères, il semble qu'il y ait différentes contraintes et effets de sélection sexuelle, ce qui résulte en une vaste diversité de protamines [Rooney et al., 2000; Lüke et al., 2016a; Lüke et al., 2016b]. Cependant, sans doute sous l'effet d'une sélection négative, les protamines vraies ont conservé leur enrichissement en résidus arginine, ce qui leur confère certaines propriétés. Par exemple, l'enrichissement en arginine des protamines leur permet d'avoir une plus forte affinité pour l'ADN qu'un enrichissement en lysine [Puigdoménech et al., 1976]. En effet, cette étude présente les résultats de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) montrant que des protéines riches en lysine se détachent de l'ADN à des concentrations en NaCl beaucoup plus faibles que des protéines riches en arginine. De plus, un enrichissement en arginine est plus efficace pour condenser l'ADN qu'un enrichissement en lysine : les arginines diminuent plus fortement les répulsions électrostatiques que ne le font les lysines, ce qui permet une condensation plus importante de l'ADN [DeRouchey et al., 2013]. Enfin, la richesse en arginine des SNBPs pourrait conférer un avantage fonctionnel lors de la fécondation : des études *in vitro* suggèrent que la présence de clusters d'arginine portés par les SNBPs contribuent à l'activation de la caséine kinase II de l'oursin tandis que des SNBPs possédant des clusters de lysine en seraient incapables [Ohtsuki et al., 1996]. Or, la caséine kinase, qui est présente dans les œufs d'oursin, est cruciale pour l'initiation de la réplication de l'ADN, et donc pour le développement embryonnaire.

Apparition des résidus cystéines

Parmi les protamines vraies décrites, certaines présentent également un enrichissement en résidus cystéine, ce qui est assez exceptionnel parmi l'ensemble des protéines chromosomiques. Chez les mammifères, lors de la transition des Méthathériens vers les Euthériens, la part de cystéine dans les SNBPs devient abondante [Lewis et al., 2003] (Table 1). Toutefois, on retrouve cet enrichissement en résidus cystéine non seulement chez les marsupiaux du genre *Planigale* [Retief et al., 1995b], mais également chez les céphalopodes comme la pieuvre blanche (*Eledone cirrhosa*) [Gimenez-Bonafé et al., 2002]. Cette forte proportion en résidus cystéines serait donc apparue plusieurs fois indépendamment au cours de l'évolution, ce qui suggère l'importance de ces résidus cystéines pour la structure de la chromatine spermatique.

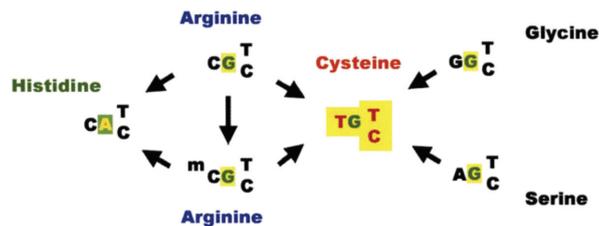


FIGURE 4. Mécanisme probable d'apparition des résidus cystéines dans la séquence protéique des protamines. Tiré de [Lewis et al., 2003].

Un mécanisme moléculaire expliquant cette transition est apporté dans [Oliva and Dixon, 1990] : la transformation de la première base azotée du codon en thymine serait à l'origine de la substitution des résidus arginine, sérine et glycine en résidus par des cystéines. La richesse en arginine des protamines ainsi que la présence de CpG pouvant être méthylés facilitent cette substitution. Ce mécanisme pourrait donc expliquer l'enrichissement des protamines en résidus cystéine (Figure 4). Ces résidus cystéine formeraient des ponts disulfures intra- et inter-protéiques entre les protamines, ce qui contribuerait à stabiliser la chromatine spermatique [Balhorn, 1982, 2007; Gimenez-Bonafé et al., 2002] (voir pp. 33-35 et 43).

2.2.3 Description des SNBPs chez les mammifères et les drosophiles

Comme nous l'avons évoqué précédemment (pp. 26, 28), les chromatines spermatiques des mammifères et des drosophiles sont différentes les unes des autres. En effet, chez les mammifères, l'ADN spermatique est compacté à l'aide de protamines vraies tandis que chez *Drosophila melanogaster*, il est replié à l'aide de protamine-like. Dans cette sous-partie, nous allons comparer plus en détails ces protéines chez les mammifères et chez la drosophile.

Les protamines vraies des mammifères

On trouve deux familles de protamines chez les mammifères : P1 et P2, codées respectivement par *prm-1* et *prm-2*. La protéine P1 est présente dans la chromatine spermatique de tous les mammifères. Par contre, bien que le gène *prm-2* soit retrouvé chez tous les Euthériens, P2 n'est retrouvée que chez les primates, plusieurs rongeurs dont la souris, et certains autres mammifères placentaires, [Lewis et al.,

2003]. Chez certaines espèces comme le taureau et le sanglier, le gène *prm-2* est présent mais code pour une protéine dysfonctionnelle [Maier et al., 1990]. Chez le rat par contre, le gène coderait pour une protéine fonctionnelle, mais P2 ne participe pas à la compaction de la chromatine mâle car son expression est supprimée à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel [Bunick et al., 1990].

Chez la souris comme chez l'homme, *prm-1* et *prm-2* sont organisés en un tandem localisé sur le chromosome 16 [Reeves et al., 1989; Nelson and Krawetz, 1993]. Contrairement à la protéine P1 de 7 kDa, P2 est synthétisée comme un précurseur protéique de 14 kDa : cette protéine subit des protéolyse successives en N-terminal de la séquence protéique aboutissant à la protéine P2 mature de 6 kDa chez la souris [Yelick et al., 1987; Chauvière et al., 1992; Green et al., 1994]. Chez l'homme, cette protéolyse aboutit à la famille de protéines P2, P3 et P4 (entre 7 et 8 kDa) [McKay et al., 1986; de Mateo et al., 2011]. Ces protéines ont une très fort enrichissement en résidus basiques, notamment en résidus arginine qui représentent 46 à 48 % des acides aminés des protamines chez l'homme et 50% (pour P2) à 55 % (pour P1) chez la souris (Table 2). On note la présence de domaines contenant une succession de 3 à 7 résidus arginine, qui sont probablement des domaines d'ancrage à l'ADN (Table 2) [Balhorn, 2007]. De plus, les protamines sont rapidement phosphorylées sur leur résidus sérine et thréonines juste après leur synthèse, ce qui aurait pour rôle de minimiser leur interaction avec l'ADN avant leur incorporation [Green et al., 1994; Balhorn, 2007].

Les protamines des mammifères placentaires présentent un enrichissement en résidus cystéines, ce qui est plutôt inhabituel pour des protéines de la chromatine (Table 2). On peut notamment remarquer que les résidus cystéine de la séquence protéique codée par *prm-2* se situent tous en C-terminal de la protéine, et plus précisément après le site de protéolyse (Figure 5). Par conséquent, tous les résidus cystéine sont présents sur la ou les protéine(s) mature(s). Au cours de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, les groupements thiols portés par les résidus cystéines vont être oxydés et vont former des liaisons disulfures [Shalgi et al., 1989; Balhorn, 2007]. L'absence de ces ponts disulfures est corrélée à une plus grande instabilité de la chromatine spermatique [Retief et al., 1995a; Retief et al., 1995b]. Ces résidus cystéine sont donc cruciaux pour la stabilité de la chromatine spermatique.

Enfin, chez l'homme comme chez la souris, la présence de toutes les protamines au sein de la chromatine spermatique ainsi que le maintien d'un certain ratio P1/P2 sont requis pour la fertilité mâle. En effet, chez la souris, la mutation de l'un des deux gènes des protamines révèle l'haploinsuffisance de ces gènes [Cho et al., 2001]. Des études chez l'homme montre une corrélation entre l'infertilité et une altération du contenu en protamines des noyaux spermatiques ainsi qu'entre l'infertilité et l'existence de mutations dans les gènes de protamines [Oliva, 2006; Jodar and Oliva, 2014].

Les protamine-like de la drosophile

Chez *Drosophila melanogaster*, quatre protamine-like ont été décrites pour le moment : Mst35Ba, Mst35Bb, Mst77F et Prtl99C [Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005; Eren-Ghiani et al., 2015]. Toutes ces protéines possèdent un domaine

HMG (High Mobility Group) tronqué, nommé MST-HMG [Doyen et al., 2015] (Figure 5). Un domaine HMG est une séquence d'environ 75 acides aminés conservée au cours de l'évolution. La structure des boîtes HMG consiste en trois hélices α organisées en "L" et ce domaine est présent chez de nombreuses protéines liant la chromatine. Chez les mammifères, ces protéines sont extrêmement abondantes et permettent notamment de changer la structure chromatinienne, de recruter les machineries de réparation de l'ADN ou de réguler la transcription de certains gènes [Stros et al., 2007; Reeves, 2010].

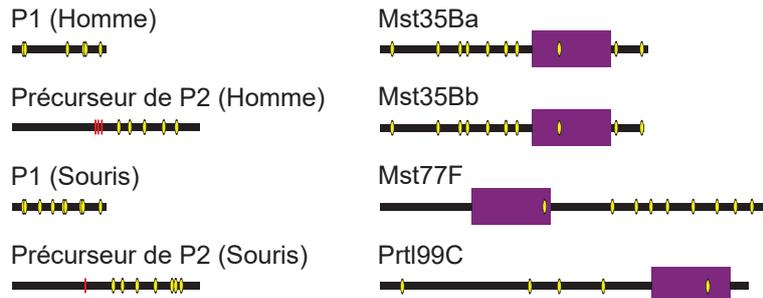


FIGURE 5. **Position des résidus cystéine chez les SNBPs de l'homme la souris et la drosophile.** Les boîtes MST-HMG sont en violet et la position des résidus cystéine est indiquée en jaune. Les sites de protéolyse qui aboutissent aux protéines P2 matures sont figurés en rouge.

Prtl99C se situe sur le chromosome 3 tandis que *Mst35Ba* et *Mst35Bb*, dont les gènes sont issus d'une duplication [Dorus et al., 2008], sont organisés en tandem sur le chromosome 2. On trouve également des copies des gènes *Mst35Ba/b* sur le chromosome Y, mais elles ne seraient pas fonctionnelles [Méndez-Lago et al., 2011]. Quant à la quatrième SNBP, son cas est plus complexe. En effet, le gène *Mst77F* est également localisé sur le chromosome 3, mais 18 copies de ce gène ont été identifiées sur le chromosome Y, dont certaines seraient fonctionnelles [Krsticevic et al., 2010, 2015]. Les SNBPs de *D. melanogaster* sont très riches en résidus lysine (Table 2). Elles sont donc très basiques, ce qui leur confère une forte affinité pour l'ADN. Étonnamment, ces protamine-like sont également enrichies en résidus cystéines (Table 2 et Figure 5), ce qui pourrait leur permettre de former des ponts disulfures, à l'instar de ce qui a lieu au sein de la chromatine spermatique des mammifères. Toutefois, contrairement aux protamines vraies, l'existence de ces liaisons covalentes intra- et/ou inter-protéiques n'était pas démontrée jusqu'à présent.

Contrairement à ce qui a été montré pour l'homme et la souris, toutes les SNBPs ne sont pas essentielles à la fertilité mâle chez la drosophile : seules les protéines *Mst77F* et *Prtl99C* sont indispensables [Rathke et al., 2010; Tirmarche et al., 2014; Eren-Ghiani et al., 2015]. On peut noter la position très particulière des résidus cystéine de *Mst77F*, qui sont tous localisés en C-terminal, contrairement aux autres SNBPs qui présentent des résidus cystéines distribués sur toute la longueur de la protéine (Table 2 et Figure 5). Cela n'est pas sans rappeler la position des résidus cystéine du précurseur des protamines P2 des mammifères. Or, des travaux réalisés dans l'équipe ont montré que de manière surprenante, tout comme la protamine P2,

Mst77F est incorporée dans la chromatine spermatique sous forme d'un précurseur protéique, qui est ensuite clivé pour aboutir à la protéine Mst77F mature présente dans les noyaux des spermatozoïdes [Kimura and Loppin, submitted].

2.3 Organisation de la chromatine spermatique

L'extrême compaction de la chromatine spermatique rend l'étude de sa structure difficile. De ce fait, son organisation précise est assez mal connue. En effet, pour le moment, aucune résolution de structure de cette chromatine n'a pas été obtenue, que ce soit par cristallographie, ou par résonance magnétique. Plusieurs approches ont été entreprises pour appréhender l'organisation de la chromatine spermatique, comme l'étude *in vitro* de complexes P1/ADN chez le taureau [Vilfan et al., 2004], l'analyse par force atomique de complexe P1/ADN chez le saumon [Balhorn et al., 2000], la déconvolution de données de spectroscopie à infrarouge effectuées sur les noyaux spermatiques de saumon et de calamar [Roque et al., 2011] ou encore par l'observation par microscope électronique à balayage de coupes de l'épididyme de rat réalisées au cryostat [Koehler et al., 1983] ou de chromatine partiellement décondensée [Ausió et al., 2014].

Ces études montrent que, chez les organismes à protamines vraies, la protamine P1 se lie au sillon majeur de l'ADN *via* ses domaines d'ancrage riches en résidus arginine, à raison d'une protamine par tour d'ADN [Balhorn et al., 2000; Balhorn, 2007]. Le complexe ADN-protamines serait stabilisé par la combinaison de liaisons hydrogènes et de liaisons électrostatiques qui se formeraient entre les résidus arginine des protamines et les groupements phosphate de l'ADN. Contrairement au repliement de l'ADN causé par les histones, la protamine P1 induit le repliement et la condensation de l'ADN en des sous-unités beaucoup plus larges qui forment des toroïdes de chromatine (Figure 6) [Vilfan et al., 2004; Balhorn, 2007; Roque et al., 2011; Ausió et al., 2014]. Ces sous-unités toroïdales feraient à peu près 50-70 nm de diamètre, 25 nm d'épaisseur et contiendraient environ 50 000 pb d'ADN fortement condensé. Cette structure est stabilisée par la formation de ponts disulfures entre les protamines [Balhorn, 1982, 2007]. Toutefois un modèle parallèle et controversé existe et propose que la chromatine spermatique soit stabilisée par des liaisons faibles dépendantes du zinc [Björndahl and Kvist, 2010]. En effet, les résidus cystéines et histidines peuvent lier l'ion Zn^{2+} via leurs groupements thiols ou imidazoles respectifs. Cela permettrait la création de liaisons faibles entre les protamines, ce qui stabiliseraient la chromatine. Afin d'expliquer la diminution des groupements thiols libres, ce qui est généralement interprétée comme la création de liaisons disulfures, les auteurs proposent que le zinc interagisse avec les groupements thiols, ce qui les rendraient indétectables [Björndahl and Kvist, 2010]. Quant à la décondensation *in vitro* induite par un traitement au DTT (le dithiothréitol, un agent réducteur), les auteurs pensent que le DTT chélaterait les ions Zn^{2+} , ce qui permettrait la décondensation du noyau spermatique. Toutefois, ce modèle est très controversé.

La structure de la chromatine spermatique de *D. melanogaster* est encore moins bien connue que celle des mammifères. Des études montrent que les protéines Mst77F

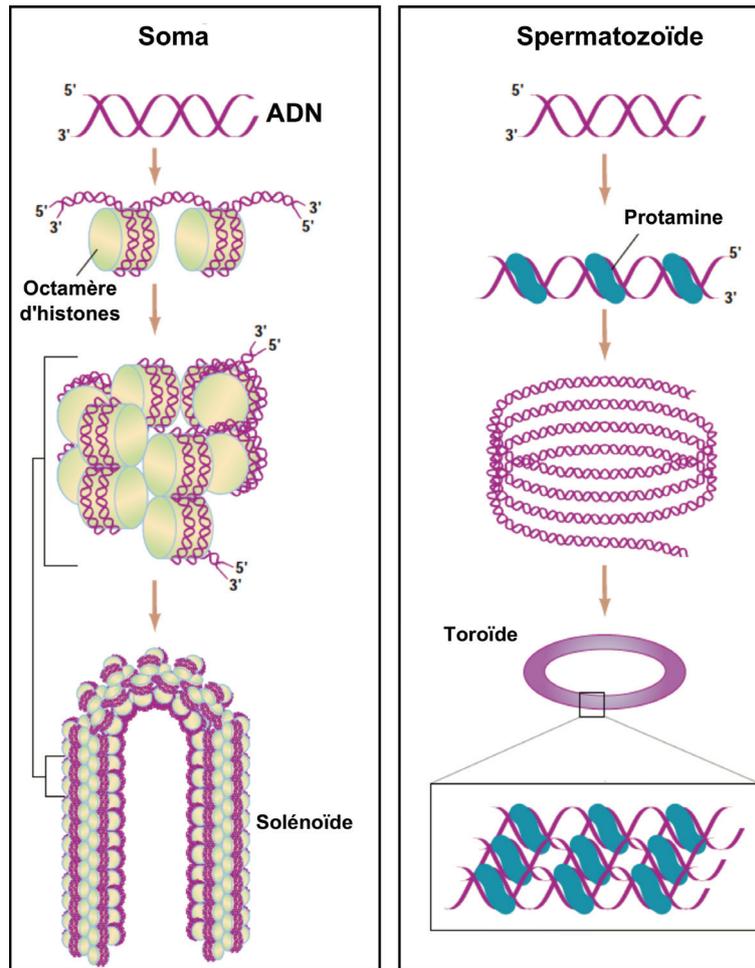


FIGURE 6. Chez les mammifères, la chromatine spermatique a une structure et une composition unique par rapport au reste des cellules de l'organisme. Alors que l'ADN des cellules somatiques est empaqueté par des octamères d'histones, l'ADN contenu dans le noyau spermatique est condensé par des petites protéines basiques, nommées protamines. Ces protamines organisent la chromatine en sous-unités toroïdales, ce qui aboutit à une très forte compaction de l'ADN. Repris de [Braun, 2001]

et Prlt99C sont essentielles à la fertilité mâle [Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005; Eren-Ghiani et al., 2015], ce qui suggère qu'elles pourraient être essentielles à la structure de la chromatine spermatique. Toutefois, l'étude [Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005], portant sur *Mst77F*, se base sur l'analyse de la souche *ms(3)nc3/Df(3L)ri-79C* est mâle stérile. *ms(3)nc3* est un allèle qui porte une mutation faux sens au niveau du codon 149 de *Mst77F*, tandis que *Df(3L)ri-79C* est une délétion qui couvrirait le gène *Mst77F*. Ces mâles présentent une spermiogénèse aberrante, au cours de laquelle les noyaux spermatiques conservent une forme ronde au lieu de s'allonger en aiguille. En se basant sur ces observations, il a été déduit que *Mst77F* est indispensable à la conformation de la chromatine spermatique. Toutefois, l'allèle *ms(3)nc3* n'est pas un allèle nul, mais code pour une protéine qui pourrait avoir un effet dominant négatif induisant ces phénotypes. De plus, des

travaux internes à l'équipe menés par Shuhei Kimura ont montré que la déficience *Df(3L)ri-79C* ne couvre pas le gène *Mst77F* [Kimura and Loppin, submitted], ce qui remet en cause les résultats de l'étude [Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005]. Afin de prouver l'importance de *Mst77F* dans l'architecture de la chromatine spermatique, Shuhei Kimura a généré un mutant nul pour *Mst77F* par la technique du CRISPR-Cas9 et a montré que ces mutants sont mâles stériles. En effet, les spermatozoïdes produits par ces mâles présentent une morphologie nucléaire aberrante et la spermiogenèse n'aboutit pas à la formation de spermatozoïdes matures [Kimura and Loppin, submitted], ce qui montre que *Mst77F* est essentielle pour la fertilité mâle.

Une étude récente a montré que *Mst77F* lie l'ADN *in vitro* via son domaine C-terminal [Kost et al., 2015]. Elle montre également que cette SNBP est capable de condenser l'ADN *in vitro*, et que cette condensation nécessite son domaine N-terminal, qui contient la boîte HMG.

Il semblerait également que les quatre SNBPs connues chez *Drosophila melanogaster* agissent de concert pour condenser la chromatine spermatique. En absence de *Prtl99C* et/ou des protéines *Mst35Ba* et *Mst35Bb*, on observe une élongation du noyau du spermatozoïde, ce qui est interprété comme une moindre compaction de l'ADN spermatique [Eren-Ghiani et al., 2015]. De plus, l'absence de la partie C-terminal de *Prtl99C*, qui porte la boîte HMG, provoque également une augmentation de la longueur du noyau spermatique [Eren-Ghiani et al., 2015], ce qui soutient l'importance de ces domaines pour la compaction de l'ADN spermatique.

L'énorme diversité des SNBPs dans le règne animal suggère que la structure de la chromatine change d'un organisme à l'autre selon le type de SNBPs qui condense l'ADN spermatique [Ausió et al., 2014]. Le seul point commun qui se dégage est l'extrême compaction de la chromatine spermatique, ce qui participerait de la fonction du spermatozoïde.

2.4 Rôles possibles de la protamination de la chromatine

La fonction majeure du gamète mâle est de fournir le matériel génétique paternel intact en vue de la reproduction. Or, malgré de nombreuses variations sur la nature des SNBPs, on remarque leur présence chez la plupart des gamètes mâles. Cela soutient l'idée que la protamination de l'ADN spermatique joue un rôle essentiel pour la transmission du matériel génétique. Plusieurs hypothèses concernant leurs rôles ont été avancées.

Tout d'abord, on pense que cette forte condensation de l'ADN spermatique permettrait au gamète mâle d'avoir un meilleur hydrodynamisme et donc améliorer sa chance d'atteindre le gamète femelle. Chez l'homme, une mauvaise protamination de l'ADN spermatique est corrélée avec des défauts de forme de la tête du spermatozoïde [Utsuno et al., 2014] et des tests chez les cervidés montrent que des spermatozoïdes avec une tête plus allongée avancent plus vite [Malo et al., 2006]. La forme de la tête du spermatozoïde pourrait donc être un facteur de sélection du gamète lors de la fécondation : il semble en effet que l'évolution des protamines chez les rongeurs soit corrélée à des changements de la forme de la tête du spermatozoïde [Lüke et al., 2014].

De plus, les SNBPs pourraient conférer au génome paternel une protection contre les dommages à l'ADN. Chez l'homme et la souris, il y a une corrélation entre des défauts de protamination de l'ADN spermatique et l'apparition de dommages à l'ADN [Cho et al., 2001; Fortes et al., 2014] (pour revues, voir [Oliva, 2006; Jodar and Oliva, 2014]). Chez la drosophile, en l'absence de Mst35Ba et Mst35Bb, la chromatine est plus sensible aux rayons X que la chromatine spermatique sauvage [Rathke et al., 2010].

Enfin, on a supposé que la protamination du génome paternel pourrait également permettre un effacement des marques épigénétiques portées par la chromatine spermatique. Toutefois, de nombreuses données viennent contredire cette hypothèse. Tout d'abord, tout le génome spermatique n'est pas empaqueté par les SNBPs. Selon les espèces, une portion variable de l'ADN reste associé aux nucléosomes. Chez l'homme, 10 à 15 % de la chromatine est nucléosomée [Tanphaichitr et al., 1978; Brykczynska et al., 2010], tandis que chez la souris, cette portion est estimée à 1 % environ [van der Heijden et al., 2005; Brykczynska et al., 2010]. Chez la drosophile, l'analyse des protéines spermatiques par spectrométrie de masse révèle également la présence d'histones [Dorus et al., 2006].

Chez les mammifères, on trouve par exemple des variants d'histones, comme H2AL1 et H2AL2 qui sont associés au chromocentre du noyau spermatique et transmis à lors de la fécondation [Boussouar et al., 2008; Wu et al., 2008]. Les nucléosomes rémanents comportent également des marques d'histones, comme les modifications H3K4me2 et H3K27me3, qui sont préférentiellement localisées au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans le développement embryonnaire [Brykczynska et al., 2010; Castillo et al., 2015]. Cela suggère le maintien et la transmission de certaines informations épigénétiques. De plus, ces nucléosomes rémanents permettent également de maintenir l'identité de certains territoires chromosomiques : chez la drosophile et le xénope comme chez les mammifères, les centromères restent associés à des nucléosomes contenant Cid/Cenp-A, un variant de l'histone H3, ce qui assure leur identité épigénétique [Palmer et al., 1990; Zalensky et al., 1993; Milks et al., 2009; Raychaudhuri et al., 2012].

De plus, chez la souris et l'homme, il a récemment été montré que les protamines présentes dans la chromatine du spermatozoïde portent des modifications post-traductionnelles : ces protéines sont phosphorylées, acétylées et méthylées [Castillo et al., 2015]. Ces modifications pourraient moduler la structure chromatiniennne du spermatozoïde mature, mais également jouer un rôle dans l'expression génétique dans l'embryon précoce chez les mammifères.

La structure chromatiniennne hautement spécifique du gamète mâle est mise en place au cours de la spermatogenèse.

3 La spermatogenèse

Chez la drosophile comme chez les mammifères, la spermatogenèse se divise en trois grandes étapes : la phase de prolifération, la méiose et la phase post-méiotique appelée spermiogenèse, au cours de laquelle la chromatine spermatique est remodelée. Avant d'entrer dans les détails cytologiques de la spermatogenèse chez la drosophile, nous allons aborder les processus de remodelage de la chromatine spermatique, qui sont très conservés entre les mammifères et la drosophile.

3.1 Présentation générale du remodelage chromatinien et de ses mécanismes moléculaires

Les différentes étapes du remodelage chromatinien

Au cours de la spermiogenèse, la chromatine spermatique subit un profond remaniement : les histones qui condensent l'ADN sont remplacées par les SNBPs (Figure 7, pour une revue, voir [Rathke et al., 2014]).

Tout d'abord, certaines histones canoniques sont remplacées par des variants d'histone au cours de la spermatogenèse. Chez les mammifères, de nombreux variants d'histones sont incorporés au sein de la chromatine spermatique [Rathke et al., 2014] (Figure 7). Chez la drosophile, on détecte les variants d'histone H2Av et H3.3 sur la chromatine des spermatocytes et des spermatides juste après la méiose [Akhmanova et al., 1997; Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005] (Figure 7).

On observe également l'apparition de certaines marques d'histones juste après la méiose chez la souris et la drosophile, notamment l'acétylation des histones H4, une forte méthylation des histones H3 ainsi que l'ubiquitination des histones H2A chez la drosophile et de H2A/H2B chez la souris [Chen et al., 1998; Baarends et al., 1999; Godmann et al., 2007; Rathke et al., 2007; Vries et al., 2012]. Les marques épigénétiques H3K9me2/3 et H3K27me2/3, qui sont généralement associées à la chromatine "fermée", permettrait d'inhiber la transcription du génome spermatidique, tandis que la méthylation H3K4me3 pourrait induire une ouverture de la chromatine nécessaire à l'enlèvement ultérieur des nucléosomes [Mozzetta et al., 2015]. L'ubiquitylation promouvrait la dégradation des histones après leur éviction de la chromatine, tandis que l'acétylation des histones H4 pourrait faciliter l'ouverture de la chromatine [Meistrich et al., 1992; Rathke et al., 2007]. En effet, cette modification diminuerait l'affinité de l'histone pour l'ADN, facilitant ainsi l'enlèvement des nucléosomes [Turner, 1991; Tessarz and Kouzarides, 2014]. L'acétylation des histones H4 durant la spermatogenèse est essentielle à la fertilité. Chez l'homme, une baisse de l'acétylation des histones H4 corrèle avec l'infertilité mâle [Sonnack et al., 2002] tandis que chez la souris, si les histones déacétylases sont inhibées, la spermiogenèse s'interrompt, rendant les mâles stériles [Fenic et al., 2004]. Chez *D. melanogaster*, l'inactivation des histones acétyltransférases bloque la différenciation des spermatides et la transition histones/SNBPs, démontrant l'importance de l'acétylation des histones H4 lors de la spermiogenèse [Awe and Renkawitz-Pohl, 2010]. Chez la souris comme chez la drosophile, cette acétylation est reconnue par des protéines "lectrices", ce qui permet leur éviction de la chromatine (voir p. 40).

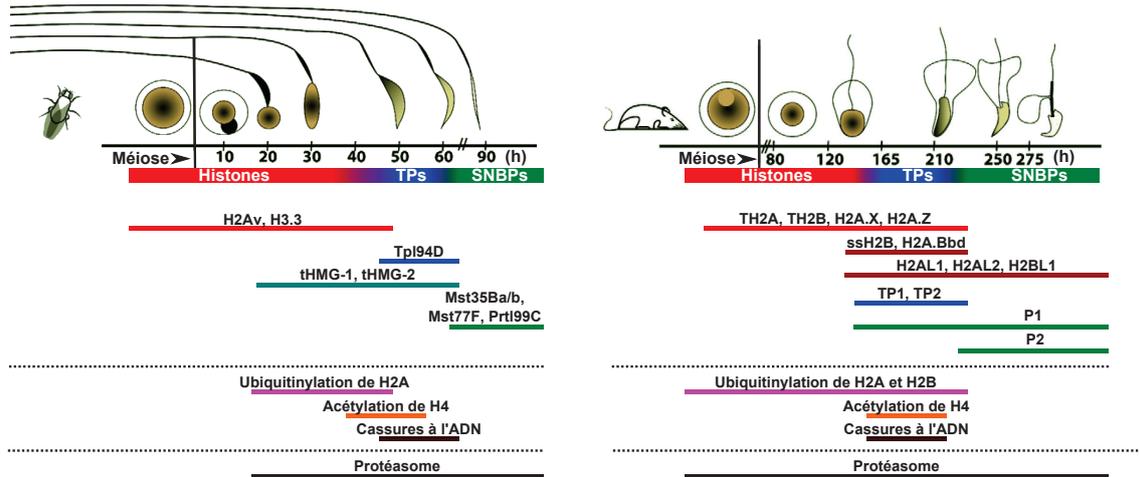


FIGURE 7. Le remodelage de la chromatine spermatique est un évènement complexe mais dont les principales étapes sont conservées entre la drosophile et la souris. Modifié d'après [Rathke et al., 2014].

On note également l'apparition de coupure à l'ADN lors de la transition histone/SNBPs que ce soit chez la souris ou la drosophile [Marcon and Boissonneault, 2004; Rathke et al., 2007]. Ces coupures sont concomitantes avec une forte augmentation de la phosphorylation des variants d'histones γ H2A.X chez la souris, ce qui est un signal de cassures doubles brins [Meyer-Ficca et al., 2005]. Chez cet organisme, ces coupures seraient la conséquence de l'action de la topoisomérase II [Laberge and Boissonneault, 2005]. Ces ruptures de l'ADN permettraient de supprimer les supertours formés lors de l'enlèvement des histones. Chez la drosophile toutefois, l'implication de topoisomérases dans l'apparition de ces ruptures d'ADN n'a pas été étudiée.

L'enlèvement des histones est suivi de leur dégradation, certainement par des protéasomes spécifiques des testicules. Chez la drosophile, il a été proposé que les sous-unités du protéasomes Prosa3T et Prosa6T soient impliquées dans la dégradation des histones. En effet, Prosa3T est présente au niveau des noyaux des spermatozoïdes au stade dit "canoë". De plus, dans le mutant mâle stérile *Prosa6T¹*, on observe une persistance anormale des histones sur les spermatozoïdes [Zhong and Belote, 2007].

Chez la souris, des expériences d'immunofluorescence ont révélé que le protéasome est présent à la périphérie de l'acrosole [Berruti and Martegani, 2005]. De plus, les souris mâles déficientes en PA200, un activateur du protéasome, présentent un retard d'enlèvement des histones du noyau spermatidique [Qian et al., 2013], ce qui soutient l'idée que les histones sont dégradées par le protéasome. Cette protéine colocalise avec les histones acétylées dans des fibroblastes embryonnaires de souris. De plus, des expériences de co-immunoprécipitations à partir de ces cellules fibroblastiques montrent que PA200 lie les histones H4K16ac *via* sa région bromodomain-like, qui est un domaine reconnaissant l'acétylation des histones. Enfin, une expérience *in vitro* montre que PA 200 stimule la dégradation des histones acétylées. L'étude [Qian et al., 2013] montre donc que PA 200 est nécessaire à l'éviction des histones lors

de la spermiogenèse et qu'elle stimule la dégradation des nucléosomes acétylés par le protéasome.

Toutefois, comme précisé précédemment, toutes les histones ne sont pas éliminées de la chromatine spermatique lors de la spermiogenèse. Ces histones rémanentes sont essentielles pour le maintien de l'identité de certains territoires chromosomiques et pourraient jouer un rôle dans l'expression de certains gènes lors de l'embryogenèse (voir p. 36).

Les histones sont ensuite remplacées par des protéines de transition. On en dénombre deux chez la souris, TP1 et TP2 [Meistrich et al., 2003] et trois chez *D. melanogaster*, Tpl94D, tHMG-1 et tHMG-2 [Rathke et al., 2007; Gärtner et al., 2015].

Protéine	Taille (Ac. Aminés)	Arginine (%)	Lysine (%)	Histidine (%)
TP1 (Souris)	55	20	18,2	5,5
TP2 (Souris)	117	13,7	9,4	10,3
Tpl94D	164	11,6	7,3	1,2
tHMG-1	126	4,7	8,7	3,2
tHMG-2	133	5,3	12,8	3,8

TABLE 3. **Les protéines de transition de la souris et de la drosophile sont riches en acides aminés basiques.** Les séquences protéiques ont été obtenues sur <http://www.uniprot.org/>.

TP1 et TP2 sont des protéines basiques riches en résidus lysine, histidine et arginine qui lient fortement l'ADN (Table 3), ce qui a conduit certains auteurs à les classer parmi les SNBPs. Cependant, dans ce manuscrit, nous considérons comme SNBP uniquement les protéines de la chromatine présentes dans le noyau du spermatozoïde mature.

Le rôle des protéines de transition sur la structure chromatinienne est débattu. Certaines études montrent que ces protéines peuvent relaxer la chromatine nucléosomale [Singh and Rao, 1988], tandis que d'autres indiquent que TP1 et TP2 ne provoquent aucune décondensation de la chromatine [Lévesque et al., 1998]. Il a également été proposé que les protéines de transition entraînent une compaction de l'ADN [Brewer et al., 2002]. Il semblerait également que la protéine TP1 stimule la réparation de l'ADN : elle pourrait donc participer à la réparation des cassures d'ADN qui apparaissent lors de la spermiogenèse [Caron et al., 2001]. De plus, la perte de l'une des deux TP diminue la fertilité mâle mais n'entraîne pas de stérilité complète chez la souris [Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001]. Toutefois, les mâles n'exprimant aucune protéine de transition sont stériles et présentent des spermatozoïdes dont la morphologie et la compaction de l'ADN sont défectueuses [Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004].

Chez la drosophile, Tpl94D, tHMG-1 et tHMG-2 sont des protéines à boîte HMG riches en arginine et en lysine (Table 3) [Rathke et al., 2007; Gärtner et al., 2015]. La temporalité de Tpl94D sur la chromatine diffère de celle de tHMG-1 et tHMG-2 : ces dernières sont présentes depuis le stade "spermatide ronde" jusqu'au stade "canoë" [Gärtner et al., 2015] tandis que Tpl94D n'apparaît que transitoirement sur

la chromatine : elle n'est présente qu'au stade "canoë", de manière concomitante avec l'apparition des cassures à l'ADN [Rathke et al., 2007] (Figure 7). Cependant, l'importance de Tpl94D n'est pas connue car il n'existe pas d'allèle mutant nul pour ce gène. Il a toutefois été montré que la délétion des 66 acides aminés en C-terminal de sa séquence protéique n'entraîne pas de phénotype particulier [Gärtner et al., 2015]. tHMG-1 et tHMG-2 forment des homodimères et des hétérodimères *in vivo* mais ne sont pas indispensables à la transition histone-protamine. Il semblerait qu'il y ait compensation de leur absence par la surexpression de *hmgz*, un homologue de *thmg-1/2* [Gärtner et al., 2015]. Étant donné la présence d'une boîte HMG chez les protéines de transition de la drosophile, il est possible que ces protéines puissent être responsables de la condensation de l'ADN spermatique et favoriser la réparation des dommages à l'ADN qui a lieu au stade canoë.

Enfin, les protéines de transition sont remplacées par les SNBPs, qui condensent fortement l'ADN. Cet évènement a lieu tardivement dans la spermiogenèse, alors que la transcription spermatidique a déjà cessé.

Les acteurs du remodelage chromatinien

Deux types d'acteurs interviendraient lors du remaniement de la chromatine spermatique : des "lecteurs" de chromatine, qui lieraient les histones modifiées et les remodeleurs chromatinien, qui seraient recrutés par les protéines "lectrices" pour remanier la chromatine.

Un exemple de lecteurs de chromatine sont les protéines à bromodomaines, qui peuvent se lier aux résidus lysine acétylés. Chez la souris, Brdt, une protéine spécifique des testicules contenant deux bromodomaines, est présente au niveau des noyaux des spermatides dont les histones sont acétylées [Gaucher et al., 2012; Berkovits and Wolgemuth, 2013]. Cette protéine est requise pour le bon déroulement de la spermatogenèse et pour la fertilité mâle. Elle joue deux rôles principaux : l'un avant la méiose, l'autre lors du remodelage de la chromatine. Avant la méiose, Brdt est essentielle pour la régulation de l'expression des gènes et pour le complètement de la méiose [Gaucher et al., 2012]. Lors du remodelage de la chromatine spermatique, elle est nécessaire pour l'enlèvement des nucléosomes. Les souris mâles homozygotes pour $Brd\Delta^{BD1}$, une délétion couvrant le premier bromodomaine, sont stériles, ce qui démontre l'importance de ce domaine pour la fonctionnalité de cette protéine [Shang et al., 2007]. L'absence de ce premier bromodomaine compromet l'enlèvement des histones acétylées ainsi que l'incorporation des protéines de transition et des protamines au sein de la chromatine spermatique [Gaucher et al., 2012]. Cela suggère que ce domaine est nécessaire pour la fonction de réorganisation de la chromatine de Brdt. *In vitro*, les protéines Brdt de l'homme et du rat sont capables de réorganiser la chromatine contenant des histones H4 acétylées [Pivot-Pajot et al., 2003; Dhar et al., 2012]. Brdt interagit *in vitro* avec BAF57, un remodeleur d'histones, ce qui pourrait permettre l'éviction des histones *in vivo* [Dhar et al., 2012]. Ces histones sont ensuite dégradées par le protéasome, notamment *via* l'activateur du protéasome PA200 [Qian et al., 2013].

Chez *D. melanogaster*, les protéines tBRD-1 et tBRD-2 sont essentielles pour la production de spermatozoïdes matures [Kimura and Loppin, 2015]. Ces protéines

interagissent pour former un hétérodimère et leur localisation nucléaire est interdépendante. De plus, la localisation de tBRD-1 est dépendante de la présence d’histone H4 acétylée [Leser et al., 2012]. En l’absence de tBRD-1 ou de tBRD-2, des défauts de méiose et de maturation des spermatides apparaissent [Leser et al., 2012; Kimura and Loppin, 2015]. Lors de la méiose, des défauts de cytokinèse et de ségrégation chromosomiques sont visibles en l’absence de tBRD-1 ou de tBRD-2. De plus, dans le mutant *tbrd-1¹*, lors de l’élongation spermatidique, les noyaux des spermatides restent ronds au lieu d’acquies leur forme d’aiguille spécifique des spermatozoïdes [Leser et al., 2012]. Pourtant, malgré ces défauts majeurs, l’éviction des histones et l’incorporation des SNBPs a lieu normalement [Kimura and Loppin, 2015]. Les protéines tBRD-1 et tBRD-2 de drosophile assument donc le même rôle pré-méiotique que Brdt chez la souris, mais ne seraient pas des lecteurs de la chromatine spermatique.

La transition histones/SNBPs nécessite également des remodeleurs de la chromatine. Chez les mammifères, aucun remodeleur n’a été formellement identifié que ce soit pour l’éviction des histones ou pour l’incorporation des SNBPs. Toutefois, chez le rat, Smarca2 et Smarca4 et Smarce1/BAF57, des sous-unités du complexe SWI/SNF, sont exprimées dans les spermatides [Dhar et al., 2012]. De plus, comme précisé plus haut, BAF57 interagit *in vitro* avec Brdt, et pourrait donc jouer un rôle dans l’éviction des nucléosomes de la chromatine spermatidique [Dhar et al., 2012].

Quant à l’incorporation des protamines, il est possible que cette étape ne nécessite pas de chaperonnes chez les mammifères. En effet, une étude récente montre que la simple expression de *prm-1* humain dans une cellule somatique suffit à la protamination de l’ADN [Iuso et al., 2015].

Chez *D. melanogaster*, des études récentes ont permis d’identifier des protéines nécessaires à l’incorporation des protamine-like. Notamment, il a été montré que tNAP (également appelé Hanabi) et Nap1, des protéines de la famille des protéines Nap sont nécessaires pour la progression de la spermiogenèse [Kimura, 2013]. Ces protéines peuvent lier les histones et sont capables de remodeler la chromatine [Ito et al., 1996; Kimura, 2013]. Dans les mutants *Nap1^{ko1}* dont les mâles homozygotes sont stériles, l’élongation des spermatides semble normale mais des défauts surviennent lors de l’individualisation des spermatozoïdes, qui sont éliminés [Kimura, 2013]. Chez le mutant *Hanabi*, on observe la perte et la dispersion des spermatides ainsi qu’un défaut d’élongation nucléaire [Kimura, 2013]. De plus, l’observation des histones à l’aide d’un transgène H2Av-RFP révèle un défaut d’éviction des histones [Kimura, 2013]. Toutefois, cette donnée a été réfutée par [Doyen et al., 2015] et par des observations internes à l’équipe : l’immunomarquage des histones endogènes a montré que l’éviction des histones se déroule normalement chez le mutant *Hanabi*. Le défaut observé dans [Kimura, 2013] était dû à l’observation d’histones transgéniques et non pas des histones endogènes.

Toutefois, l’étude [Doyen et al., 2015] présente une autre différence marquante par rapport à l’étude [Kimura, 2013] : [Doyen et al., 2015] montre qu’en diminuant la quantité de tNAP par ARN interférence (ARNi), les SNBPs Mst35Ba, Mst35Bb et Mst77F endogènes ne sont pas incorporées stablement dans la chromatine spermatique alors que dans le mutant *Hanabi*, la protéine transgénique Mst35Bb-GFP est présente dans la chromatine des spermatozoïdes matures. Cette différence pourrait être expliquée par le fait que Mst35Bb-GFP ne récapitule pas complètement

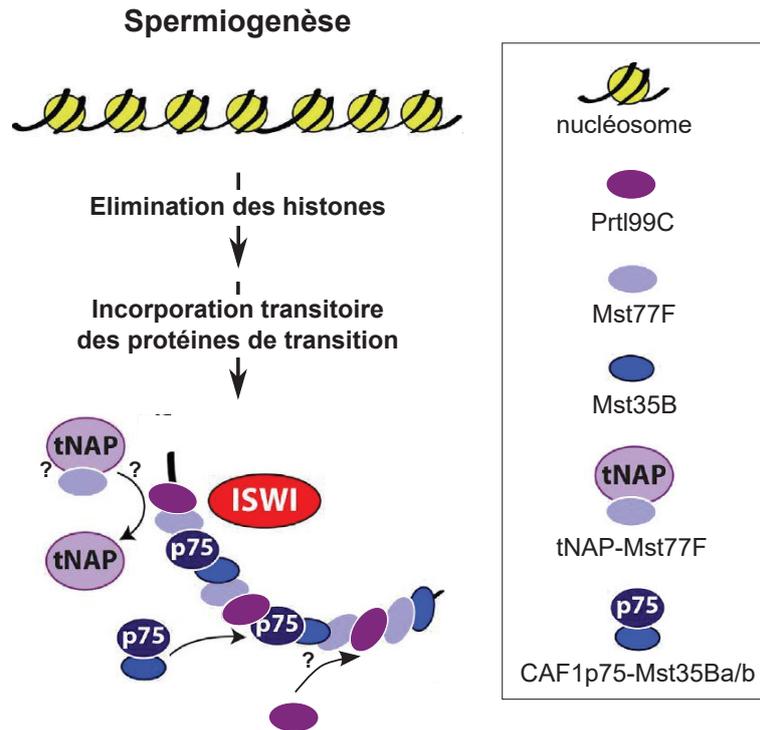


FIGURE 8. ISWI, CAF1p75 et tNAP seraient responsables de l'incorporation stable des SNBPs dans la chromatine spermatique. C. Doyen propose que tNAP soit la chaperonne de Mst77F tandis que la sous unité p75 de CAF1 serait celle de Mst35Ba et Mst53Bb. Étant donné la découverte très récente de Prtl99C, aucune chaperonne n'a été proposé pour cette dernière SNBP. ISWI serait également impliquée dans la compaction de la chromatine du spermatozoïde. Modifié d'après [Doyen et al., 2015].

la fonctionnalité et les propriétés de Mst35Bb endogène, mais pourrait également résulter des effets d'off-target de l'ARN interférence utilisé dans [Doyen et al., 2015]. Afin de trancher entre ces différents résultats, il serait nécessaire d'immunomarquer les SNBPs endogènes présentes dans le mutant *Hanabi*.

Cette même étude montre également qu'en ciblant l'ARNm de ISWI par ARNi, Mst77F n'est pas incorporée dans la chromatine spermatique [Doyen et al., 2015]. ISWI est une ATPase impliquée dans de nombreux complexes de remodelage de la chromatine [Corona and Tamkun, 2004]. Elle pourrait donc également être un remodeleur de la chromatine lors de la spermiogénèse. ISWI se localise au niveau du noyau spermatidique jusqu'à ce que l'incorporation des SNBPs soit complète. Dans le mutant *Iswi¹*, qui code pour une protéine ISWI tronquée, on observe une augmentation de la taille du noyau spermatique, ce que peut être interprété comme un défaut de condensation de la chromatine. ISWI serait donc nécessaire à la fois pour l'incorporation stable des SNBPs, mais également pour la compaction de la chromatine spermatique [Doyen et al., 2015].

CAF-1 est une chaperonne d'histone H3/H4 qui permet l'assemblage des nucléosomes lors de la réplication de l'ADN et est composée de quatre sous-unités : p180, p105, p75 et p55 [Tyler et al., 2001]. Selon [Doyen et al., 2013], la sous-unité p75

du complexe CAF-1 serait responsable de l'incorporation des SNBPs Mst35Ba et Mst35Bb au sein de la chromatine des spermatozoïdes.

Ainsi, dans le modèle proposé dans [Doyen et al., 2015] (Figure 8), tNAP/Hanabi serait responsable de l'incorporation de Mst77F tandis que Mst35Ba et Mst35Bb seraient prises en charge par la sous-unité p75 de CAF-1. Par contre, pour moment, aucune chaperonne de Prtl99C n'a été identifiée.

La mise en place des ponts disulfures entre les SNBPs

Chez les mammifères, une fois que le remodelage de la chromatine a eu lieu, des ponts disulfures sont créés entre les cystéines des différentes SNBPs. Chez la souris, cette étape a lieu dans l'épididyme, un canal qui recouvre la partie postérieure du testicule et où a lieu la maturation des spermatozoïdes. La mise en place des ponts disulfures implique une protéine à activité oxydoréductrice : snGPx4 (sperm nuclei Glutathione Peroxidase 4) [Pfeifer et al., 2001; Conrad et al., 2005; Noblanc et al., 2012]. En effet, les spermatozoïdes collectés au niveau de la tête de l'épididyme de mâles *snGPx4*^{-/-} présentent une moindre compaction de leur chromatine comparée à des spermatozoïdes au même stade issus de souris sauvages. Toutefois, si les spermatozoïdes sont collectés dans la queue de l'épididyme, c'est à dire à la fin de leur maturation, aucune différence n'est visible, ce qui suggère qu'il y a une compensation pour la perte de snGPx4 chez les mâles mutants.

Chez la drosophile, aucune démonstration de la présence de ponts disulfures entre les protamine-like et des mécanismes régissant leur établissement lors de la spermiogenèse n'a été faite. Toutefois, la richesse des SNBPs en résidus cystéine supporte l'hypothèse que des ponts disulfures stabilisent la chromatine spermatique. Il n'y a pas d'équivalent de l'épididyme chez la drosophile. Toutefois, ces liaisons pourraient apparaître à l'issue du remodelage de la chromatine, c'est-à-dire juste avant le stockage des spermatozoïdes dans la vésicule séminale.

3.2 La spermatogenèse chez la drosophile

3.2.1 Organisation de l'appareil reproducteur mâle

L'appareil reproducteur mâle (Figure 9) est localisé dans l'abdomen de l'animal. Il se compose d'une paire de testicules spiralés qui se terminent chacun sur une vésicule séminale, l'organe de stockage des spermatozoïdes matures. Ces organes sont reliés au canal éjaculatoire par la *vasa deferentia*. Deux glandes accessoires, qui sécrètent le fluide séminal, sont également reliées au canal éjaculatoire. Les spermatozoïdes sont libérés depuis les vésicules séminales dans ce canal et des contractions propulsent les gamètes jusque dans le bulbe.

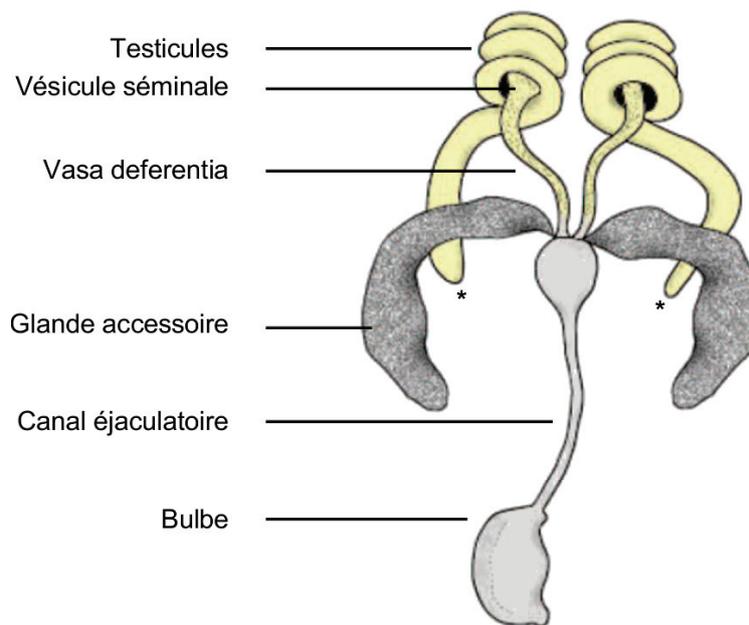


FIGURE 9. **Organisation de l'appareil reproducteur mâle chez la drosophile.** * : Apex du testicule. Modifié d'après [Schnakenberg et al., 2012].

3.2.2 Les étapes cytologiques de la spermatogenèse

Ce paragraphe est inspiré des sources suivantes : [Fuller, 1993; Fabian and Brill, 2012; Rathke et al., 2014].

On estime que la spermatogenèse dure 250h chez *D. melanogaster*. Les cellules germinales, organisées en cystes qui vont subir ces différentes étapes, progressent le long de l'axe du testicule depuis l'apex vers la vésicule séminale (Figure 10, (A)).

Durant la phase proliférative, au niveau de l'apex testiculaire, les cellules germinales (GSC, pour Germline Stem Cells) sont en contact proche avec les cellules somatiques du Hub, qui forment la niche nécessaire au maintien de l'identité et de la totipotence des GSC. La division asymétrique d'une GSC produit une GSC fille

qui reste au contact des cellules somatiques du Hub ainsi qu'une cellule spermatogoniale. Cette dernière va migrer hors de la niche des GSC et entamer sa différenciation. La spermatogonie va subir quatre mitoses successives sans cytokinèse suivies d'une phase de croissance pendant environ 90h, donnant ainsi naissance à un cyste de 16 spermatocytes primaires interconnectés par des ponts cytoplasmiques. C'est au cours de cette phase de croissance que sont synthétisés la majorité des produits nécessaires à la spermiogenèse.

À la fin de la phase de croissance, les 16 spermatocytes primaires vont subir la première division de la méiose, produisant ainsi 32 spermatocytes secondaires, puis la deuxième division de la méiose, conduisant ainsi à la formation d'un cyste de 64 spermatides haploïdes reliées par des ponts cytoplasmiques.

Enfin, ces spermatides vont maturer en spermatozoïdes. Cette étape, appelée spermiogenèse, dure 90 h chez la drosophile et s'accompagne d'un profond remaniement de la forme de la cellule gamétique (Figure 10, (B)). Tout d'abord, les mitochondries s'aggrègent et fusionnent pour former le nebenkern. Le nebenkern est constitué de deux dérivés mitochondriaux enroulés l'un autour de l'autre. Les centrioles paternels s'intègrent dans l'enveloppe nucléaire et forment le corps basal. À l'opposé du corps basal, le futur acrosome se forme à partir de l'appareil de Golgi. Ensuite, les cystes vont se polariser : les noyaux se localisent à une extrémité tandis que les flagelles des spermatides s'allongent de l'autre côté. La forme du noyau spermatique évolue également au cours de la spermiogenèse (Figures 10) : à l'issue de la méiose, les spermatides contiennent un noyau sphérique d'environ $5 \mu\text{m}$ de diamètre. Durant la spermiogenèse, le noyau s'allonge et prend la forme d'une aiguille qui mesure $10 \mu\text{m}$ de longueur à la fin de la spermatogenèse. C'est au cours de cette ultime étape de la spermatogenèse que la chromatine spermatique va subir un profond remodelage.

À la fin de la spermatogenèse, les spermatozoïdes vont s'individualiser. Cette étape nécessite la formation d'un complexe d'individualisation composé de 64 cônes d'actine péri-nucléaires. Ce complexe glisse le long des spermatozoïdes vers l'extrémité du flagelle et élimine les organelles et le cytoplasme superflus. Les spermatozoïdes matures sont alors stockés dans la vésicule séminale.

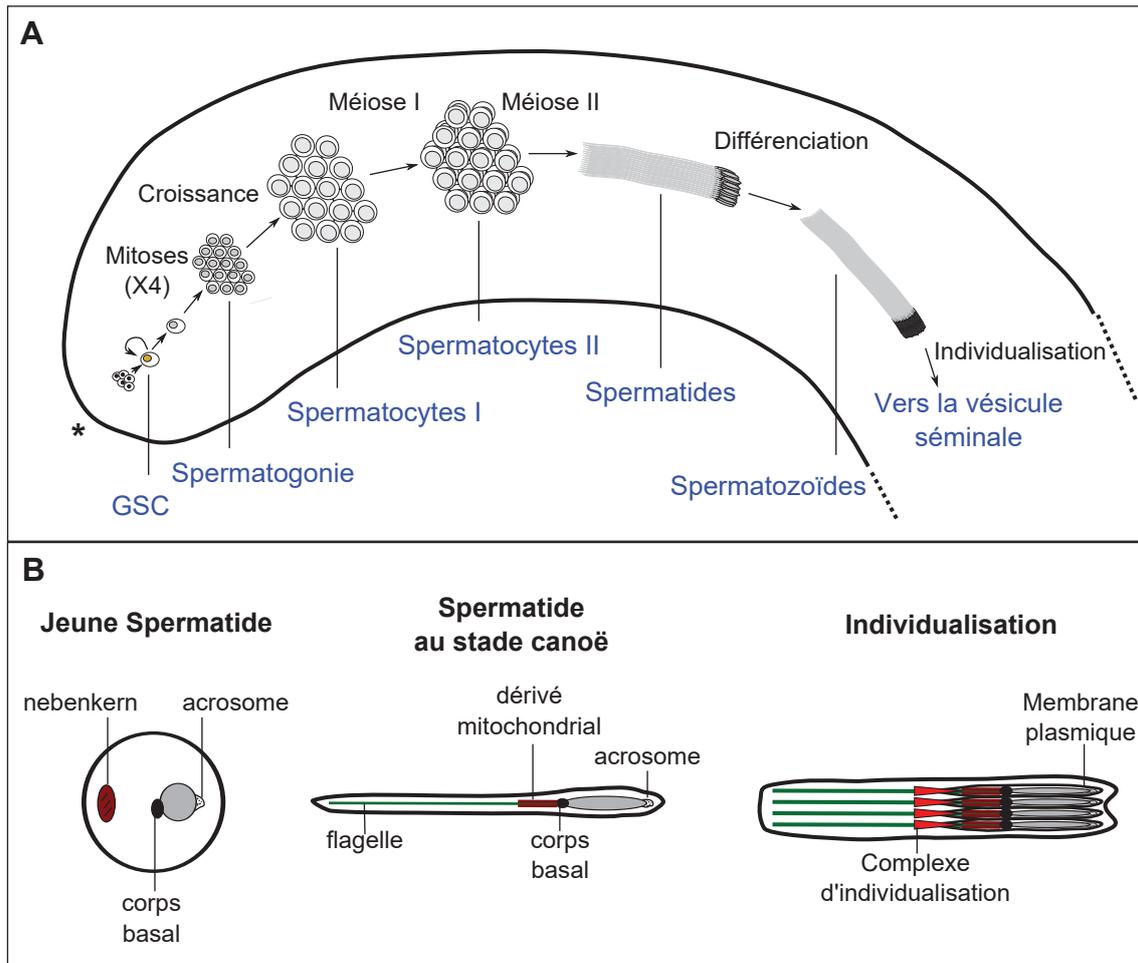


FIGURE 10. **La spermatogenèse chez la drosophile.** (A) Les étapes de la spermatogenèse. Les cellules gamétiques sont organisées en cystes et progressent depuis l’apex du testicule vers la vésicule séminale. Les cellules souches germinales (GSC) situées vers l’apex testiculaire subissent une division asymétrique, produisant une spermatogonie et une autre cellule souche. * : Apex testiculaire. Modifié d’après [Dubruille and Loppin, 2015]. (B) Schéma de quelques étapes de la différenciation des spermatides. Une fois passée la méiose, les spermatides vont subir de nombreux changements morphologiques pour aboutir à la formation de gamètes mâles matures qui seront stockés dans la vésicule séminale. Inspiré de [Fabian and Brill, 2012].

4 Le déroulement de l'ovogenèse

Cette partie est basée sur les ouvrages suivants : [Spradling, 1993; Bastock and St Johnston, 2008].

4.1 Organisation de l'appareil reproducteur femelle

La Figure 11, (A) présente un schéma de l'anatomie de l'appareil reproducteur femelle, qui se situe dans l'abdomen. Un ovaire typique se compose de 16 ovarioles environ. À l'extrémité de chaque ovariole, on trouve le germarium, qui contient les cellules souches germinales. Les chambres d'œufs quittent le germarium et se développent tout en se déplaçant le long de l'ovariole. Généralement, chaque ovariole se compose de 6 à 7 chambres d'œufs, qui sont de plus en plus matures au fur et à mesure que l'on se rapproche de la partie postérieure de l'ovariole. Les deux ovaires aboutissent chacun sur un oviducte latéral qui se réunissent en un oviducte commun. Les œufs sont activés dans l'oviducte commun avant de passer dans l'utérus, où a lieu la fécondation. À l'extrémité antérieure de l'utérus, on trouve les ouvertures des canaux des spermathèques et du réceptacle séminal. Ce sont les organes de stockage des spermatozoïdes de la femelle, qui libèrent les spermatozoïdes qui vont féconder l'œuf lors de son passage dans l'utérus. Deux petites glandes accessoires sont également connectées à l'utérus et produisent notamment des substances intervenant dans la lubrification des œufs.

4.2 Les étapes de l'ovogenèse

Dans le germarium, les cellules souches se divisent de manière asymétrique, créant ainsi une nouvelle cellule souche et un cystoblaste. Ce cystoblaste se divise 4 fois sans que la cytokinèse ne soit complète : les cellules filles restent interconnectées. Parmi les 16 cellules cystes ainsi produites, une cellule devient l'ovocyte tandis que les 15 autres forment les cellules nourricières. La chambre d'œuf, qui est constituée de ces 15 cellules nourricières et de l'ovocyte, est entourée de cellules folliculaires (Figure 11, (B)).

Avant la sortie du germarium, le futur ovocyte entame la méiose mais reste bloqué en métaphase de méiose I. Après la sortie du germarium, la chambre d'œuf croît tandis que les cellules folliculaires se multiplient. Alors que l'expression génique est réprimée dans l'ovocyte, les cellules nourricières entament une série d'endoréplication de leur matériel génétique et synthétisent les nutriments, les protéines et les ARN qui seront nécessaires à l'embryogenèse.

À la fin du stade 10, les cellules nourricières déversent leur contenu cytoplasmique dans l'œuf (Figure 11, (B)) et meurent par apoptose tandis que les cellules folliculaires migrent pour entourer l'ovocyte. Elles sécrètent la membrane vitelline et le chorion qui protègent l'ovocyte mature (stade 14).

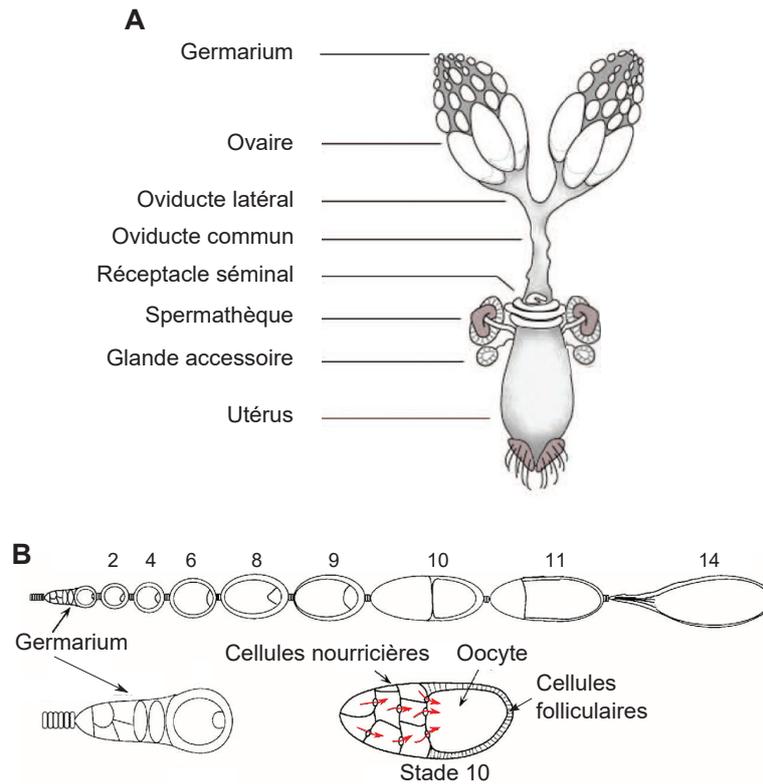


FIGURE 11. **Déroulement de l'oogenèse chez la drosophile.** (A) Organisation de l'appareil reproducteur femelle chez la drosophile. Modifié d'après [Schnakenberg et al., 2012]. (B) Détail d'un ovariole. La chambre d'œuf est formée dans le germarium et en émerge au stade 2. Ensuite la chambre d'œuf croît et mûrit jusqu'au stade 10 où les cellules nourricières transfèrent leur contenu cytoplasmique dans l'ovocyte. Enfin, au stade 14, l'œuf mûr est enveloppé de son enveloppe vitelline et de son chorion et est prêt pour la fécondation. Modifié d'après [Robinson and Cooley, 1997].

5 Fécondation et embryogenèse

5.1 Les différentes étapes du remodelage de la chromatine paternelle lors de la fécondation

La phase de remodelage de la chromatine paternelle est cruciale pour la suite du déroulement de l'embryogenèse. Pourtant, malgré son importance, les mécanismes qui en sont responsables sont assez mal connus, que ce soit chez les mammifères ou chez la drosophile. La Figure 12 résume les connaissances actuelles.

On peut séparer le remodelage de la chromatine paternelle en deux grandes phases : l'éviction des SNBPs et l'assemblage de la chromatine paternelle à l'aide d'histones fournies par l'ovocyte.

5.1.1 L'éviction des SNBPs

Réduction des liaisons disulfures

Chez les mammifères, le noyau spermatique est stabilisé à l'aide de ponts disulfures formés entre les résidus cystéines des protamines. La première étape de la décondensation du noyau spermatique consiste donc à réduire ces liaisons disulfures. Il a été proposé que cette réduction soit prise en charge par la molécule de glutathion. Le glutathion est un tripeptide présent chez tous les animaux. Il est formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine et a un fort potentiel réducteur. Des travaux chez le hamster et chez les bovins ont montré que si l'on bloque la synthèse de glutathion, le noyau mâle ne se décondense pas [Perreault et al., 1988; Sutovsky and Schatten, 1997]. De plus, ce défaut de décondensation peut être compensé par un traitement des spermatozoïdes avant leur injection dans l'ovocyte au dithiothréitol (DTT), une petite molécule qui a un très fort pouvoir réducteur. Enfin, des études chez le cochon ont montré l'existence d'une corrélation positive entre le niveau de glutathion dans l'ovocyte et le taux de décondensation des noyaux mâles [Yoshida et al., 1993]. Grâce à ce faisceau de preuves, il est communément admis que le glutathion est l'agent réducteur des liaisons disulfures reliant les protamines chez les mammifères. Toutefois, il est possible que le glutathion n'ait qu'un effet indirect sur la rupture des ponts disulfures. De manière intéressante, une étude chez le cochon a récemment bousculé l'idée que le glutathion réduise les ponts disulfures spermatiques : les auteurs proposent que PDIA3, une protéine associée aux disulfides isomérases, soit nécessaire à la réduction de ces ponts disulfures [Li et al., 2014]. Dans cette étude, les auteurs bloquent l'activité de PDIA3 dans des ovocytes fécondés grâce à l'injection d'un anticorps spécifique de cette protéine et observent une décondensation du noyau spermatique moins fréquente. Toutefois, aucune preuve montrant l'action directe de PDIA3 sur le noyau spermatique n'est fournie.

Prise en charge des SNBPs

Chez les mammifères, une fois les liaisons disulfures rompues, les protamines seraient prises en charge par des molécules acceptrices de SNBPs. Chez l'homme, il a été montré que l'héparane sulfate, une glycosaminoglycane, facilite la décondensation du noyau spermatique *in vitro* [Caglar et al., 2005; Julianelli et al., 2012]. De plus,

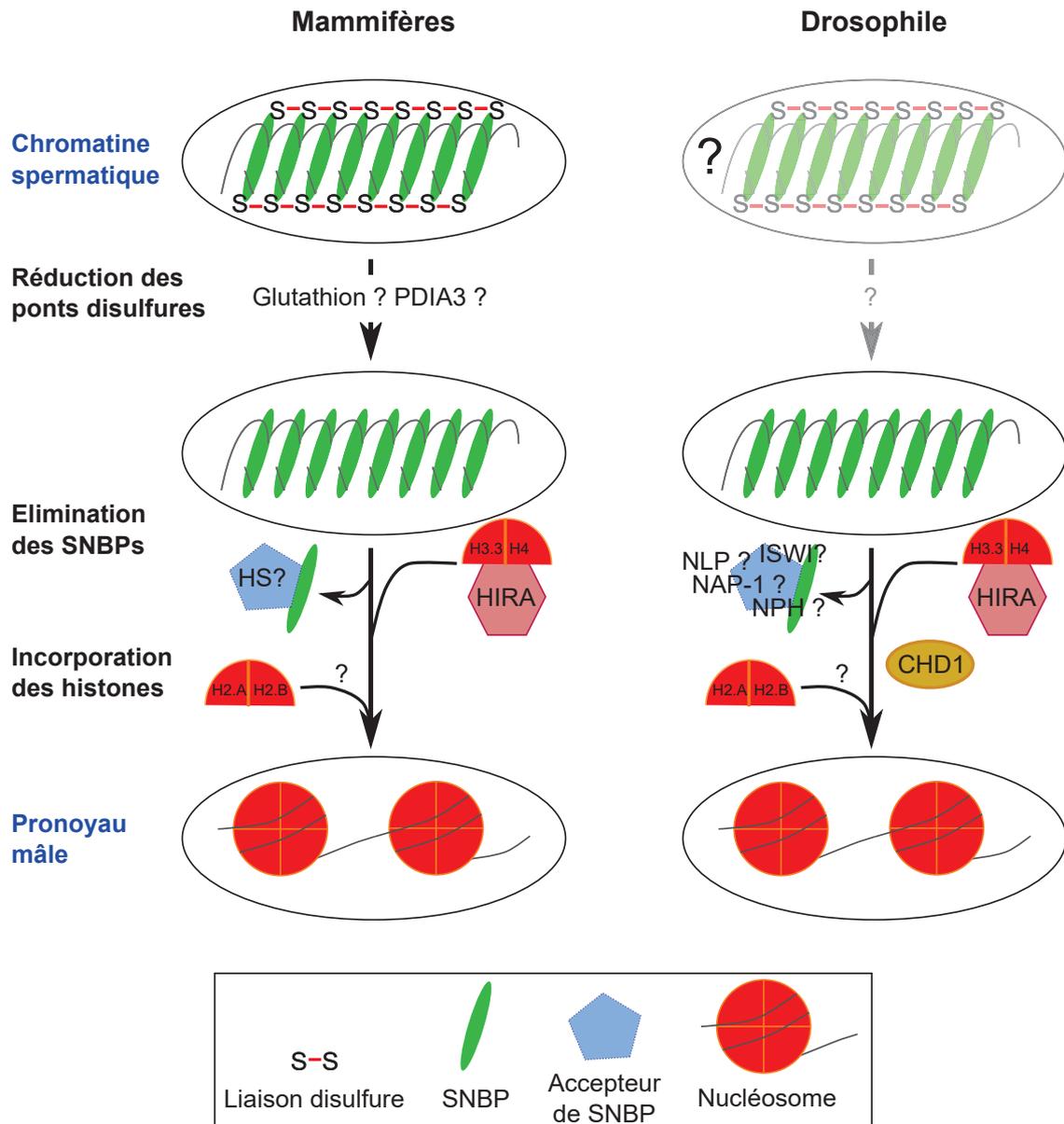


FIGURE 12. **Le remodelage de la chromatine mâle lors de la fécondation.** Le remodelage de la chromatine mâle lors de la fécondation est assez similaire chez les mammifères et la drosophile. Il implique la réduction des ponts disulfures qui relient les SNBPs, l'éviction de ces dernières par des protéines acceptrices et la réincorporation des nucléosomes par des chaperonnes d'histones. HS : Héparane sulfate.

cette molécule est présente dans les ovocytes de souris [Romanato et al., 2008], ce qui suggère qu'elle pourrait être la molécule acceptrice des protamines *in vivo*.

Chez la drosophile, étant donné que l'étape d'éviction des SNBPs du noyau spermatique est un processus extrêmement rapide qui a lieu à l'intérieur de l'utérus, il est assez difficile d'étudier les processus d'enlèvements des protamine-like. Toutefois, des tentatives pour comprendre les mécanismes et les partenaires impliqués

dans l'enlèvement des SNBPs ont été entreprises *in vitro* à l'aide de sperme de xénope et d'extraits d'œufs de xénope et de drosophile [Philpott et al., 1991; Philpott and Leno, 1992; Kawasaki et al., 1994]. Ces études mettent en évidence le rôle de la nucléoplasmine dans le remodelage chromatinien du spermatozoïde de Xénope. Dans [Philpott et al., 1991], les auteurs incubent des spermatozoïdes de xénope dans des extraits protéiques embryonnaires de xénope. Ils remarquent que lorsque l'extrait protéique est déplété en nucléoplasmine, la décondensation du noyau spermatique est beaucoup plus lente. Par contre, lorsque les noyaux sont incubés dans une solution de nucléoplasmine purifiée, la dynamique de décondensation *in vitro* est normale. Afin d'essayer d'identifier la protéine responsable de la décondensation du noyau spermatique chez la drosophile, des noyaux spermatiques de xénope ont été incubés dans des extraits d'embryons de drosophile [Kawasaki et al., 1994]. Cette étude identifie la protéine p22/NLP, l'homologue de la nucléoplasmine.

Cependant, on ne peut pas conclure sur l'implication de NLP dans le remodelage de la chromatine chez *D. melanogaster* car le noyau spermatique du xénope ne possède pas la même organisation. En effet, contrairement à la drosophile où la quasi-totalité des histones sont remplacées par des SNBPS, chez le xénope, seules les histones H2A et H2B sont échangées avec des SNBPs. Chez la drosophile, NLP est nécessaire au regroupement des centromères [Padeken et al., 2013] mais son implication directe dans le remodelage de la chromatine spermatique n'a pas été démontrée. Seule une étude *in vitro* rapporte que NLP coopère avec NAP-1 (une chaperonne d'histones), NPH (la nucléophosmine, un paralogue de NLP) et TAP/p32 (un homologue de Mam33, une protéine mitochondriale de la levure) pour décondenser l'ADN spermatique [Emelyanov et al., 2014]. Cette étude montre que NAP-1, NLP et NPH lient préférentiellement Mst35Ba tandis que TAP/p32 lie Mst35Bb. Toutefois, cette étude s'appuie principalement sur une reconstitution *in vitro* de la chromatine spermatique à l'aide d'ADN et des protéines Mst35Ba et Mst35Bb purifiées. Cela ne permet donc pas de conclure sur le rôle et la pertinence de ces protéines lors du remodelage de la chromatine paternelle *in vivo*.

Enfin, il a été proposé très récemment que le remodeleur de chromatine ISWI est nécessaire à l'éviction des SNBPs de la chromatine mâle [Doyen et al., 2015]. Chez les femelles *Iswi*¹, on observe un délai de l'éviction des protamine-like lors de la fécondation et des défauts de mitose, ce qui suggère que ISWI serait impliquée dans le remodelage de la chromatine spermatique à la fécondation et plus précisément dans l'éviction des SNBPs.

5.1.2 Le réassemblage d'une chromatine nucléosomée

L'équipe a énormément travaillé sur cette étape du remodelage de la chromatine paternelle, en tirant parti des souches de drosophile portant des mutations à effet maternel touchant cette étape.

Mon équipe a notamment montré que, chez la drosophile, l'incorporation des histones au sein de la chromatine mâle a lieu de manière indépendante de la réplication et est prise en charge par le complexe HIRA [Loppin et al., 2001, 2005; Bonnefoy et al., 2007]. La protéine Hira est une chaperonne du variant d'histone H3.3. Les femelles homozygotes mutantes pour ce gène sont stériles et pondent des œufs où le

noyau mâle se décondense mais n'incorpore pas d'histones.

Des membres de mon équipe ont également montré que la protéine Yemanuclein (YEM) fait partie du complexe HIRA et participe au remodelage de la chromatine paternelle [Orsi et al., 2013]. Dans des œufs pondus par les femelles homozygotes mutantes pour *yem*, le noyau mâle présente les mêmes défauts d'incorporation d'histones que les œufs issus de femelles mutantes pour *Hira*, ce qui démontre que YEM est essentiel pour la fonction du complexe HIRA et donc pour le réassemblage de la chromatine nucléosomée.

Il a récemment été démontré que le rôle du complexe HIRA été conservé chez les mammifères [Inoue and Zhang, 2014; Lin et al., 2014]. Chez les mammifères, le complexe HIRA se compose des protéines Hira, Ubinuclein 1 et Cabin 1 [Tagami et al., 2004], où Ubinuclein 1 est apparenté à YEM tandis que Cabin 1 ne semble pas avoir d'orthologue chez *Drosophila melanogaster*.

Cependant, bien que l'on connaisse les mécanismes d'incorporation du dimère H3.3/H4, on ne sait pas comment les histones H2A et H2B sont prises en charge pour former les nucléosomes du noyau mâle chez les mammifères et chez la drosophile.

Enfin, afin de former une chromatine paternelle fonctionnelle, l'incorporation des histones est nécessaire mais n'est pas suffisante. CHD1, un moteur moléculaire, est également impliqué dans la formation du pronoyau femelle chez *D. melanogaster* [Konev et al., 2007]. Il a été montré *in vitro* que CHD1 permet d'assembler la chromatine et d'espacer les nucléosomes [Lusser et al., 2005]. Cependant, dans les œufs pondus par des femelles homozygotes mutantes pour *Chd1*, le noyau mâle incorpore des histones mais ne se décondense pas complètement et ne participe pas à la mitose, conduisant à la formation d'embryons haploïdes gynogénétiques [Konev et al., 2007]. Il a donc été proposé que, *in vivo*, CHD1 soit nécessaire à l'espacement des nucléosomes nouvellement formés au sein de la chromatine paternelle [Orsi et al., 2009].

5.2 Les événements de la fécondation et de l'embryogenèse précoce chez la drosophile

5.2.1 Entrée du spermatozoïde et activation de l'ovocyte

La fécondation est interne chez *Drosophila melanogaster*. Elle a lieu dans l'utérus de la femelle : les spermatozoïdes, stockés dans les spermathèques et le réceptacle séminal, sont libérés dans l'utérus [Foe et al., 1993]. Un spermatozoïde va entrer dans l'œuf par le micropyle et le féconder. Comme décrit précédemment, l'ovocyte est bloqué en métaphase de méiose I et est activé, non pas par l'entrée du spermatozoïde, mais lors de son passage dans l'oviducte maternel par une vague de calcium [Foe et al., 1993; Kaneuchi et al., 2015; York-Andersen et al., 2015]. Cette activation va déclencher la reprise de la méiose, affecter les réserves maternelles d'ARNm et de protéines et modifier l'organisation de la membrane vitelline et du chorion afin de préparer l'ovocyte au développement embryonnaire. Après son activation, l'œuf

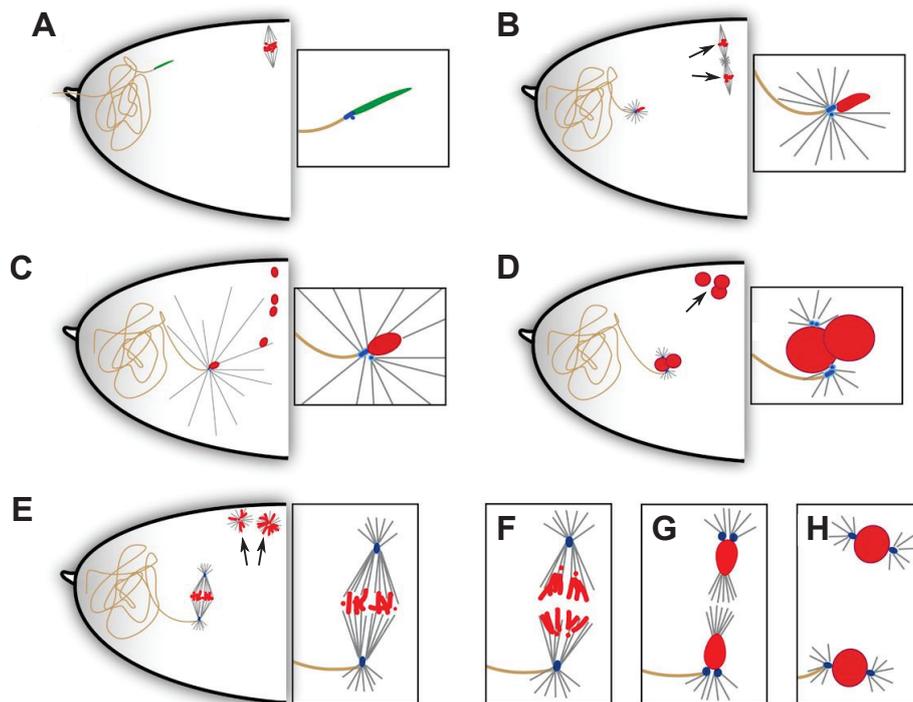


FIGURE 13. **La formation du zygote chez la drosophile.** (A) Entrée du spermatozoïde dans l'œuf. Au moment de la fécondation, les chromosomes maternels sont en métaphase de méiose I. L'ADN spermatique est encore compacté par les SNBPs (vert) et deux centrioles (bleu) sont visibles à la jonction entre le noyau en forme d'aiguille et le flagelle (jaune). (B) Les chromosomes femelles sont en métaphase de méiose II (flèches). La chromatine spermatique a subi un remodelage : les SNBPs ont été remplacées par des histones (rouge) et le noyau s'est décondensé. L'aster spermatique formé de microtubules (gris) commence à polymériser à partir des centrioles paternels. (C) Migration des pronoyaux. L'aster spermatique a atteint sa taille maximale et a capturé le noyau femelle le plus proche, qui deviendra le pronoyau femelle. (D) Apposition des pronoyaux mâle et femelle. Les centrosomes se sont dupliqués et les noyaux sont en phase S. Les trois noyaux femelles qui n'ont pas été capturés par l'aster spermatique restent à la périphérie de l'œuf et forment les globules polaires (flèche). (E) Métaphase de mitose I. Les globules polaires sont condensés et forment deux rosettes (flèche). (F) Anaphase de mitose I. (G) Télophase de mitose I. (H) Interphase de mitose II. Modifié et traduit d'après [Loppin et al., 2015].

est pondu par la femelle. C'est uniquement à partir de ce moment que l'ovocyte est accessible pour nos observations.

5.2.2 La formation du zygote

La Figure 13 résume les différents événements de la formation du zygote tandis que la Figure 14 présente les différents stades de la formation du zygote qui peuvent

être observés après récolte des œufs. Comme illustré dans la Figure 14, le stade observable le plus précoce est la métaphase de méiose II femelle, qui se déroule alors que le noyau spermatique a déjà été remodelé.

La fécondation est un événement extrêmement rapide chez *D. melanogaster*. En effet, la première division zygotique a lieu environ 15 min après l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte. [Foe et al., 1993]. Lorsque le spermatozoïde pénètre dans l'ovocyte, son génome est compacté à l'aide de SNBPs et son noyau présente la forme en aiguille qui est caractéristique du gamète mâle. À la jonction entre le noyau et le flagelle, se trouvent deux centrioles paternels. Puis le noyau mâle se décondense alors que la méiose femelle reprend. Lorsque l'œuf est pondu, les chromosomes femelles sont au stade métaphase de méiose II, alors que le noyau spermatique a déjà été remodelé : les SNBPs ont été remplacées par des histones fournies par l'ovocyte. De plus, la nucléation de l'aster spermatique au niveau des centrioles paternels commence. Cet aster spermatique, qui est ancré au flagelle, va permettre de capturer le pronoyau femelle, alors que la méiose se termine, et de l'amener jusqu'au pronoyau mâle. Les trois autres produits de la méiose femelle restent à la périphérie de l'œuf et formeront les globules polaires. L'ADN nucléaire est répliqué et les deux pronoyaux s'apposent. Les centrioles paternels se sont dupliqués et migrent de part et d'autre des pronoyaux. Enfin, la première division zygotique a lieu (pour une revue récente sur le déroulement de la fécondation, voir [Loppin et al., 2015]).

5.2.3 Le développement embryonnaire précoce

Durant les 13 premières divisions zygotiques, l'embryon de drosophile est syncytial, c'est-à-dire que les divisions nucléaires se déroulent sans division cellulaire. Cette période syncytiale peut être divisée en deux phases : le préblastoderme (cycles 1 à 9) et le blastoderme syncytial (cycles 10 à 13) [Foe et al., 1993] (Figure 15). Au cours des cycles préblastodermaux, les noyaux se divisent rapidement de manière synchrone. Au cycle 10, la majorité des noyaux migrent vers la surface de l'embryon : l'embryon est alors au stade blastoderme. Au cours de la phase de blastoderme syncytial, les divisions nucléaires sont moins rapides. Enfin le cycle 14 est le premier stade où l'on voit apparaître une longue interphase, qui dure 4 fois plus longtemps que les interphases précédentes [Foe et al., 1993]. C'est également l'étape de cellularisation de l'embryon.

Au cours du développement embryonnaire précoce, tous les éléments nécessaires au déroulement de l'embryogenèse sont présents dans les stocks apportés par l'ovocyte. En effet, il n'y a pas d'expression génétique durant les premières divisions zygotiques. La réactivation du génome zygotique (ZGA pour Zygotic Genome Activation) a lieu au stade 8 pour 59 gènes puis au stade 14 pour le reste des gènes dont l'expression est nécessaire à l'embryogenèse [De Renzis et al., 2007]. Cela implique que la formation du zygote, notamment le remodelage de la chromatine paternelle, et les premières divisions sont dépendantes de la présence de protéines fournies par l'ovocyte.

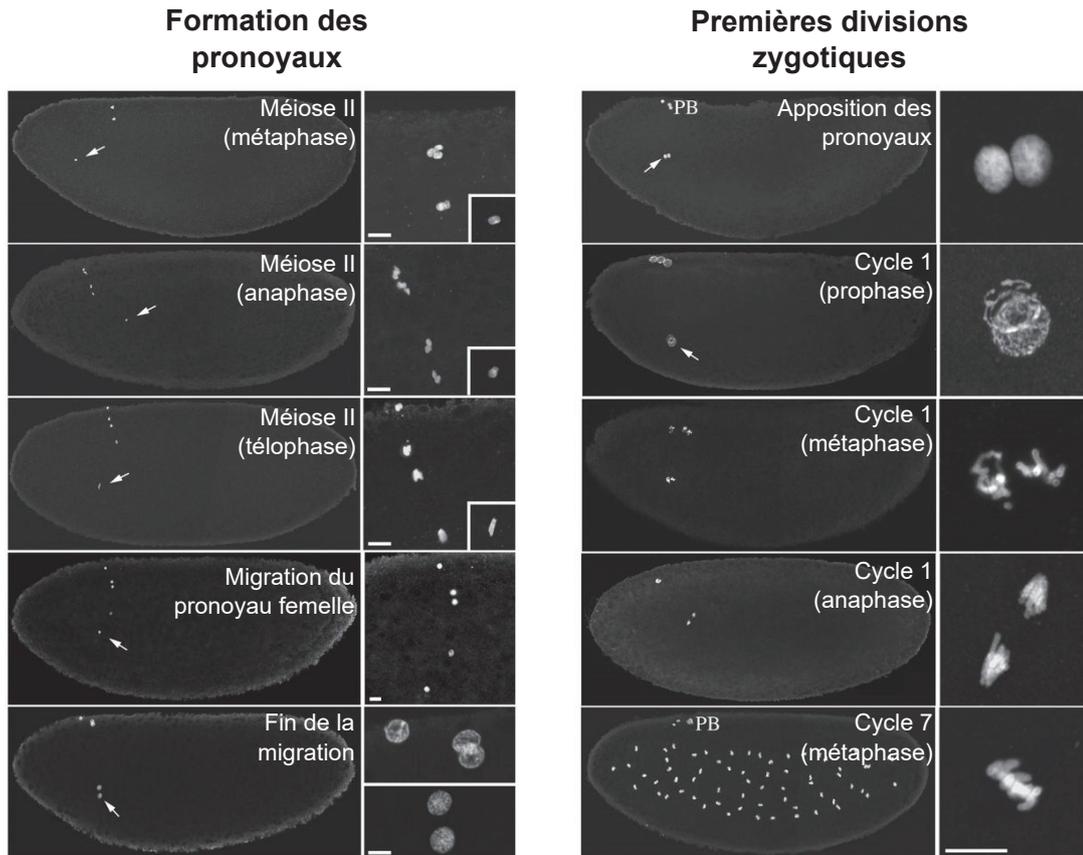


FIGURE 14. **La formation du zygote et le développement embryonnaire précoce.** Images confocales d'œufs et d'embryons de *D. melanogaster* aux stades indiqués. Les histones sont immunomarquées afin de visualiser les noyaux. Les panneaux de gauche illustrent la formation du zygote tandis que ceux de droite montrent la première mitose zygotique ainsi qu'une mitose 7. Pour chaque embryon, le détail des noyaux est présenté à droite de l'embryon. Les flèches indiquent le noyau mâle. PB : Globules polaires. Tiré de [Loppin et al., 2015].

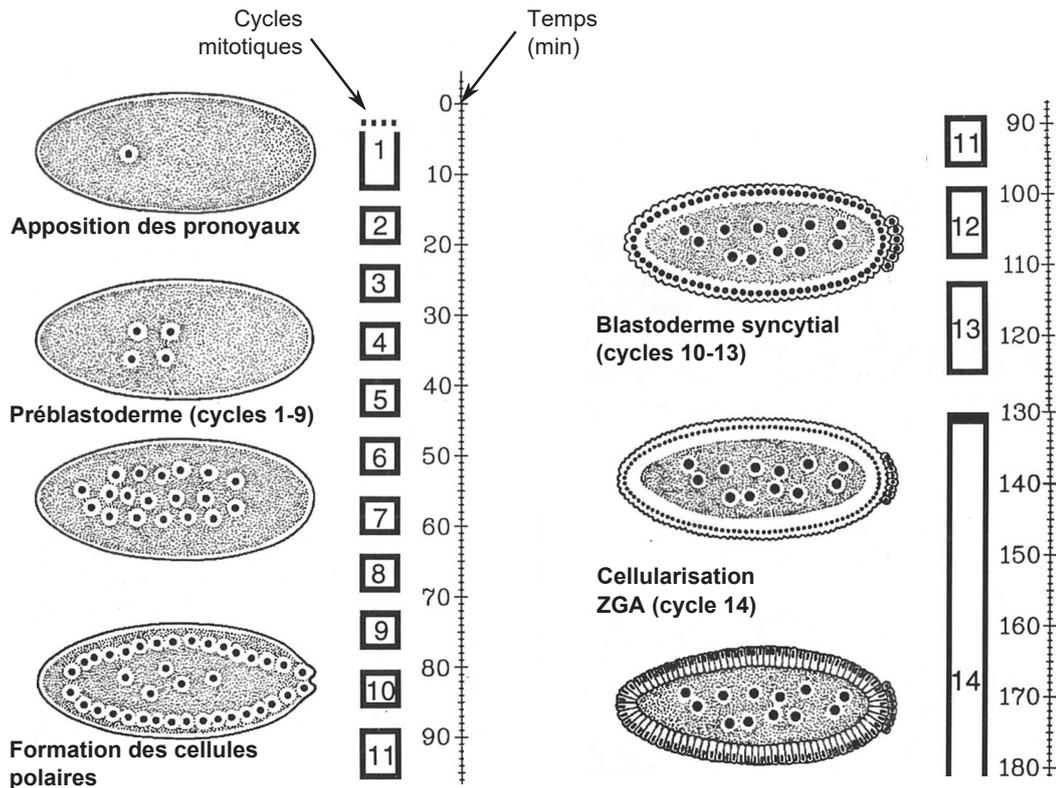


FIGURE 15. Les différentes phases du développement embryonnaire précoce. On peut appeler "développement embryonnaire précoce" les 14 premières mitoses qui précèdent la gastrulation. Cette période peut être divisée en deux grandes phases : la phase préblastodermale et le préblastoderme syncytial. Le stade 14 voit deux événements majeurs se produire : la cellularisation de l'embryon et l'activation de l'expression du génome zygotique (ZGA). Le temps de développement à 25°C est indiqué. Modifié d'après [Foe et al., 1993].

6 Importance des systèmes de maintien de l'homéostasie rédox

Chez tous les organismes aérobies, le maintien de l'homéostasie de l'état rédox des cellules est essentiel pour le bon déroulement de nombreux processus métaboliques, pour la signalisation et pour les processus transcriptionnels. Toute perturbation de la régulation de cette homéostasie va se traduire par un stress oxydant, qui est délétère pour l'organisme. De plus, nous avons vu précédemment que l'établissement et l'enlèvement des ponts disulfures de la chromatine spermatique nécessite l'intervention de molécules à potentiel oxydoréducteur. Cela souligne l'importance du contrôle du niveau rédox au sein des cellules ainsi que des acteurs au potentiel oxydoréducteur. Chez la plupart des organismes aérobies, ce maintien est pris en charge par deux grands systèmes : le système glutathion (GSH) et le système thiorédoxine (Trx).

6.1 Le glutathion

6.1.1 Synthèse et recyclage du glutathion

Le glutathion est un tripeptide (γ -Glu-L-Cys-L-Gly) conservé chez tous les organismes qui est extrêmement abondant dans les cellules. Cette molécule, découverte pour la première fois chez *E. coli*, existe sous deux formes : une forme réduite (GSH, le glutathion) et une forme oxydée (GSSG, le disulfure de glutathion) (Figure 16) [Meister and Anderson, 1983]. La voie de synthèse du glutathion est conservée entre les mammifères et la drosophile. Elle a lieu en deux étapes qui nécessitent de l'ATP [Lu, 2009]. L'étape (1) est l'étape limitante de la voie de synthèse du glutathion. Elle est catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL). L'étape (2) est quant à elle prise en charge par la glutathion synthase (GSH synthase).



Le glutathion oxydé, c'est à dire la molécule GSSG, peut être recyclé en deux molécules de glutathion réduit GSH. Chez les mammifères, cette réaction catalysée par la glutathion réductase (GR) [Meister and Anderson, 1983].



Toutefois, chez *D. melanogaster*, il n'existe pas de GR et ce recyclage du glutathion est pris en charge par le système thiorédoxine [Kanzok et al., 2001].

6.1.2 Rôles du glutathion

Contrôle du niveau de H₂O₂

Le GSH joue un rôle crucial comme antioxydant : il transforme les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, pour Reactive Oxygen Species) tel que le peroxyde d'hydrogène

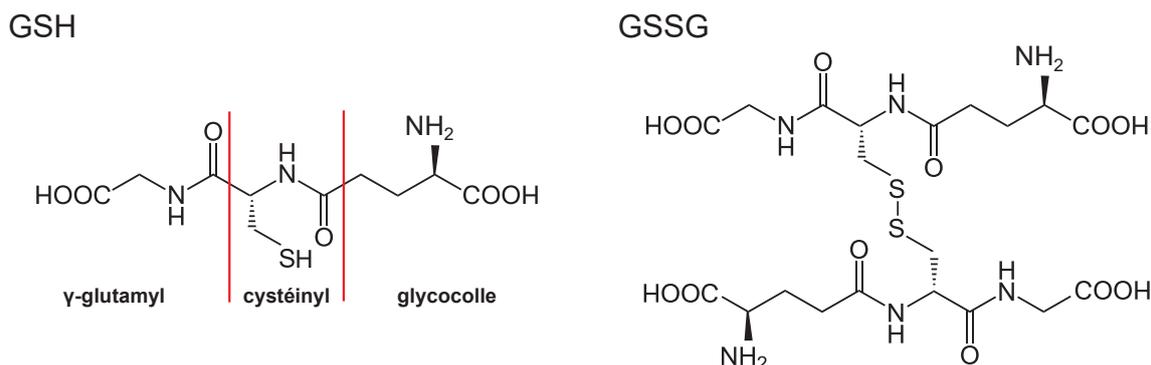


FIGURE 16. **Le glutathion.** Le glutathion est un tripeptide qui se présente sous deux formes : sa forme réduite (GSH, glutathion) et sous sa forme oxydée (GSSG, disulfure de glutathion).

H_2O_2 selon la réaction suivante, qui est favorisée par la glutathion peroxydase (GPx) [Meister and Anderson, 1983].



Réduction des ponts disulfure

Le GSH est une molécule clef pour le maintien du potentiel rédox des cellules, notamment en réduisant les liaisons disulfures qui relient deux groupements thiols portés par des protéines (pour une revue sur le glutathion, voir [Meister and Anderson, 1983]). Le GSH permet notamment de recycler les glutarédoxines (Grx) oxydées en Grx réduites. Ces protéines sont des oxidoréductases qui font partie de la machinerie de l'homéostasie rédox des cellules (pour une revue récente sur les glutarédoxines, voir [Lillig et al., 2008]).

6.2 Le système thiorédoxine

6.2.1 Présentation des thiorédoxines

Les thiorédoxines (Trx) ont initialement été identifiées chez *E. coli* et sont des protéines extrêmement conservées. On les retrouve chez la plupart des êtres vivants procaryotes et eucaryotes [Lu and Holmgren, 2014]. Les thiorédoxines sont de petites protéines dont le poids moléculaire est généralement autour de 12 kDa. La structure de ces protéines est très conservée : elles sont formées de cinq feuillets β qui composent la partie centrale de la protéine et de quatre hélices α qui entourent le cœur formés par les feuillets (Figure 17) [Collet and Messens, 2010]. Elles possèdent un site catalytique dont la séquence WCGPCK est très conservée et qui leur permet de réduire les ponts disulfures portés par des protéines selon le mécanisme présenté dans la Figure 18 [Collet and Messens, 2010]. La protéine Trx oxydée qui résulte de la réduction d'un pont disulfure, est réduite par la Thiorédoxine Réductase (TrxR) en utilisant une molécule de NADPH (la forme réduite du Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, un coenzyme associé à des oxydoréductases) (Figure 19) [Lu and Holmgren, 2014].

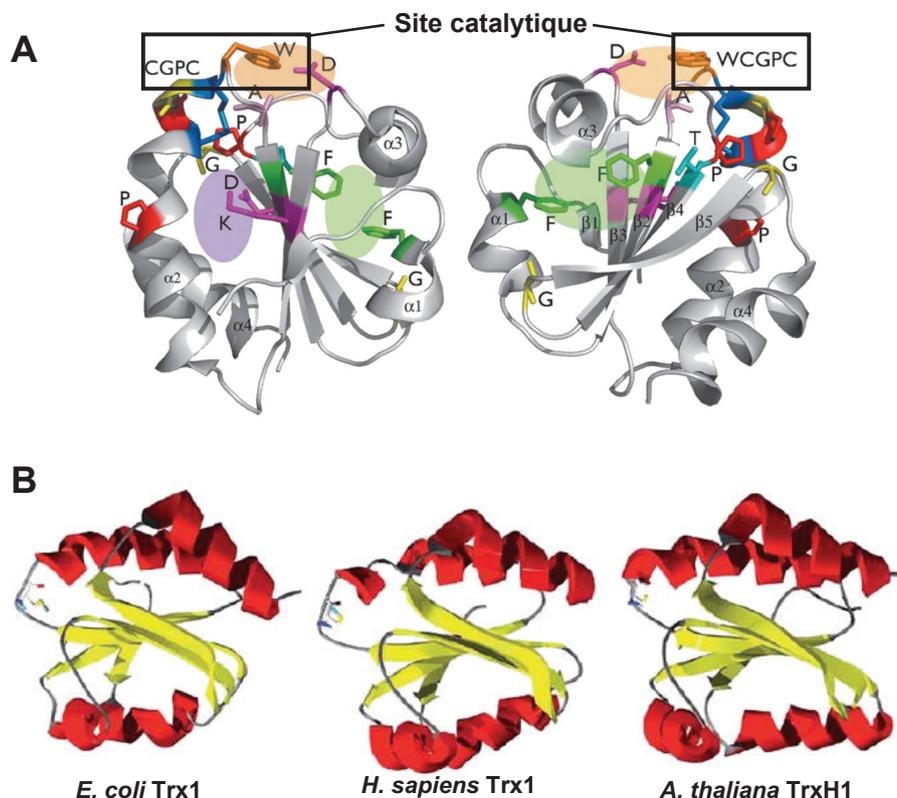


FIGURE 17. **Structure et conservation des thiorédoxines.** (A) Structure des thiorédoxines. Le site catalytique (encadré noir) est situé au cœur de la protéine. Les résidus conservés sont représentés en bâton : tryptophane (orange), résidus chargés (violet), cystéines (bleu), glycine (jaune), phénylalanine (vert) et proline (rouge). Les zones colorées indiquent la région hydrophobe (vert), la région chargée (violet) et la zone structurée exposée de la protéine (orange). La structure est montrée de deux points de vue différents. Tiré de [Collet and Messens, 2010]. (B) La structure des thiorédoxines est extrêmement conservée. Modifié d'après [Berndt et al., 2015].

Les Trx sont impliquées dans de nombreux et très divers processus cellulaires. En effet, chez tous les organismes, elles sont notamment impliquées dans la synthèse d'ADN comme donneur d'hydrogène pour la ribonucléotide réductase, mais également dans la réparation de protéines. Chez les animaux, elles permettent entre autre la régulation de facteurs de transcription comme NF κ B ou AP-1, et jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose (pour une revue complète sur les fonctions des thiorédoxines, voir [Arnér and Holmgren, 2000]).

Toutefois, chaque membre de cette famille a des substrats spécifiques. La manière dont la reconnaissance des substrats a lieu est très mal connue. Il a été supposé que la reconnaissance du substrat par la thiorédoxine soit due à la complémentarité des surfaces des deux protéines [Maeda et al., 2006]. Cependant, une étude récente va plus loin et propose que leur spécificité soit due à la fois à la complémentarité

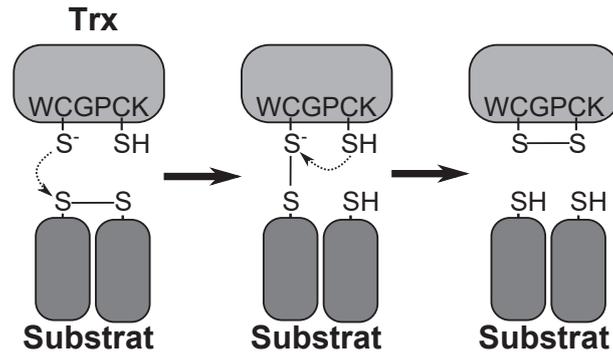


FIGURE 18. **Mécanisme d'action des thiorédoxines.** La cystéine en N-terminal du site catalytique est responsable de l'attaque nucléophile de la liaison disulfure portée par protéine cible. Cette attaque donne naissance à un complexe formé par la thiorédoxine et sa cible, qui sont liées de manière covalente par un pont disulfure. Ce complexe est résolu par l'attaque nucléophile de la seconde cystéine, ce qui permet la libération de la cible réduite et de la thiorédoxine oxydée. Trx : Thiorédoxine.

des surfaces des Trx et de leurs cibles, mais également à celle de leurs champs électrostatiques [Berndt et al., 2015].

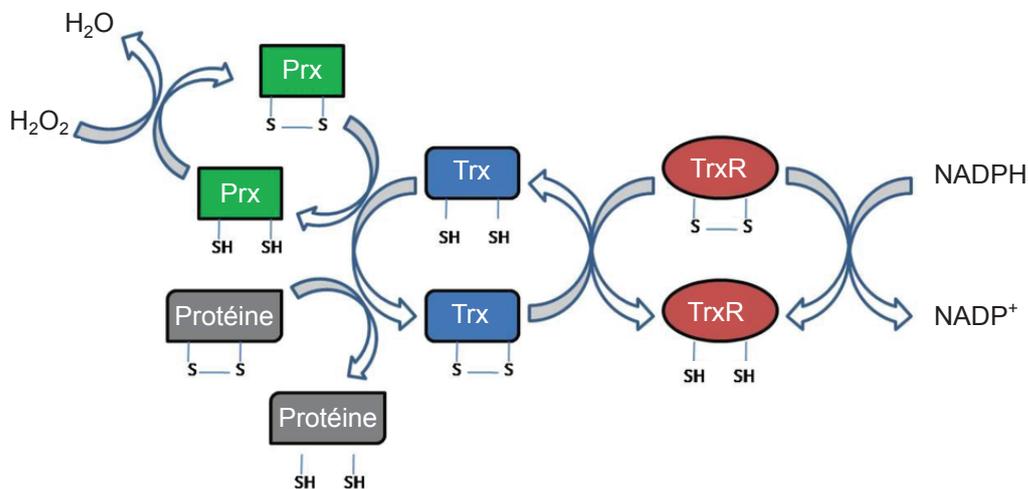


FIGURE 19. **Le système thiorédoxine.** Prx : Peroxirédoxine, Trx : Thiorédoxine, TrxR : Thiorédoxine Réductase. Modifié d'après [Karlenius and Tonissen, 2010].

6.2.2 Rôle des thiorédoxines dans le maintien de l'homéostasie rédox

Le système thiorédoxine est un acteur majeur du maintien du niveau rédox des cellules (pour une revue complète sur les thiorédoxines, leurs rôles dans différents

tissus et leurs impacts sur la santé chez les mammifères, voir [Lillig and Holmgren, 2006]).

Grâce à leur site actif dithiol/disulfite, elles sont les protéines disulfides réductases majeures dans les cellules. Elles servent également de donneurs d'électrons pour les enzymes comme les ribonucléotides réductases, les méthionines sulfoxide réductases et les peroxyrédoxines (Prx)(Figure 19).

6.3 Rôles des systèmes rédox lors de la reproduction sexuée chez les mammifères

Le maintien de l'homéostasie rédox est crucial pour le bon déroulement de la reproduction chez les mammifères, que soit pour la production de gamètes mâles viables (pour une revue complète et récente, voir [Conrad et al., 2015]) ou pour la décondensation du noyau mâle lors de la fécondation.

Protection du gamète mâle lors de la spermiogenèse

Chez la souris comme chez l'homme, la spermatogenèse nécessite un contrôle très fin du niveau de H_2O_2 . En effet, le H_2O_2 peut être délétère pour le spermatozoïde, tant au niveau de sa fonctionnalité qu'au niveau de sa qualité. Premièrement, la peroxydation des lipides due à une trop grande quantité de H_2O_2 peut réduire la motilité du spermatozoïde. Des études chez l'homme ont corrélé l'absence de GPx à une infertilité liée notamment à une perte de motilité [Imai et al., 2001; Foresta et al., 2002]. Deuxièmement, le H_2O_2 peut endommager l'ADN en libérant un radical hydroxyl $HO\cdot$, qui est extrêmement réactif [Imlay, 2003]. Ce radical peut engendrer une modification de bases azotées de l'ADN ou encore une cassure de l'ADN.

Chez les mammifères, le contrôle du H_2O_2 est pris en charge par les GPx. Chez les souris mutantes pour *Gpx5*, les mâles âgés de plus de un an présentent des défauts de fertilité, qui sont dus à une mauvaise compaction du génome ainsi qu'à un fort niveau d'oxydation et de fragmentation de l'ADN [Chabory et al., 2009]. Cette dégradation des gamètes mâles, qui est due au H_2O_2 , donne lieu à des défauts du développement embryonnaire, des avortements spontanés et à une mortalité périnatale.

Les thiorédoxines interviennent également dans le maintien d'un niveau de ROS acceptable lors de la spermiogenèse. Chez la souris, il existe 3 thiorédoxines spermatiques, Txndc2, Txndc3 et Txndc8, mais seules Txndc2 et Txndc 3 subsistent dans le spermatozoïde mature. Il a été démontré que ces dernières sont impliquées dans la protection du spermatozoïde contre le stress oxydant [Smith et al., 2013]. En effet, en absence des protéines fonctionnelles Txndc2 et 3, les spermatozoïdes issus de mâles âgés de plus de 18 mois présentent une perte de motilité, une augmentation des ROS, qui sont notamment dus à une surproduction de $O_2^{\cdot -}$ ainsi que des dommages à l'ADN.

Les peroxyrédoxines sont également des protéines importantes pour l'homéostasie rédox car elles sont capables de catalyser la transformation du H_2O_2 en deux molécules d' H_2O (Figure 19). Pour ce faire, les systèmes Trx et Prx coopèrent, les Prx étant recyclées par les Trx (Figure 19). De ce fait, les Prx et les Trx sont

deux familles de protéines importantes pour la spermatogenèse chez les mammifères [O'Flaherty, 2014, 2015]. Chez l'homme, un faible taux de peroxyrédoxine 1 et de peroxyrédoxine 6 est associé à de l'infertilité masculine, en partie liée à la perte de motilité des spermatozoïdes et à un plus fort taux de dommage à l'ADN spermatique [Gong et al., 2012]. Chez les souris mutantes pour la peroxyrédoxine 6, au fur et à mesure que les mâles vieillissent, on observe une diminution de la fertilité et une augmentation des dommages à l'ADN plus forts que chez les mâles sauvages. Ces phénotypes résultent certainement d'une trop forte concentration en H_2O_2 .

Mise en place des liaisons disulfures

Toutefois, la spermatogenèse chez les mammifères nécessite la présence d'un minimum de H_2O_2 car cette molécule est nécessaire pour la mise en place des liaisons disulfures qui stabilisent la chromatine spermatique. Chez le rat et chez la souris, une glutathione peroxidase spécifique du noyau spermatique (snGPx4) est responsable de la formation des liaisons disulfures du noyau du spermatozoïde [Pfeifer et al., 2001; Conrad et al., 2005]. Comme précisé précédemment (p. 43), chez les mâles *snGPx4*^{-/-}, les spermatozoïdes issus de la tête de l'épididyme présentent une chromatine spermatique moins condensée.

Réduction des liaisons disulfures du noyau spermatique lors de la fécondation

Comme souligné précédemment (p. 49), le glutathion joue un rôle essentiel lors de la fécondation chez les mammifères. En effet, le glutathion est requis pour la rupture des ponts disulfures qui stabilisent la chromatine spermatique chez les mammifères [Perreault et al., 1988; Yoshida et al., 1993; Sutovsky and Schatten, 1997].

6.4 Les thiorédoxines chez la drosophile

Les thiorédoxines jouent un rôle important chez la drosophile car elles sont responsables du recyclage du glutathion [Kanzok et al., 2001]. Chez *D. melanogaster*, on trouve 18 protéines possédant un domaine Thiorédoxine-like, mais seules quatre d'entre elles ont un site catalytique WCGPCK conservé : la Thiorédoxine-2 (Trx-2), la ThiorédoxineT (TrxT), Deadhead (DHD) et la Thiorédoxine-like (Txl). Txl possède un grand domaine protéique supplémentaire, ce qui lui vaut d'être classée comme une thiorédoxine-like plutôt que comme une vraie thiorédoxine tandis que TrxT, DHD et Trx-2 sont des thiorédoxines vraies.

Les thiorédoxines sont des petites protéines qui possèdent des résidus qui sont conservés. Ces résidus leur confèrent leur fonctionnalité. Parmi eux, on trouve le site catalytique WCGPCK (Table 4), mais également trois prolines. La deuxième d'entre elles est importante pour le maintien de la conformation du site catalytique et pour le potentiel oxydoréducteur de la protéine [Collet and Messens, 2010]. Or, DHD ne possède pas cette proline (Table 4), ce qui impacte sans doute sa réactivité ou sa spécificité.

On peut également remarquer que TrxT est plus longue en C-terminal que les autres thiorédoxines. Toutefois, le rôle et l'impact de ce domaine C-terminal n'a pas

DHD (107 AA)	MASVRTMNDY KAVVLKIDVD MAKLVKA	HKRIEAADDK KFEELTERYK	LIVLDFYATW VRSMPTFVFL	CGPCKEMEST RQNRRLASFA	VKSLARKYSS GADEHKLTNM
TrxT (157 AA)	MVYPVRNKDD DRVVVLKVVN LMEKHAGVYT ENAVLEH	LDQQLILAE DENEDITVEY DEAADVKAVH	KLVVIDFYAD NVNSMPTFVF	WCGPCKIIAP IKGGNVLELF	KLDELAQQYS VGCNSDKLAK NNVNEVSAHD
Trx-2 (106 AA)	MVYQVKDKAD DNVVVLKVDV VIKANI	LDGQLTKASG DECEDIAMEY	KLVVLDFFFAT NISSMPTFVF	WCGPCKMISP LKNGVKVEEF	KLVELSTQFA AGANAKRLED

TABLE 4. **Séquences protéiques des thiorédoxines de *D. melanogaster***. Le site catalytique est indiqué en rose. Les acides aminés indiqués en vert correspondent aux autres résidus conservés dans la famille des thiorédoxines [Collet and Messens, 2010]. Les séquences protéiques ont été obtenues sur <http://www.flybase.org/>.

été étudié.

Trx-2 est localisé dans la région 30C du chromosome 2L et est exprimé durant les stades larvaires ainsi dans la plupart des organes des mâles et des femelles adultes. La protéine a été caractérisée *in vitro* : elle peut être recyclée par la Thiorédoxine Réductase 1 (TrxR-1) de *D. melanogaster* et serait capable de recycler le glutathion oxydé [Bauer et al., 2002]. Ses structures sous forme réduite et oxydée ont été cristallisées, révélant un réarrangement local du site catalytique lors du passage entre ces deux formes [Wahl et al., 2005].

De manière étonnante, deux études indépendantes ont démontré que les mâles et les femelles homozygotes mutants pour *Trx-2* sont viables et fertiles [Svensson and Larsson, 2007; Tsuda et al., 2010]. Toutefois, chez les adultes qui n'expriment pas *Trx-2*, on observe une diminution de la durée de vie, qui est abolie par l'expression de *Trx-2* transgénique [Svensson and Larsson, 2007; Tsuda et al., 2010]. Les individus *Trx-2^l* sont plus sensibles que les individus sauvages au stress oxydant causé par un traitement au paraquat et présentent une surexpression de gènes impliqués dans la défense contre les ROS [Tsuda et al., 2010]. De plus, une surexpression de *Trx-2* en contexte sauvage induit une plus grande tolérance au stress oxydant [Svensson and Larsson, 2007; Tsuda et al., 2010]. Ces deux études montrent que Trx-2 est impliquée dans le maintien de l'homéostasie rédox chez *D. melanogaster*, certainement grâce au recyclage du glutathion.

Contrairement à *Trx-2* qui est exprimée de manière ubiquitaire chez l'adulte, *dhd* et *TrxT* sont exprimées respectivement et spécifiquement dans les gonades femelles et mâles de l'adulte [Svensson et al., 2003]. Ces deux gènes sont très proches : ils sont localisés dans la région 4F du chromosome X, sont séparés par une courte séquence de 471 pb et sont orientés tête-bêche l'un par rapport à l'autre [Svensson et al., 2003]. Cette disposition et cette expression spécifique du genre est conservée chez la plupart des espèces de drosophiles [Svensson et al., 2007]. Cette organisation résulteraient d'évènements de duplication et de transposition de l'ancêtre de *Trx-2* [Svensson et al., 2007].

La délétion *Df(1)J5* couvre les gènes *TrxT* et *dhd*. Elle a été générée par [Salz et al., 1994] et a été utilisée pour caractériser les fonctions de ces deux thiorédoxines. Les mâles double mutants pour *TrxT* sont viables, fertiles et ne présenteraient pas de phénotype particulier [Svensson et al., 2003]. Grâce à l'étude de l'expression d'un transgène codant pour une protéine fusion TrxT-EYFP, il semble que TrxT se localise au niveau des noyaux des cellules de la lignée germinale, depuis le stade spermatocyte jusqu'aux spermatoïdes en cours d'élongation. Toutefois, on ne sait pas si cette protéine fusion est fonctionnelle, ce qui empêche donc de conclure sur la localisation subcellulaire de TrxT.

La perte de *dhd* par contre induit un phénotype de stérilité complète chez les femelles [Salz et al., 1994]. Les femelles homozygotes pour la délétion *Df(1)J5* sont stériles et pondent des œufs qui ne se développent pas. Seuls 7-10 % des embryons atteignent le cycle 10 tandis que les œufs restants ne se développent pas du tout, bien que les œufs soient fécondés. Étant donné que les globules polaires semblaient présenter des défauts et qu'ils n'ont pas observé de pronoyau femelle dans ces œufs, ils ont conclu que DHD est impliqué dans le déroulement de la méiose femelle. Le peu d'embryons qui survivent jusqu'à l'étape de la gastrulation présentent des défauts sévères d'involution de la tête, ce qui a donné son nom au gène. *dhd* est exprimé dans les ovaires à partir du stade 10 [Salz et al., 1994] et son ARN persiste dans l'embryon jusqu'au stade préblastoderme [Salz et al., 1994], [<http://insitu.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>]. Les phénotypes causés par la perte de *dhd* peuvent être sauvés par l'expression d'un transgène portant un fragment génomique qui contient *dhd* [Salz et al., 1994]. Par contre, si on abolit la fonction rédox la protéine DHD transgénique en mutant les deux résidus cystéines du site catalytique WCGPCK, l'expression de ce transgène ne restaure pas la fertilité femelle [Pellicena-Pallé et al., 1997], ce qui démontre que la fonction de DHD est directement liée à son activité catalytique.

Objectifs de Thèse

Les questions ne sont pas obligées d'avoir du sens [...]. Mais les réponses, si.

TERRY PRATCHETT
Procrastination (2002)

À travers cette introduction, nous avons pu nous rendre compte de l'extrême complexité du remodelage que subit le génome paternel au cours de la spermatogenèse puis lors de la fécondation, ainsi que de l'importance des processus d'oxydoréduction.

Durant ma thèse, plusieurs questions intrinsèquement liées se sont posées : comment la chromatine spermatique est-elle organisée ? L'absence de certaines SNBPs comme *Mst35Ba* et *Mst35Bb* a-t-elle une influence sur la chromatine spermatique et sur la fertilité mâle ? La chromatine spermatique est-elle stabilisée par des ponts disulfures, comme chez les mammifères ? Si tel est le cas, comment ces liaisons covalentes sont-elles réduites lors de la fécondation pour permettre le remodelage de la chromatine paternelle ? Et enfin, comment ces ponts disulfures seraient-ils mis en place ?

Afin de comprendre l'impact des SNBPs sur la chromatine spermatique lors de la spermiogenèse et de la fécondation, j'ai tout d'abord caractérisé une souche portant une délétion qui couvre uniquement les gènes *Mst35Ba* et *Mst35Bb*.

Le deuxième et principal objectif de ma thèse concernait l'existence de ponts disulfures sur la chromatine paternelle et le mécanisme de leur enlèvement lors de la fécondation. Ces travaux ont été possibles grâce à l'étude de la souche *dhd⁵*. Cette souche, qui porte une délétion des gènes des deux thiorédoxines sexuelles (DHD et TrxT), m'a permis de comprendre le rôle de la thiorédoxine maternelle DHD dans le cadre du remodelage de la chromatine paternelle à la fécondation.

Enfin, étant donné l'importance et la dualité des processus d'oxydoréduction lors de la spermatogenèse chez les mammifères, j'ai décidé de caractériser la thiorédoxine paternelle TrxT lors de la spermiogenèse chez *D. melanogaster*.

Résultats

Et c'est ainsi que commença leur quête de cette chose tellement importante que la vie entière de Garion devait en être bouleversée du jour au lendemain et qu'il n'était pas même pas encore capable d'identifier.

DAVID EDDINGS
Le pion blanc des présages

1 Analyse fonctionnelle de Mst35Ba et Mst35Bb

1.1 Introduction

Chez *D. melanogaster*, l'ADN spermatique est condensé à l'aide de SNBPs. Pour le moment, quatre protamine-like sont connues : Mst35Ba, Mst35Bb, Mst77F et Prtl99C [Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005; Eren-Ghiani et al., 2015]. Parmi ces quatre protéines, seules Mst77F et Prtl99C sont indispensables à la fertilité mâle.

Lors de mon arrivée au sein de l'équipe, Prtl99C n'avait pas encore été décrite. Une étude avait montré que l'absence de Mst35Ba et Mst35Bb n'affecte pas la fertilité mâle et l'incorporation de Mst77F mais induit l'apparition de défauts de forme des noyaux spermatiques [Rathke et al., 2010]. Cependant, cette étude se base sur une grande délétion touchant non seulement *Mst35Ba* et *Mst35Bb*, mais également quatre autres gènes et trois ARNs non codants qui sont exprimés dans les testicules et les glandes accessoires des mâles adultes. Cette étude ne permettait donc pas de conclure que les défauts observés étaient dus à l'absence de Mst35Ba/b. Afin de pouvoir attribuer ou non les défauts observés par [Rathke et al., 2010] aux gènes codant pour les SNBPs, une souche portant une délétion nommée $\Delta Mst35B$ avait été générée au laboratoire par recombinaison homologue. Cette délétion touche uniquement *Mst35Ba* et *Mst35Bb*, qui sont organisés en tandem. J'ai donc entrepris de caractériser les phénotypes causés par l'absence de ces deux SNBPs.

1.2 Résumé des résultats

La délétion $\Delta Mst35B$ a été générée par recombinaison homologue et l'absence des protéines Mst35Ba et Mst35Bb dans les testicules a été vérifiée par l'équipe à la

fois par immunofluorescence et par Western Blot.

Grâce des expériences d'immunofluorescence sur testicules entiers, j'ai pu mettre en évidence des défauts de spermiogenèse chez les mâles $\Delta Mst35B$ qui conduisent à la perte de nombreuses spermatides lors la spermiogenèse. J'ai démontré que malgré l'absence de Mst35Ba et Mst35Bb, l'éviction des histones et l'incorporation transitoire de Tpl94D n'étaient pas affectées dans le mutant. Ces travaux ont également permis de prouver que le défaut de forme nucléaire des spermatozoïdes matures observé dans [Rathke et al., 2010] est bien dû à l'absence des Mst35Ba et Mst35Bb. De plus, contrairement à ce qui avait été publié précédemment, j'ai pu montrer que ces spermatozoïdes défectueux étaient stockés dans les vésicules séminales des mâles $\Delta Mst35B$.

J'ai également pu mettre en évidence que, contrairement aux résultats présentés dans [Rathke et al., 2010], la fertilité mâle est affectée par la perte des SNBPs. Cette baisse de fertilité peut être imputée à la perte spermatidique observable dans les testicules de mâles $\Delta Mst35B$, qui se traduit par une diminution du nombre de spermatozoïdes stockés dans les vésicules séminales des mâles.

Ainsi, cette étude a permis d'attribuer les phénotypes observés dans [Rathke et al., 2010] à l'absence de Mst35Ba/b, mais également de révéler des défauts se traduisant par une perte de fertilité des mâles mutants.

1.3 Présentation de l'article publié

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue "Genes | Genomes | Genetics" en 2014.

Drosophila Protamine-Like *Mst35Ba* and *Mst35Bb* Are Required for Proper Sperm Nuclear Morphology but Are Dispensable for Male Fertility

Samantha Tirmarche,* Shuhei Kimura,* Laure Sapey-Triomphe,* William Sullivan,† Frédéric Landmann,‡ and Benjamin Loppin*¹

*Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire – CNRS UMR 5534 – Université Claude Bernard Lyon1, 69100 Villeurbanne, France, †Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California Santa Cruz, Santa Cruz, California 95064, and ‡Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire – CNRS UMR 5237 – 34293 Montpellier, France

ABSTRACT During spermiogenesis, histones are massively replaced with protamines. A previous report showed that *Drosophila* males homozygous for a genomic deletion covering several genes including the protamine-like genes *Mst35Ba/b* are surprisingly fertile. Here, we have precisely deleted the *Mst35B* locus by homologous recombination, and we confirm the dispensability of *Mst35Ba/b* for fertility.

KEYWORDS

Drosophila
protamine-like
spermiogenesis
sperm
Mst35B

In most animal species, the mature sperm nucleus is characterized by an extreme level of DNA compaction achieved after the massive replacement of somatic-type histones with sperm-specific nuclear basic proteins (SNBPs) (Lewis *et al.* 2003; Miller *et al.* 2010; Ward 2010; Kanippayoor *et al.* 2013). In mammals, the bulk of sperm chromatin is organized with two small protamines (Protamine 1 and 2) highly enriched in arginine residues (Ballhorn 2007). *Drosophila* comprises at least three SNBPs: two paralogous protamine-like proteins, *Mst35Ba* and *Mst35Bb*, which are conserved among drosophilids, and the HILS1-related protein *Mst77F* (Russell and Kaiser 1993; Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl 2005; Alvi *et al.* 2013; Rathke *et al.* 2014). The almost identical *Mst35Ba* and *Mst35Bb* proteins are larger than mammalian protamines and are enriched in lysine residues. *Mst35Ba/b* proteins are incorporated in elongating spermatid nu-

clei at the late canoe stage and remain associated with mature sperm nuclei until fertilization (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl 2005). Although the functions of *Drosophila* SNBPs remain poorly understood, Rathke *et al.* (2010) reported the surprising observation that *Drosophila* males homozygous for a genomic deficiency covering the *Mst35B* locus were fertile. This result was indeed unexpected when considering for instance the haploinsufficiency of mouse protamine genes for male fertility (Cho *et al.* 2001). However, according to Flybase (Flybase.org), the deficiency generated by Rathke *et al.* (2010) (named *protΔ*) is a 73.6-kb deletion that not only uncovers *Mst35Ba* and *Mst35Bb* but also removes four additional protein encoding genes (*CG42682*, *CG15279*, *CG4480*, *CG15278*) as well as three noncoding RNAs (*CR43805*, *CR45727*, *CR45302*). Furthermore, all these genes and noncoding RNAs are expressed in the adult testis or accessory glands, with the exception of *CG15279*, and transcripts of three of these genes (*CG33309*, *CG4480*, and *CG15278*) were detected in early spermatids (Flybase; Rathke *et al.* 2010). Because the simultaneous deletion of these other genetic elements could potentially interfere with a detailed functional analysis of *Mst35B* genes, we generated a precise deletion of the *Mst35B* locus by homologous recombination using the “Ends-Out” targeting technique (Gong and Golic 2003, 2004) (Figure 1A). The resulting allele, named $\Delta Mst35B$, eliminates a 5-kb genomic DNA fragment that only contains the *Mst35Ba* and *Mst35Bb* genes. To validate the elimination of these genes in the new deletion allele, we raised an antiserum against a peptide common to *Mst35Ba* and *Mst35Bb* proteins (Figure 1B). This antibody specifically stained late

Copyright © 2014 Tirmarche *et al.*

doi: 10.1534/g3.114.012724

Manuscript received June 13, 2014; accepted for publication September 8, 2014; published Early Online September 17, 2014.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Unported License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Supporting information is available online at Note 1. <http://www.g3journal.org/lookup/suppl/doi:10.1534/g3.114.012724/-/DC1>

¹Corresponding author: Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire – CNRS UMR 5534 – 16 rue Raphaël Dubois, Bât. Mendel, Université Claude Bernard Lyon1, 69100 Villeurbanne, France. E-mail: benjamin.loppin@univ-lyon1.fr

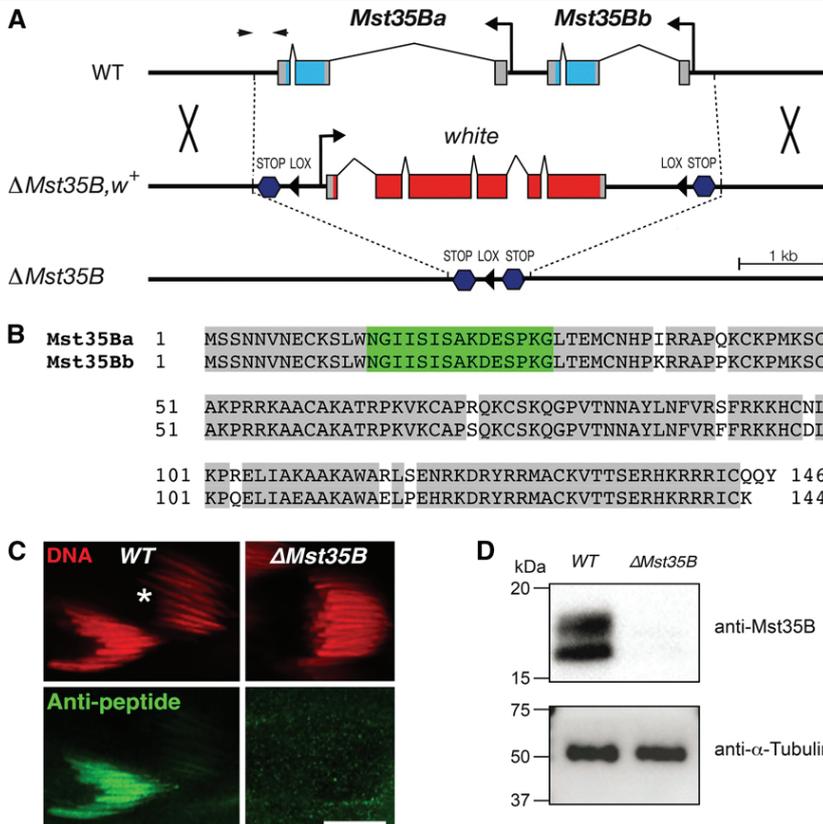


Figure 1 Knocking-out *Mst35Ba/b* genes by homologous recombination. (A) Representation of the *Mst35b* locus before (wild-type; WT) and after ($\Delta Mst35B$, w^+) “ends-out” targeting using the *pW25* vector (Gong and Golic, 2003, 2004; details are available upon request). The $\Delta Mst35B$ allele was obtained after Cre-mediated excision of the *white* cassette. The tandem protamine genes *Mst35Ba* and *Mst35Bb* are represented with their coding regions in pale blue. The dark blue hexagons representing termination codons in the six reading frames and the *Lox* sites (black triangles) are from the *pW25* ends-out targeting vector. Arrowheads indicate the position of the primer pair used in polymerase chain reaction analyses. (B) Sequence alignment of *Mst35Ba* and *Mst35Bb* proteins. The peptide used to generate the rabbit antipeptide “NGI” polyclonal antibody is highlighted in green and other identical residues are shaded in gray. (C) Immunofluorescence staining of WT or $\Delta Mst35B$ spermatid nuclei with the antipeptide “NGI” antibody. The antibody stains WT spermatid nuclei in late canoe stage but not more advanced nuclei (asterisk), which are too compacted for antibody penetration (Bonney et al. 2007). No staining was observed in mutant spermatid nuclei at the late canoe stage. Bar: 10 μ m. (D) Western blot analysis of testicular protein extracts using a rabbit antibody directed against a recombinant full-length *Mst35Bb* protein. *Mst35Ba/b*-specific bands are detected in WT but not in $\Delta Mst35B$ extracts. The anti- α -Tubulin antibody was used as loading control.

canoe stage spermatid nuclei of wild-type males but not those of $\Delta Mst35B$ homozygous males (Figure 1C). At later stages of spermiogenesis, the highly compacted chromatin of spermatids is no longer accessible to antibodies (Bonney et al. 2007), thus explaining the absence of staining beyond the canoe stage in wild-type testes. In addition, another anti-*Mst35B* antibody raised against the whole *Mst35Bb* recombinant protein allowed us to confirm the absence of *Mst35B* proteins from $\Delta Mst35B$ testicular protein extracts (Figure 1D).

As expected, homozygous $\Delta Mst35B$ males were fully viable (not shown) and at least partially fertile (see paragraphs to follow), thus confirming the dispensability of *Mst35B* proteins for male fertility. Spermiogenesis (the differentiation of postmeiotic spermatids) in mutant males nevertheless appeared severely disorganized, with many elongating spermatids showing abnormal nuclear morphology (Figure 2, A–C). The spermiogenesis defects were similar in homozygous $\Delta Mst35B$ and *trans*-heterozygous $\Delta Mst35B/prot\Delta$ males, ruling out the possibility that the phenotypes associated with $\Delta Mst35B$ were caused by a second-site mutation. In both allelic combinations, affected spermatid nuclei typically appeared bent compared with control spermatids, with the anterior tip of the nucleus sometimes folded into a hook-like structure (Figure 2, D and E). It is likely that the concentration of chromatin at one end of mutant spermatid nuclei observed by Rathke et al. (2010) actually correspond to folded nuclear extremities. A large proportion of mutant spermatids were scattered along the cysts instead of remaining tightly grouped in bundles of 64 nuclei, suggesting that they were progressively eliminated during the course of spermiogenesis (Figure 2, B and C). Accordingly, mutant males stored significantly less gametes in their seminal vesicles compared with control males (Figure 3E). Interestingly,

however, we did observe morphologically aberrant mature gametes stored in the seminal vesicles of homozygous $\Delta Mst35B$ and $\Delta Mst35B/prot\Delta$ males (Figure 3, A–C), in sharp contrast to previous observations (Rathke et al. 2010). A transgene expressing *Mst35Ba*-EGFP rescued the abnormal nuclear shaping of $\Delta Mst35B$ spermatids, thus confirming that this phenotype is actually caused by the loss of *Mst35B* genes (Figure 3D). However, a fraction of spermatids was still eliminated in rescued animals (Supporting Information, Figure S1), suggesting that the presence of a relatively large green fluorescent protein tag perturbs the functionality of the recombinant protein. Alternatively, both *Mst35Ba* and *Mst35Bb* proteins could be required for proper packaging of sperm DNA. In addition, we confirmed that a transgene expressing *Mst77F*-EGFP was normally incorporated into the chromatin of mutant gametes but failed to rescue the phenotype (Figure 3B). Finally, using a specific antibody (Figure S2), we also verified that the transition protein Tpl94D (Rathke et al. 2007) was normally incorporated in mutant spermatids at the histone-to-protamine transition (Figure 2, D and E), confirming that the nuclear defects in mutant spermatids appear after this stage.

Although the quantity and quality of gametes were affected by the loss of *Mst35B* genes, homozygous $\Delta Mst35B$ and $\Delta Mst35B/prot\Delta$ males were nevertheless fertile, in agreement with the study by Rathke et al. (2010). In fact, the impact of $\Delta Mst35B$ on male fertility was only revealed when mutant males were allowed to mate with a large excess of virgin females (1 for 10; Figure 3F) but not with a 1:1 sex ratio (not shown). In the presence of a large excess of females, the observed reduction of fertility is likely explained by the limiting amount of sperm produced by mutant males (Figure 3E).

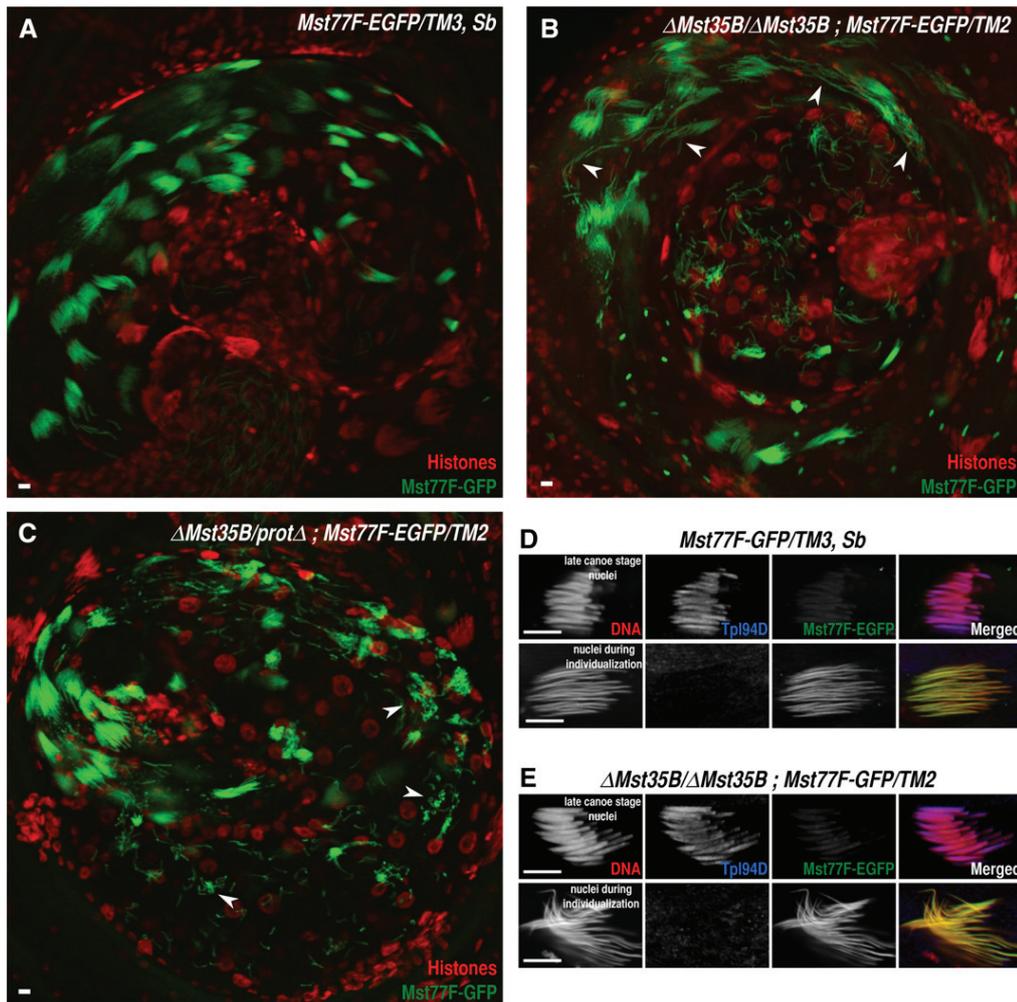


Figure 2 Late spermiogenesis defects of $\Delta Mst35B$ males. (A–C) Confocal images of control (A), $\Delta Mst35B$ (B), or $\Delta Mst35B/prot\Delta$ (C) testes expressing a *Mst77F-EGFP* transgene and stained with an anti-histone antibody (MABE71; Millipore) in red. In control testes, groups of 64 spermatid nuclei are visible in each cyst. Needle-like shaped spermatid nuclei appear green after the removal of histones and the incorporation of *Mst77F-EGFP*. In $\Delta Mst35B/\Delta Mst35B$ as in $\Delta Mst35B/prot\Delta$ testes, many green fluorescent protein-positive spermatid nuclei appear scattered along the length of the cyst (arrowheads), indicating that they are progressively eliminated. (D–E) Confocal images of spermatid nuclei from control (D) and protamine mutant testes (E) bearing a *Mst77F-EGFP* transgene. Testes were immunostained for Tpl94D, a transition protein facilitating the deposition of sperm-specific nuclear basic proteins (Rathke *et al.* 2007). The anti-Tpl94D antibody was generated by rabbit immunization with full-length recombinant Tpl94D protein (details available upon request. See Figure S2). In both control and $\Delta Mst35B$ mutant testes, spermatid nuclei successively incorporate Tpl94D and *Mst77F-EGFP*. However, mutant spermatids frequently exhibit a twisted shape compared to control nuclei. Scale bar: 10 μm .

The organization of sperm chromatin in animals is poorly understood and most of our knowledge comes from studies on human or other mammalian species. *Drosophila* is an interesting, alternative model for the study of sperm chromatin at the functional level. The generation of a precise deletion allele of both protamine-like genes *Mst35Ba/b* provides an ideal tool for the functional study of *Drosophila* SNBPs. The fertility of $\Delta Mst35B$ males reveals the extraordinary plasticity of the *Drosophila* sperm nucleus, which grossly maintains its architecture, motility and ability to fertilize eggs in the absence of what is considered a major component of its chromatin. It is likely that additional SNBPs compensate for the loss of the protamine-like proteins. In fact, we already know that the loss of *Mst35Ba/b* proteins does not perturb the incorporation of *Mst77F* in spermatid nuclei (this work and Rathke *et al.* 2010). *Mst77F*, which was originally identified in a genetic screen for $\beta 2$ tubulin interactors (Fuller *et al.* 1989), is related to the mammalian spermatid-specific histone H1-like protein HILS1 (Iguchi *et al.* 2004; Yan *et al.* 2003). Interestingly, the *D. melanogaster* genome contains several recent copies of *Mst77F*

on the Y chromosome, and eight of these *Mst77Y* genes are most likely functional (Russell and Kaiser 1993; Krsticevic *et al.* 2010). It has been proposed that *Mst77F* is essential for male fertility (Rathke *et al.* 2010), but this conclusion is based on the analysis of the antimorphic point mutation *Mst77F¹* (see Krsticevic *et al.* 2010). Future work should aim at clarifying the nuclear function of *Mst77F/Y* proteins to determine if they can indeed maintain a sperm chromatin structure compatible with male fertility in the absence of *Mst35B* proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Renate Renkawitz-Pohl and Cristina Rathke for fly stocks. This work was supported by research grants from the French ANR (ZygoPat-ANR-12-BSV6-0014), the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (SFI20121205765), and the NSF Frontiers in Integrative Biological Research (EF-0328363). S.T. is supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. S.K. is supported by a fellowship from the Uehara Memorial Foundation.

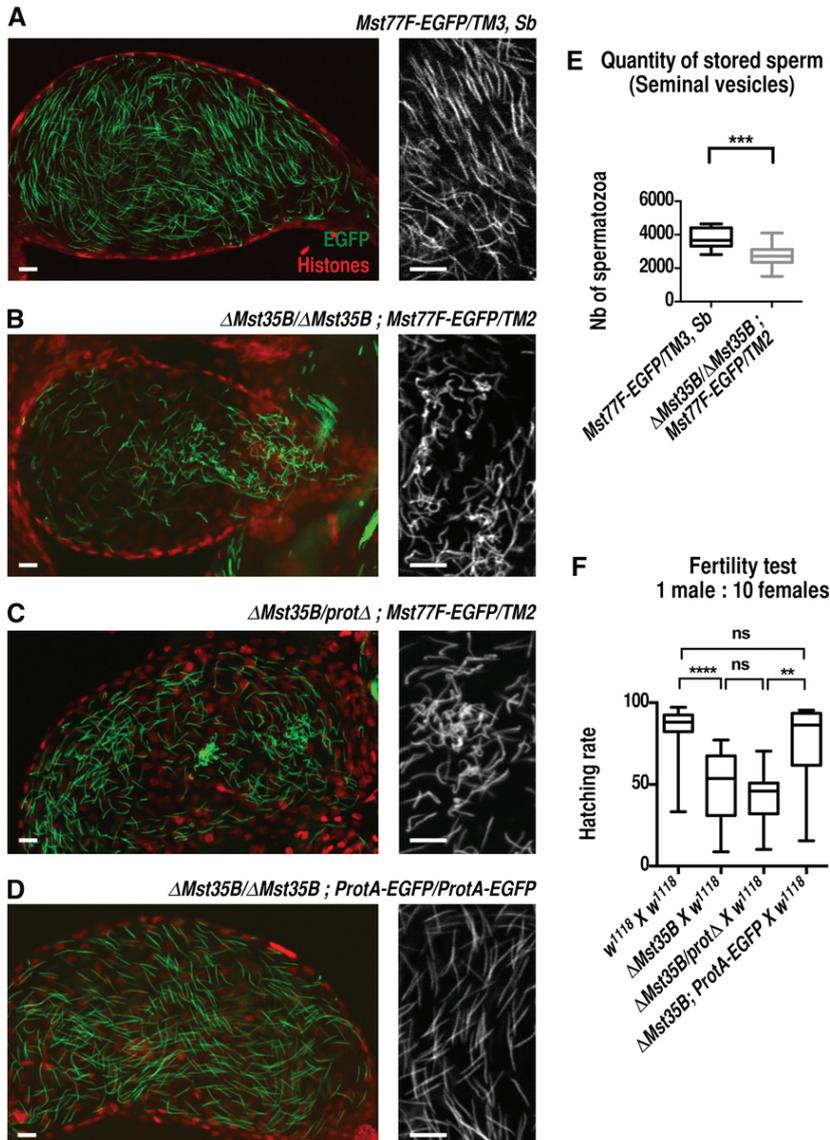


Figure 3 Male sperm storage and fertility is affected by $\Delta Mst35B$ deletion. (A–D) Confocal images of seminal vesicles of the indicated genotype stained with an anti-histone antibody (red) that reveals somatic nuclei. Sperm nuclei (green) are labeled with *Mst77F-EGFP* (A–C) or *ProtA-EGFP* (D). Magnified views are shown in gray. Seminal vesicles of $\Delta Mst35B/\Delta Mst35B$ (B) and $\Delta Mst35B/prot\Delta$ (C) mutant males contain abnormally shaped sperm nuclei compared with straight nuclei observed in control (A) or rescued (D) males. Scale bar: 10 μm . (E) Quantification of sperm nuclei in seminal vesicles dissected from four days old virgin males. Images of squashed seminal vesicles labeled as in (A–B) were acquired with a Z1 Imager microscope (Zeiss) and sperm nuclei were individually counted using the Image J software. A total of 9 control vesicles and 14 $\Delta Mst35B$ mutant vesicles were counted and the results were statistically analyzed with a Mann-Whitney test. $***P < 0.001$. (F) Reduced fertility of $\Delta Mst35B$ males. 0- to 1-d-old males of the indicated genotypes were individually mated with 10 virgin *w¹¹¹⁸* females. Embryo hatching rates were then determined as described in Orsi *et al.* (2010). Results were statistically analyzed with a Mann-Whitney *U* test. ns: nonsignificant. $**P < 0.01$. $****P < 0.0001$.

LITERATURE CITED

Alvi, Z. A., T.-C. Chu, V. Schwaroch, and A. V. Klaus, 2013 Protamine-like proteins in 12 sequenced species of *Drosophila*. *Protein Pept. Lett.* 20: 17–35.

Balhorn, R., 2007 The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8: 227.

Bonnefoy, E., G. A. Orsi, P. Couble, and B. Loppin, 2007 The essential role of *Drosophila* HIRA for de novo assembly of paternal chromatin at fertilization. *PLoS Genet.* 3: 1991–2006.

Cho, C., W. Williw, E. H. Goulding, H. Jung-Ha, Y. C. Choi *et al.*, 2001 Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28: 82–86.

Fuller, M. T., C. L. Regan, L. L. Green, B. Robertson, R. Deuring *et al.*, 1989 Interacting genes identify interacting proteins involved in microtubule function in *Drosophila*. *Cell Motil. Cytoskeleton* 14: 128–135.

Gong, W. J., and K. G. Golic, 2003 Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2556–2561.

Gong, W. J., and K. G. Golic, 2004 Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* 168: 1467–1476.

Iguchi, N., H. Tanaka, S. Yamada, H. Nishimura, and Y. Nishimune, 2004 Control of mouse *hls1* gene expression during spermatogenesis:

identification of regulatory element by transgenic mouse. *Biol. Reprod.* 70: 1239–1245.

Jayaramaiah Raja, S., and R. Renkawitz-Pohl, 2005 Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and *Mst77F* of histones during chromatin condensation in late spermatids. *Mol. Cell. Biol.* 25: 6165–6177 (erratum: *Mol. Cell. Biol.* 26:3682).

Kanippayoor, R. L., J. H. Alpern, and A. J. Moehring, 2013 Protamines and spermatogenesis in *Drosophila* and homosapiens: a comparative analysis. *Spermatogenesis* 3: e24376.

Krsticevic, F. J., H. L. Santos, S. Januario, C. G. Schrago, and A. B. Carvalho, 2010 Functional copies of the *Mst77F* gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 184: 295–307.

Lewis, J. D., Y. Song, M. E. Jong, S. M. Bagha, and J. Ausió, 2003 A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 111: 473–482.

Miller, D., M. Brinkworth, and D. Iles, 2010 Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139: 287–301.

Orsi, G. A., E. F. Joyce, P. Couble, K. S. Mckim, and B. Loppin, 2010 *Drosophila* I-R hybrid dysgenesis is associated with catastrophic meiosis and abnormal zygote formation. *J. Cell Sci.* 123: 3515–3524.

1 Analyse fonctionnelle de *Mst35Ba* et *Mst35Bb*

- Rathke, C., W. M. Baarends, S. Jayaramaiah-Raja, M. Bartkuhn, R. Renkawitz *et al.*, 2007 Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120: 1689–1700.
- Rathke, C., B. Barckmann, S. Burkhard, S. Jayaramaiah-Raja, J. Roote *et al.*, 2010 Distinct functions of *Mst77F* and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 89: 326–338.
- Rathke, C., W. M. Baarends, S. Awe, and R. Renkawitz-Pohl, 2014 Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839: 155–168.
- Russell, S. R., and K. Kaiser, 1993 *Drosophila melanogaster* male germ line-specific transcripts with autosomal and Y-linked genes. *Genetics* 134: 293–308.
- Ward, W. S., 2010 Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* 16: 30–36.
- Yan, W., L. Ma, K. H. Burns, and M. M. Matzuk, 2003 HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10546–10551.

Communicating editor: J. Brill



***Drosophila* protamine-like Mst35Ba and Mst35Bb are required for proper sperm nuclear morphology but are dispensable for male fertility**

Samantha Tirmarche*, Shuhei Kimura*, Laure Sapey-Triomphe*, William Sullivan†, Frédéric Landmann‡ and Benjamin Loppin*§

* Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire – CNRS UMR 5534 – Université Claude Bernard Lyon1, 69100 Villeurbanne, France.

† Department of Molecular, Cell, and Developmental Biology, University of California Santa Cruz, Santa Cruz, CA 95064, USA.

‡ Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire – CNRS UMR 5237 – 34293 Montpellier, France.

§ Corresponding author : benjamin.loppin@univ-lyon1.fr

Corresponding author:

Benjamin Loppin

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire – CNRS UMR 5534 – 16 rue Raphaël Dubois, Bât. Mendel, Université Claude Bernard Lyon1, 69100 Villeurbanne, France.

Phone: 0033 472 447 926

Email: benjamin.loppin@univ-lyon1.fr

DOI: 10.1534/g3.114.012724

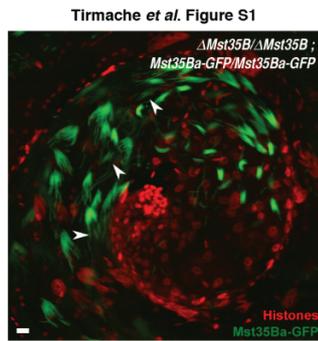


Figure S1 Confocal image of a homozygous $\Delta Mst35B$ testis expressing a *Mst35Ba-GFP* transgene and stained with an anti-histone antibody (Millipore, MABE71) in red. Arrowheads point to eliminated spermatids. Scale bar: 10 μ m.

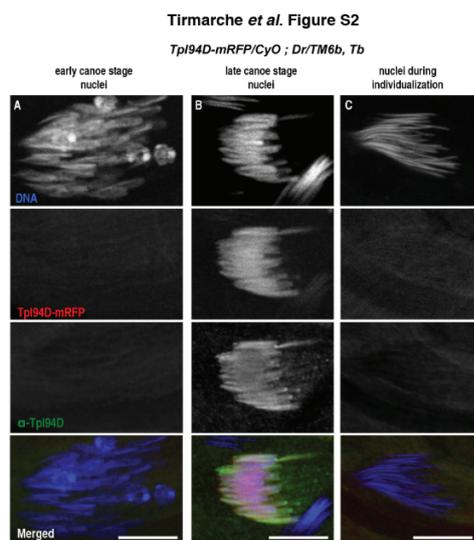


Figure S2 Confocal images of spermatid nuclei from *WT* testes expressing a *Tpl94D-RFP1* transgene. Testes were stained with an anti-Tpl94D (green) and Tpl94D-mRFP1 was observed through its native fluorescence (red). Scale bar: 10 μ m

2 Deadhead, une thiorédoxine strictement maternelle, réduit les ponts disulfures des SNBPs

2.1 Introduction

Les SNBPs qui condensent la chromatine spermatique de *D. melanogaster* sont riches en résidus cystéine [Eren-Ghiani et al., 2015; Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005]. Il est donc tentant de faire l'analogie avec les protamines mammifères [Balhorn, 1982, 2007] et de supposer que la chromatine spermatique de la drosophile est également stabilisée par des liaisons disulfures. Toutefois, cette hypothèse soulève un nouveau problème : si de telles liaisons sont présentes, comment sont-elles réduites lors de la fécondation ?

Chez les mammifères, il est communément admis que le glutathion joue le rôle de molécule réductrice des ponts disulfure du noyau spermatique [Sutovsky and Schatten, 1997; Perreault et al., 1988; Yoshida et al., 1993]. Une fois de plus, il est tentant de penser que tel pourrait être le cas chez *D. melanogaster*. Chez les mammifères, ce petit peptide peut être recyclé par la glutathion réductase (GR). Toutefois, *D. melanogaster* est dépourvue de GR et ce recyclage est pris charge par le système thiorédoxine [Kanzok et al., 2001].

Il existe trois thiorédoxines chez la drosophile : la Thiorédoxine-2 (Trx-2), qui est présente dans tous les tissus [Bauer et al., 2002] et deux thiorédoxines qui sont exprimées uniquement dans les gonades des adultes [Svensson et al., 2003] : la Thiorédoxine T (TrxT), qui est présente dans les testicules, et Deadhead (DHD) qui n'est produite que dans les ovaires.

De manière intéressante, les femelles homozygotes mutantes pour *dhd* sont stériles : elles pondent des œufs qui ne se développent pas [Salz et al., 1994]. De plus, le rôle de DHD lors de la formation du zygote est directement lié à son activité oxydoréductrice [Pellicena-Pallé et al., 1997].

En partant de ces constats, l'équipe a demandé la souche mutante pour *dhd* auprès du Dr. Helen Salz (Case Western Reserve University, Ohio). Les observations préliminaires des œufs m'ont permis de supposer que DHD pourrait effectivement être impliquée dans le processus de rupture des ponts disulfure, soit de manière indirecte en recyclant le glutathion de l'œuf, soit de manière directe en rompant directement les ponts disulfures des SNBPs.

L'étude de DHD a constitué le cœur de ma thèse. Lors de mon arrivée au sein de l'équipe, les toutes premières observations préliminaires venaient d'être réalisées et j'ai pu tout au long de ma thèse caractériser cette thiorédoxine maternelle qui s'est avérée être extrêmement spécialisée.

2.2 Résumé des résultats

Dans un premier temps, j'ai montré que les œufs pondus par les femelles mutantes pour *dhd* n'éclosent pas. Une faible proportion forme des embryons gynogénétiques tandis que le reste des œufs ne se développent pas. J'ai prouvé que ces défauts sont

dus à la non décondensation du noyau mâle. Ce noyau mâle ne subit pas de remodelage de la chromatine et reste condensé par les SNBPs. De plus, j'ai pu mettre en évidence un délai d'incorporation des histones au sein de la chromatine paternelle, qui sont incorporées bien plus tardivement que ce qui se passe dans des œufs sauvages.

Afin de montrer que le défaut de décondensation du noyau était dû à la persistance des SNBPs au sein de la chromatine paternelle, j'ai croisé les femelles *dhd* avec des mâles $\Delta Mst35B$, qui amènent ainsi au sein de l'œuf un noyau spermatique moins riche en protamine-like. Dans ce contexte, la décondensation du noyau spermatique est améliorée, ce qui prouve qu'en l'absence de DHD, le défaut de décondensation du noyau mâle est causé par le maintien des SNBPs au sein de ce noyau.

Par la suite, j'ai voulu tester la présence de ponts disulfures qui stabiliseraient la chromatine spermatique. Pour ce faire, j'ai élaboré un protocole pour mettre en évidence ces liaisons. En incubant des spermatozoïdes matures dans un tampon contenant un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), j'ai pu montrer qu'un traitement avec un agent réducteur entraîne la décondensation du noyau mâle *in vitro*. J'ai pu également mesurer la réduction des ponts disulfures à l'aide d'un agent fluorescent qui marque les groupements thiols réduits : le monobromobimane (mBrB).

Enfin, j'ai étudié la dynamique de la protéine DHD : j'ai montré par immunofluorescence et par Western Blot que DHD est présent dans les œufs jusqu'à la première mitose puis qu'il est rapidement dégradé. Afin de montrer que DHD réduit directement les ponts disulfures qui stabilisent la chromatine spermatique, j'ai également participé à la construction d'un transgène codant pour une version mutée de DHD, DHD^{C34S}. Cette protéine est mutée sur la deuxième cystéine du site catalytique WCGPCK, ce qui piège la thiorédoxine sur son substrat. Grâce à cette protéine mutée, DHD a été piégée sur le noyau mâle, ce que j'ai pu mettre en évidence par immunofluorescence. Ce dernier résultat soutient l'idée que DHD est responsable directement de la décondensation du noyau en réduisant les ponts disulfures qui maintiennent la chromatine spermatique dans un état extrêmement condensé.

2.3 Présentation de l'article

Cet article est en révision favorable à "Nature Communications". Il a notamment été demandé de tester l'action de DHD sur le noyau mâle *in vitro*. Une version révisée tenant compte du format requis sera resoumise et incluse dans le manuscrit final.

1 **Unlocking sperm chromatin at fertilization requires a ded-** 2 **icated egg thioredoxin in *Drosophila***

3 Samantha Tirmarche¹, Shuhei Kimura¹, Raphaëlle Dubruille¹, Béatrice Horard¹, & Benjamin
4 Loppin^{1,+}

5 ¹*Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS,*
6 *UMR 5558, Lyon, France*

7 ⁺*To whom corresponsce should be addressed: benjamin.loppin@univ-lyon1.fr*

8 **In most animals, the extreme compaction of sperm DNA is achieved after the massive re-**
9 **placement of histones with sperm nuclear basic proteins (SNBPs), such as protamines^{1,2}.**
10 **In some species, mature sperm chromatin is stabilized in its ultracompact state by a net-**
11 **work of disulfide bonds connecting cysteine residues present in SNBPs³. Although studies**
12 **in mammals have established that the reduction of these disulfide crosslinks is a prerequisite**
13 **for sperm nuclear decondensation at fertilization, the molecular mechanism involved in this**
14 **crucial process remains unclear⁴. Here, we show that the *Drosophila* maternal thioredoxin**
15 **Deadhead (DHD) is specifically required to unlock sperm chromatin at fertilization. We have**
16 **found that in *dhd* mutant eggs, the sperm nucleus fails to decondense and the replacement of**
17 **SNBPs with maternally provided histones is severely delayed, thus preventing the participa-**
18 **tion of paternal chromosomes in embryo development. We demonstrate that DHD dynami-**
19 **cally localizes to the sperm nucleus to reduce its disulfide targets and is then rapidly degraded**
20 **after fertilization. Our study challenges the idea that sperm nuclear decondensation is non-**
21 **specifically mediated by the reducing tripeptide glutathione, as suggested by mammalian sys-**
22 **tems. Instead, the implication of a dedicated thioredoxin in this unique, genome-wide redox**
23 **switch, illustrates the remarkable functional diversification of this ancient protein family.**

24 Thioredoxins are small redox proteins found in all organisms. They typically reduce disulfide

25 bonds on target proteins using a pair of cysteine thiol groups present in their conserved active Cys-
26 X-X-Cys site⁵. Thioredoxins play important metabolic, protective or signalling functions but the
27 molecular bases of their target specificity or functional specialization remain poorly understood⁶.
28 Three classical thioredoxins are found in *Drosophila melanogaster*. Trx-2 is a non-essential ubiqui-
29 tous protein that participates in the protection against oxidative stress^{7,8}, whereas TrxT and DHD
30 are sex-specific thioredoxins encoded by a pair of adjacent genes (Fig. 1a)⁹. While the role of
31 the testis-specific TrxT is unknown, DHD is specifically expressed in the female germline and is
32 essential for embryo development^{10,11}.

33 The original characterization of the *dhd* maternal effect phenotype indicated that, while the
34 vast majority of eggs were fertilized but failed to develop, about 5% of embryos reached late em-
35 bryogenesis and showed severe head developmental defects¹⁰. We noticed that these defects were
36 reminiscent of the incomplete head involution typically observed in haploid *Drosophila* embryos¹².
37 Indeed, we confirmed that embryos produced by homozygous *dhd*^{J5} mutant females (hereafter re-
38 ferred to as *dhd* eggs/embryos) were haploid and lacked chromosomes of paternal origin (Fig. 1b
39 and Extended Data Fig. 1). We then examined fertilization and zygote formation in *dhd* eggs to
40 follow the fate of paternal chromosomes. As for other insects, fertilization is internal in *Drosophila*
41 and the needle-shaped, extremely compact sperm nucleus immediately initiates decondensation af-
42 ter its delivery in the egg cytoplasm¹³. In wild-type eggs, during the second female meiotic division
43 (the earliest stage that can be practically observed), the sperm nucleus already appears roundish and
44 partially decondensed. In striking contrast, the sperm nucleus systematically retained its original
45 needle-shape in *dhd* eggs, showing no sign of decondensation (Fig. 1c). In embryos that initiated
46 mitoses, this phenotype persisted, resulting in haploid development with maternal chromosomes
47 (Fig. 1d).

48 *Drosophila melanogaster* sperm nuclei almost entirely lack histones and sperm DNA is in-

49 stead packaged with at least four SNBPs: the almost identical Mst35Ba and Mst35Bb paral-
50 gous proteins (also known as ProtA and ProtB, respectively), Mst77F and the recently identified
51 Prtl99C^{14,15}. Although these proteins are not homologous to mammalian protamines, they are
52 similarly involved in the extreme compaction of sperm DNA. At fertilization, SNBPs are rapidly
53 removed from the sperm nucleus and immediately replaced with maternally-provided histones¹⁶.
54 To analyse the process of SNBP/histone replacement in *dhd* eggs, we crossed mutant females with
55 males expressing GFP-tagged versions of the fly SNBPs^{14,17}. Strikingly, we observed that the
56 sperm nucleus systematically retained SNBPs in *dhd* eggs (Fig. 2a) and failed to incorporate his-
57 tones (Fig. 2b). Of note, this phenotype was identical in eggs from hemizygous *dhd*^{J5}/*Df(1)C70*
58 females (Extended Data Fig. 2 and Extended Data Table 1) and it was fully rescued by a transgene
59 containing the genomic *dhd* sequence¹⁰ (Fig. 1 and Fig. 2b). Interestingly, in *dhd* embryos that
60 had already completed the first zygotic cycle, limited histone deposition was eventually detected
61 in the sperm nucleus despite the persistence of SNBPs (Fig. 2b and Extended Data Fig. 2). To
62 demonstrate that the *dhd* phenotype was indeed caused by a delay in SNBP removal, we took
63 advantage of a knock-out allele of both *Mst35Ba/b* genes ($\Delta Mst35B$), which impacts sperm
64 chromatin architecture without significantly affecting male fertility¹⁸. Crossing *dhd*^{J5} mutant fe-
65 males with $\Delta Mst35B$ males did not restore embryo viability (Extended Data Table 1). However,
66 we observed a partial but clear rescue of sperm chromatin remodelling dynamics, as histone de-
67 position was detected before the end of female meiosis in this context (Fig. 2c). In a majority
68 of cycle 1 embryos, sperm nuclei appeared partially decondensed and Mst77F-GFP was replaced
69 with histones. Finally, in later embryos, the male nucleus frequently (76%) appeared as a mass of
70 chromosome-like structures, a phenotype rarely observed (7%) in the control cross (Fig. 2c). We
71 conclude that DHD is critically required for the rapid removal of SNBPs from the sperm nucleus
72 at fertilization.

73 In contrast to the conclusion of the original report¹⁰, we observed that female meiosis re-

74 sumed normally in *dhd* eggs (Fig. 1c). We however noticed that the resulting female pronucleus
75 frequently (78%) failed to migrate toward the sperm nucleus (Extended Data Fig. 3a). Pronu-
76 clear migration occurs along microtubules of the giant sperm aster, which is nucleated from the
77 paternally-inherited centrioles¹³. Interestingly, we observed that the sperm aster appeared abnor-
78 mally small in *dhd* eggs. Furthermore, the zygotic centrosome was poorly defined and remained
79 attached to the needle-shape nucleus (Extended Data Fig. 3b). In early zygotes, however, the
80 centrosomes duplicated and eventually detached from the sperm nucleus (Extended Data Fig. 3c).
81 Although we cannot exclude that DHD plays a direct role in centrosome maturation, the incomplete
82 penetrance of these secondary phenotypes suggests instead that the persistent sperm nuclear com-
83 paction interferes with the timely release of paternal centrioles in the egg cytoplasm, thus indirectly
84 affecting pericentriolar material recruitment, sperm aster formation and pronuclear migration.

85 SNBPs encompass a heterogeneous group of rapidly evolving chromosomal proteins charac-
86 terized by their enrichment in basic residues. In human and other placental mammals, arginine-rich
87 protamines additionally acquired several cysteine residues involved in the formation of intra- and
88 intermolecular disulfide bonds^{3,19,20}. At fertilization, these bonds must be reduced prior to the re-
89 moval of protamines. To explore the possibility that DHD could perform such a function, we first
90 evaluated the existence of a similar sperm chromatin organization in *Drosophila*. Remarkably, all
91 four *Drosophila* SNBPs show conserved, regularly spaced cysteine residues, which are otherwise
92 rare in chromosomal proteins^{14,15,21} (Extended Data Fig. 4). We then tested the effect of a disul-
93 fide reducing agent (dithiothreitol - DTT) on the dynamics of sperm nuclear decondensation in
94 vitro. Whereas sperm nuclei remained basically inert in the control buffer, incubation with DTT
95 induced nuclear decondensation and SNBP removal (Fig. 3a,b). This treatment also increased the
96 amount of free thiol groups in sperm nuclei after 10 minutes, as measured using the fluorescent
97 marker monobromobimane (mBrB)(Fig. 3c). Furthermore, after 30 minutes, mBrB specifically
98 accumulated over nuclear regions that still contained Mst35Ba-GFP, but not over decondensed,

99 SNBP-free regions (Fig. 3d). Taken together, these observations strongly suggest that *Drosophila*
100 SNBPs maintain sperm nuclear compaction through the formation of disulfide bridges.

101 Finally, we reasoned that any direct implication of DHD in the reduction of SNBP disulfide
102 crosslinks would require its preloading in eggs and immediate targeting to the sperm nucleus at
103 fertilization. Using a specific polyclonal antibody, we indeed confirmed that DHD was specifically
104 expressed in ovaries and then maternally deposited in eggs (Fig. 4a,b). At fertilization, DHD ap-
105 peared very abundant and homogeneously distributed throughout the egg cytoplasm. Surprisingly
106 however, DHD became rapidly undetectable after the completion of the first zygotic cycle, thus
107 confirming that this thioredoxin plays no other role after zygote formation (Fig. 4c). The very
108 fast removal of SNBPs from the fertilizing sperm nucleus, which is completed before egg deposi-
109 tion¹³, precluded any direct observation of DHD during this process. In an attempt to circumvent
110 this difficulty, we generated transgenic flies expressing a mutated version of DHD (DHD^{C34S}), in
111 which the replacement of the second cysteine residue of the Cys-X-X-Cys site is predicted to trap
112 the thioredoxin as a covalent intermediate species with its target proteins⁵ (Fig. 4d). In contrast
113 to the fully functional *P[dhd^{WT}]* control transgene, the *P[dhd^{C34S}]* transgene did not rescue the
114 fertility of *dhd* mutant females despite normal expression (Extended Data Table 1 and Extended
115 Data Fig. 5). As expected, in *dhd* eggs rescued with the control transgene, the sperm nucleus ap-
116 peared normally decondensed and DHD was only detected in the cytoplasm. Strikingly however,
117 in about 30% of *dhd; P[dhd^{C34S}]* eggs, we observed DHD^{C34S} in the needle-shaped sperm nucleus
118 (Fig. 4e and Extended Data Fig. 6), thus demonstrating that DHD directly reduces target disulfides
119 present on sperm chromatin. The absence of sperm nuclear localization of DHD^{C34S} in the rest of
120 observed eggs additionally suggests that the trapped thioredoxin is rapidly degraded.

121 The stabilization of *Drosophila* sperm chromatin with disulfide bonds supports the idea that
122 this remarkable innovation emerged independently in distantly-related animal groups with the se-

123 lective acquisition of cysteine residues in SNBPs^{20,22,23}. Interestingly, *dhd* is apparently the most
124 recent thioredoxin gene in *Drosophila* and likely originated after the duplication of the ancestral
125 *Trx-2* gene²⁴. It is thus tempting to propose that the emergence of this highly specialized egg
126 thioredoxin could reflect the adaptation of the oocyte to the rapid evolution of sperm chromatin
127 architecture.

128 In mammals, the tripeptide antioxidant glutathione is abundant in oocytes and plays an im-
129 portant role in sperm nuclear decondensation^{4,25,26}. Whether glutathione directly reduces SNBP
130 disulfides in vivo or instead activates a disulfide reductase is still unresolved²⁷. *Drosophila* is
131 unusual in lacking the highly conserved glutathione reductase enzyme and instead relies on the
132 thioredoxin system to maintain glutathione in its reduced form²⁸. Our demonstration that DHD
133 directly targets sperm chromatin is however a strong indication that glutathione is not involved in
134 sperm nuclear decondensation in flies. Future work will aim at understanding how the structural
135 features of DHD underlie its crucial specialization at the onset of embryo development.

136 Methods

137 **Fly stocks** Flies were raised at 25C on standard medium. w1118 strain was used as a wild-type
138 control. *Df(1)J5/FM7c* and *Df(1)J5/Df(1)J5*; *CyO*, *P[dhd^{XhoI/XhoI}, w+]/+* were kindly
139 given by H. Salz¹⁰. The boundaries of the genomic fragment carried by *P[dhd^{XhoI/XhoI}, w+]*
140 transgene (see Fig. 1A) were verified by PCR and DNA sequencing. We also used the following
141 strains: *P[eGFP-cid]*²⁹, Δ *Mst35B*¹⁸, *P[Mst35Ba-eGFP]*¹⁷, *P[Mst77F-eGFP]*¹⁴ and *P[Dj-*
142 *GFP]*³⁰. *Df(1)JC70*, a deficiency of the cytogenetic region 4C11-5A4 which does not comple-
143 ment the female sterility associated with *dhd^{J5}* (see Extended Data Table 1), was obtained from the
144 Bloomington *Drosophila* stock center (# 944). *pW8-attB[dhd^{WT}]* and *pW8-attB[dhd^{C34S}]* con-
145 structions (see below) were generated by PhiC31 site-specific mediated insertion transgenesis³¹
146 into the *PBac{y+-attP-3B}VK00031* platform (62E1).

147 **Fertility tests** Virgin females of different genotypes were aged for 3 days at 25°C in presence of
148 males and were then allowed to lay eggs on regular medium for 24 hr. Embryos were counted
149 and then let to develop at least 36 hr at 25°C in order to complete their development. Unhatched
150 embryos were counted to determine hatching rates.

151 **Plasmid constructs** *pW8-attB[dhd^{WT}]*

152

153 A 4303 pb genomic fragment (*dhd^{WT}*) containing the *dhd* coding sequence and upstream
154 (1932 bp) and downstream (2047 bp) regions was amplified from wild-type genomic DNA using
155 the following primers: 5'-GCCGGTACCCCATATCCCTCCCATATCC-3' and 5'-GCCGGATCCG
156 CTAATGGAATCGCAATCGT-3' and cloned into the *pW8-attB* plasmid³².

157 *pW8-attB[dhd^{C34S}]*

158 The *dhd^{C34S}* fragment was obtained by *in vitro* mutagenesis of *dhd^{WT}* using the QuickChange
159 II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) with the following primers: 5'-CATGG
160 TGTGGTCCCAGCAAGGAAATGGAGAGC-3' and 5'-GCTCTCCATTTCTTGCTGGGACCA
161 CACCATG-3' and cloned into *pW8-attB* plasmid³².

162 **DHD antibody production** A rabbit polyclonal anti-DHD was raised against a mixture of three
163 synthetic peptides (DHD-1: MASVRTMNDYHKRIEAADC, DHD-2: CKEMESTVKSLARKYS
164 SKA, DHD-3: CAGADEHKLTNMMAKLVKA). DHD antibody was purified by affinity chro-
165 matography.

166 **Embryos preparation and imaging** Early (0-30 min) and late embryos (0-120 min) were col-
167 lected on agar plates. Embryos were dechorionated in bleach, fixed in 1:1 heptane:methanol and
168 stored at -20°C. Immunostainings were performed as previously described¹². Primary antibodies
169 used were: mouse monoclonal anti-GFP (Roche # 118144600001; 1:200), rabbit polyclonal anti-

170 H3K27me2 (Millipore # 07-452; 1:500), mouse monoclonal anti-histones (Millipore # MABE71;
171 1:1000), rat monoclonal anti- α -Tubulin (Abcam # ab6160; 1:50), rabbit polyclonal anti-DHD
172 (1:1000). Secondary antibodies were used at a 1:1000 dilution and included goat anti-mouse and
173 goat anti-rabbit antibodies conjugated to DyLight (Thermoscientific) as well as goat anti-rat and
174 goat anti-mouse conjugated to AlexaFluor (Jackson ImmunoResearch). Images were acquired on
175 a LSM 510 META (Zeiss) or a TCS SP5X (Leica) confocal microscope and the images were
176 processed with ImageJ and Inkscape softwares.

177 **Preparation and imaging of sperm nuclei** Virgin males were collected five days before dissec-
178 tion in 1X PBS-1% Triton X100. Seminal vesicles were dissected and torn open with tweezers to
179 release spermatozoa on polylysine slides. Slides were first incubated at room temperature in 1X
180 PBS-1% Triton X100 for 30 min, air dried and then incubated in 1X PBS-2mM DTT for 0, 1, 5, 10,
181 15 or 30 min at room temperature. Slides were quickly washed in 1X PBS, incubated for 30 min at
182 room temperature in 1mM mBrB (Millipore # 596105), quickly washed and mounted in mounting
183 medium (Dako) containing propidium iodide (Sigma). Imaging and fluorescence quantification of
184 single sperm nuclei Sperm nuclei were imaged on a TCS SP5 X confocal microscope (Leica) with
185 the same settings. The images were analysed using the ImageJ 1.48 software to measure the total
186 quantity of fluorescence. Each nucleus was counted as an individual object in a defined area and
187 the background signal outside the nucleus was used to determine the fluorescence baseline. Within
188 the selected area, the number of pixels for each value of fluorescence (ranging from the baseline
189 to 255) was counted. Finally, the total quantity of fluorescence was calculated with the following
190 formula:

$$\left[\sum_{i=x}^{255} n(i) \times i \right] \div 10000,$$

191 in which i is the fluorescence value, x is the baseline fluorescence and $n(i)$ is the number of pixels
192 for the fluorescence value i . PI and GFP signals were quantified in the same experiment and mBrB
193 signal in an independent one. Each experiment was performed twice and gave similar results.
194 Statistical tests were performed using Prism (Graphpad) software.

195 **Western Blotting** Ovaries or testes from 30 individuals were collected and homogenized in lysis
196 buffer [20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 5% Glycerol, 0.05%
197 NP40 and protease inhibitors (Roche)]. The protein extracts were cleared by centrifugation and
198 stored at -80°C . Eggs were collected every 30 min and incubated for 0, 15 or 30 min at 25°C .
199 They were then dechorionated in bleach and quickly frozen in liquid nitrogen. Protein extracts
200 were prepared from ca. 10 L of embryos as described for gonads. Electrophoresis was carried
201 out on 5-20% gradient SDS polyacrylamide gel and Western blotting was performed following
202 standard procedures using the ECL prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare).
203 The antibodies were: mouse monoclonal anti- α -Tubulin (Sigma # T9026, 1:500), rabbit poly-
204 clonal anti-DHD (1:1000), HRP-conjugated goat anti-mouse (Biorad # 170-5047; 1:50 000) and
205 peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Thermoscientific # 32460; 1:20 000).

206 **RNA probe synthesis** A 436 bp dhd sequence was amplified using primers containing the T3 or
207 T7 promoter sequences (T3-dhd-f: 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGCGACGACAAGCTAATC
208 GTGC-3', T7-dhd-r: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTACCCACATCTCGCGCTTAC-3'). A
209 DIG labelled RNA antisense probe was directly transcribed from the purified PCR amplicon with
210 T7 RNA polymerase and a labelling mix (Roche).

211 **RNA In Situ Hybridization** Ten pairs of ovaries from 1-5 day-old virgin females were dissected
212 in 1X PBS-0.2% Tween 20 (PBST), fixed for 30 min in a 1:1 mixture of 3.7% formaldehyde-
213 PBST:heptane. After PBST washings, the tissues were post-fixed with 3.7% formaldehyde-PBST
214 for 10 min, then washed in PBST, and sequentially incubated in 1:1 PBST/ hybridization buffer

215 [HB: 50% formamide, 5X SSC, 0.1% Tween 20, pH 6.5] for 10 min, in 100% HB for 10 min, and
216 finally in HB containing 100 g/mL tRNA and 50 g/mL heparin, for 1 hr at 65°C. Then, the probe was
217 added before overnight incubation at 65°C. The ovaries were then washed twice with HB at 65°C,
218 and once with 1:1 PBST:HB at 65°C. DIG-labelled RNA probes detection was performed using
219 anti-DIG AP antibody (Roche) and NBT/BCIP colorimetric detection was carried out according to
220 manufacturer instructions (Roche). Ovaries were mounted in mounting medium (Dako) and were
221 imaged using a Z1 microscope (Zeiss).

222 **Acknowledgements** We are grateful to Helen Salz for her generous gift of the dhd mutant stock. Ad-
223 ditional stocks were kindly provided by Cristina Rathke, John Belote and the Bloomington Drosophila
224 Stock Center. We thank Grard Benoit for his critical reading of the manuscript. Confocal microscopy was
225 performed at the Centre Technologique des Microstructures and the Centre d'Imagerie Quantitative Lyon
226 Est (UCBL Lyon1). This work was supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Médicale
227 (DEP20131128256) and a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ZygoPat-ANR-12-BSV6-
228 0014).

229 **Competing Interests** The authors declare that they have no competing financial interests.

230 **Correspondence** Correspondence and requests for materials should be addressed to Benjamin Loppin (email:
231 benjamin.loppin@univ-lyon1.fr).

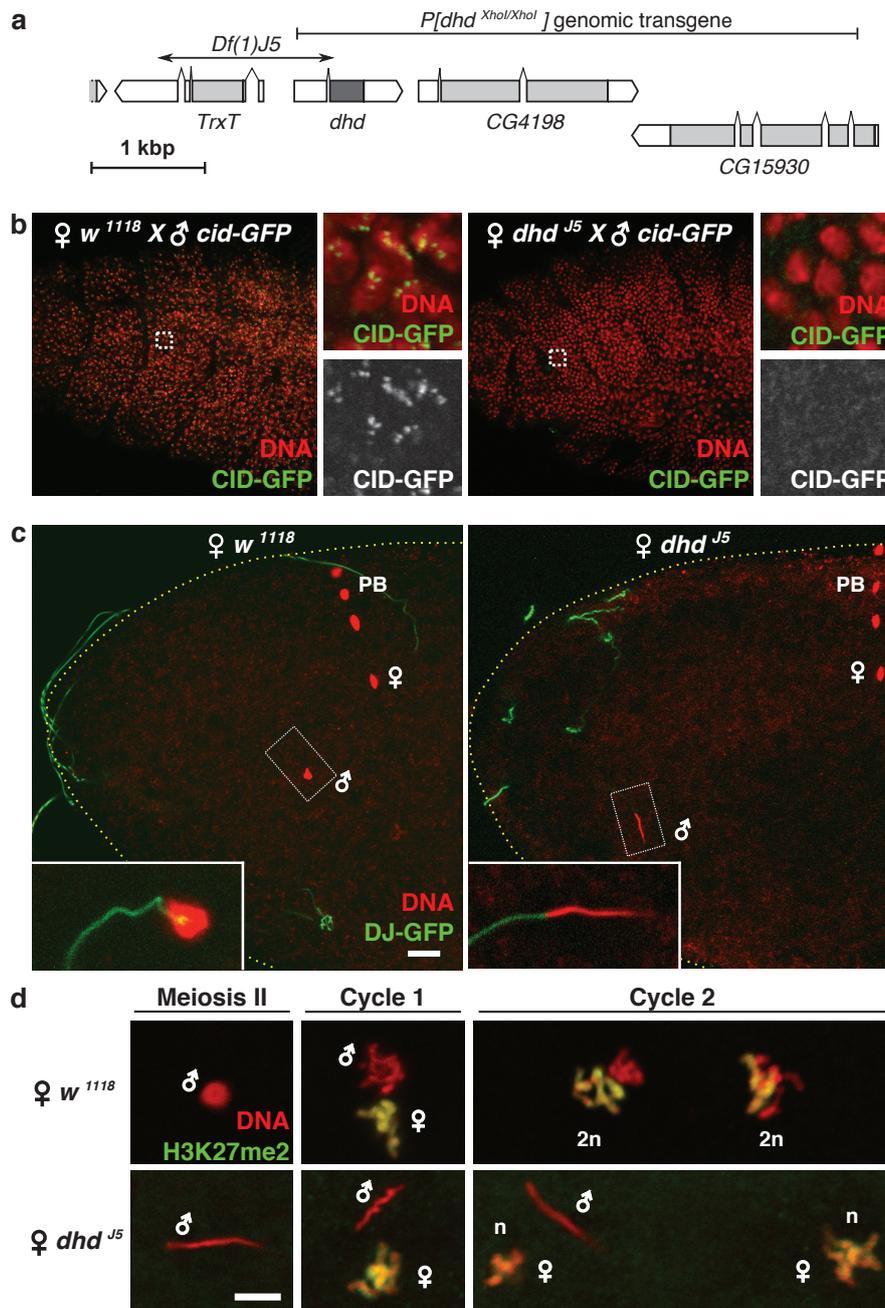


Figure 1: DHD is required for sperm nuclear decondensation.

a, The *dhd* genomic region (4F4, X chromosome) showing the genomic $P[dhd^{XhoI/XhoI}]$ rescue transgene and the $Df(1)J5$ deletion that disrupts *dhd* and *TrxT*. **b**, Zygotic expression of the paternally-inherited *cid-GFP* transgene²⁹ (which expresses a GFP-tagged centromeric histone) is detected in late control embryos but not in *dhd* embryos. **c**, At fertilization, the sperm nucleus (inset) fails to decondense in *dhd* eggs. The sperm flagellum is stained with the Don Juan-GFP marker (green)³⁰. DNA is in red. Note that the four female meiotic products are visible in both eggs. Scale bar: 10 μm . **d**, The sperm nucleus does not participate in the early zygotic mitoses in *dhd* embryos (see also Extended Data Fig. 1). Maternal chromosomes are visualized with anti-H3K27me2 staining (green). PB: polar bodies. Scale bar: 5 μm .

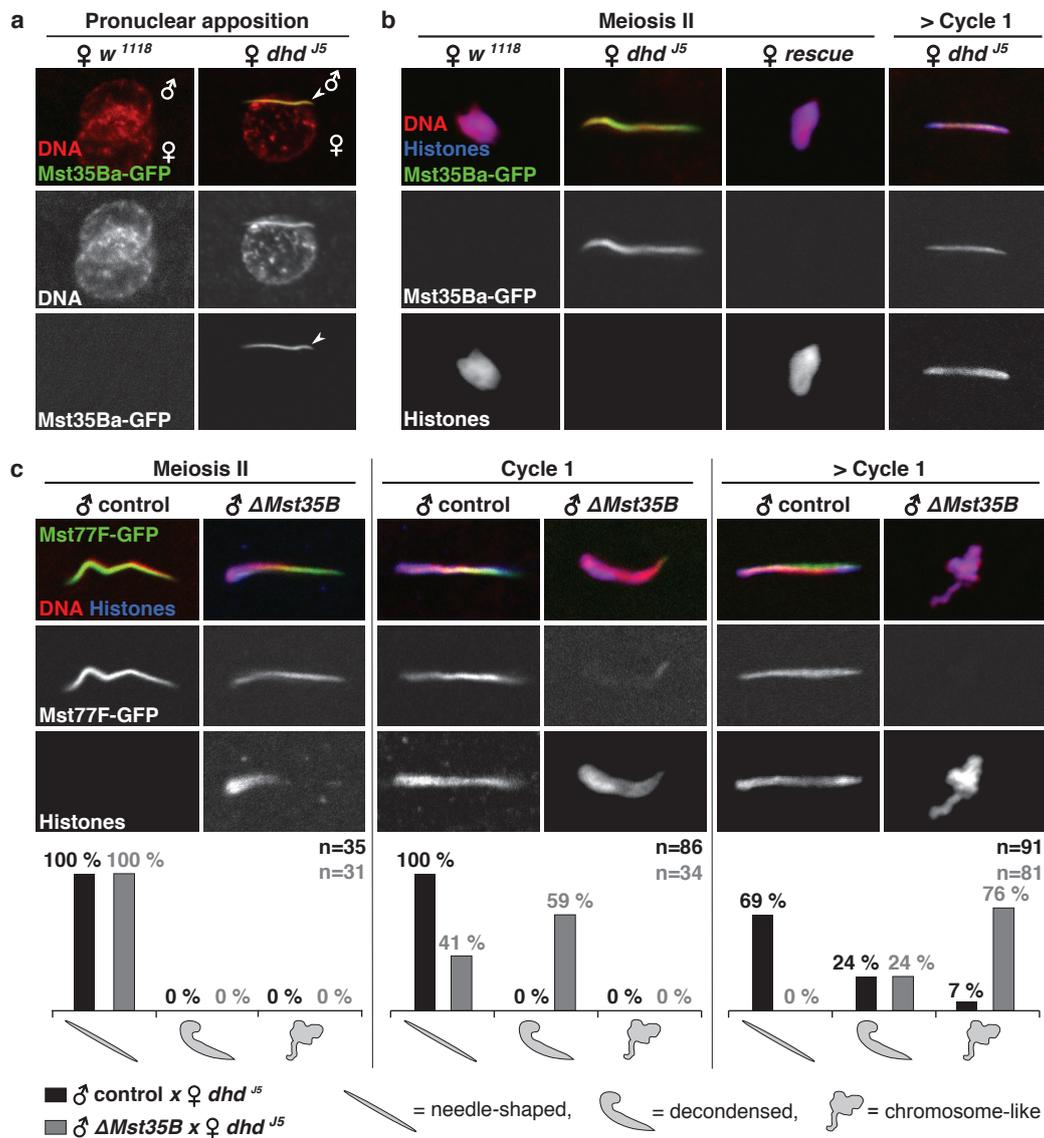


Figure 2: DHD controls the timely removal of SNBPs at fertilization.

a, Pronuclear apposition in eggs from control (*w¹¹¹⁸*) or *dhd^{J5}* females mated with transgenic *Mst35Ba-GFP* males. The sperm nucleus (arrowhead) in *dhd* eggs still contains Mst35Ba-GFP (green). **b**, Eggs or cycle 1 embryos from *w¹¹¹⁸*, *dhd^{J5}* or *dhd^{J5}; P[dhd^{XhoI/XhoI}]* (rescue) females fertilized by *Mst35Ba-GFP* males. The replacement of SNBPs with histones is severely delayed in *dhd* eggs and the phenotype is fully rescued by the genomic transgene. **c**, Dynamics of SNBP/histone replacement in *dhd* eggs fertilized by control (*Mst77F-GFP*) or mutant ($\Delta Mst35B$; *Mst77F-GFP*) sperm. Distribution of phenotypic classes is shown for each stage. ”> Cycle 1” designates embryos with the polar body condensed into a rosette of chromosomes.

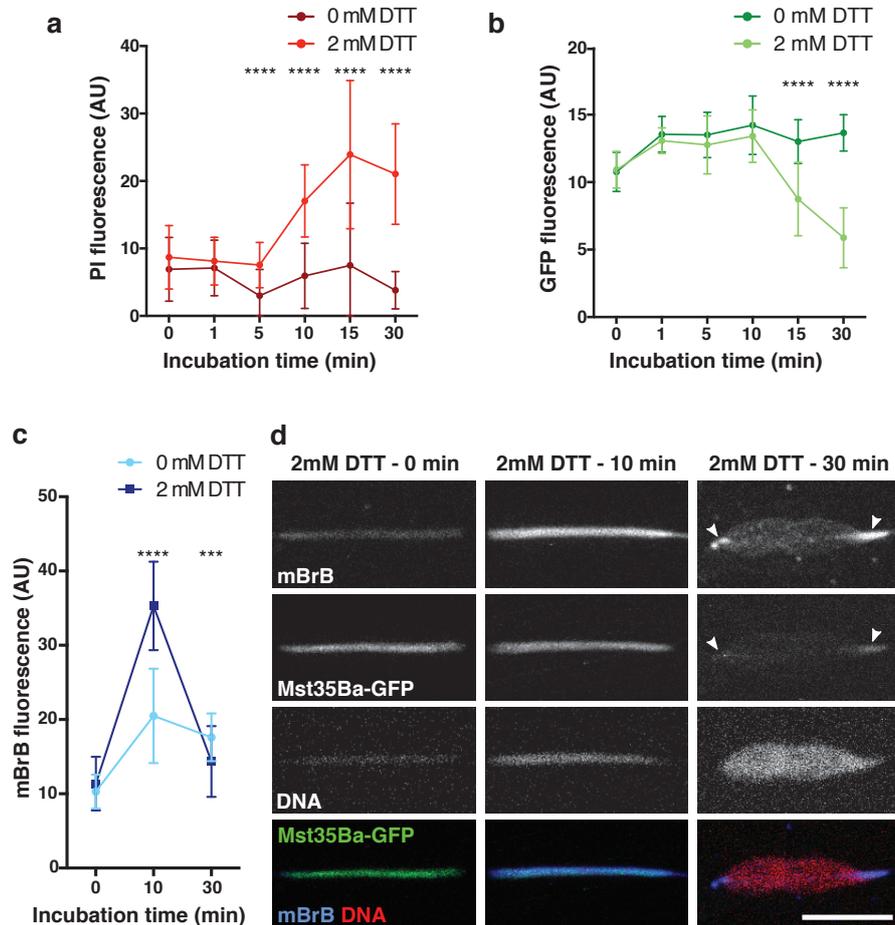


Figure 3: DTT induces SNBP eviction and sperm nuclear decondensation in vitro.

Mst35Ba-GFP sperm were incubated with the reducing agent DTT for the indicated time and stained with propidium iodide (PI, red) and mBrB (blue). **a-c**, Quantification of PI (a), native GFP (b) and mBrB (c) fluorescent signals in representative experiments (Mann-Whitney test. ***: $P < 0.001$. ****: $P < 0.0001$). Error bars indicate SD calculated for at least 29 analysed nuclei for each time point. **d**, Confocal images of *Mst35Ba-GFP* sperm nuclei incubated with DTT for the indicated time. Arrowheads indicate condensed nuclear regions positive for both mBrB and Mst35Ba-GFP Scale bar: 5 μm .

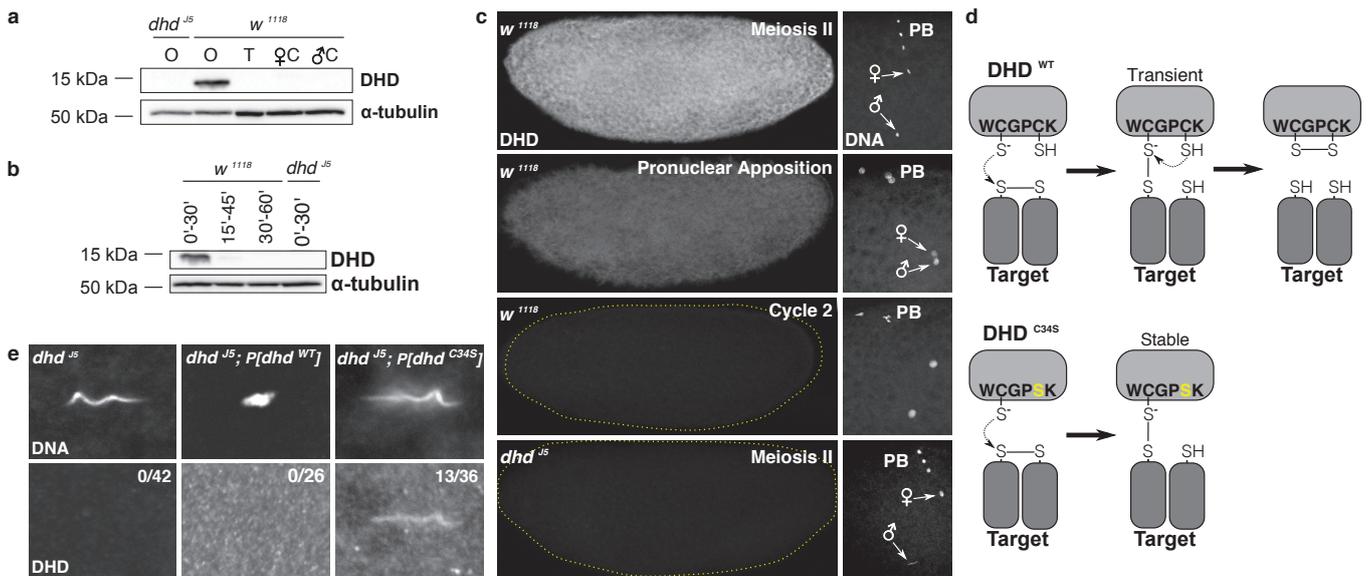
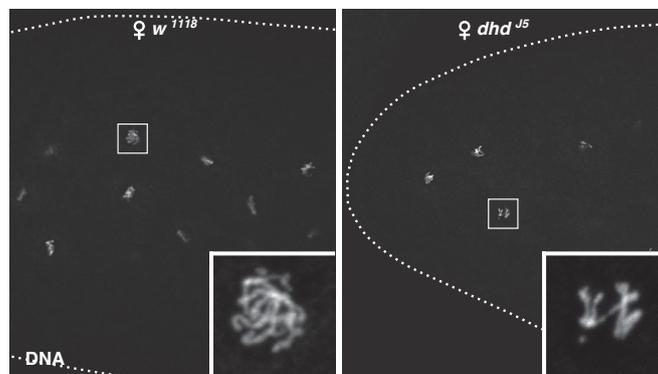


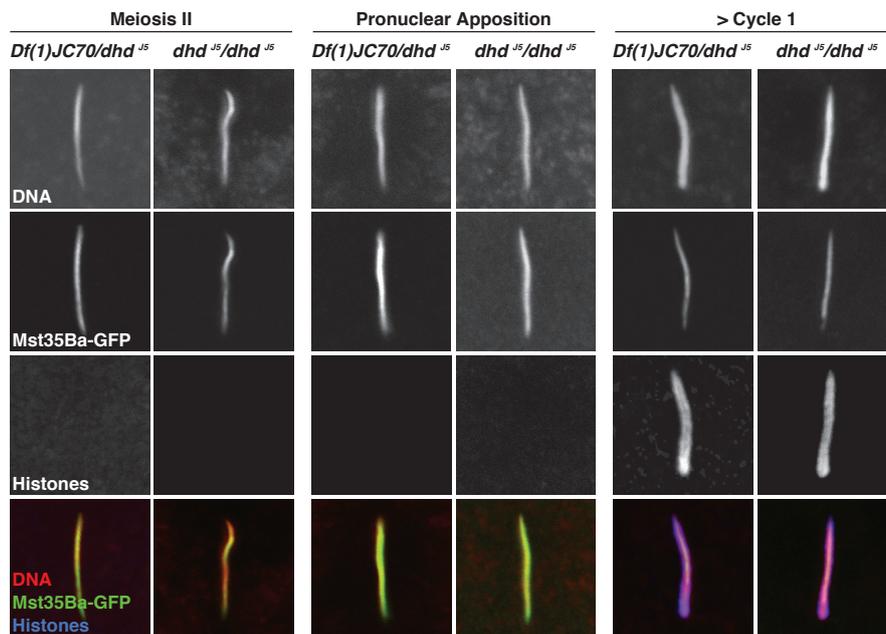
Figure 4: DHD is specifically targeted to the sperm nucleus at fertilization.

a-b, Western blot analyses of DHD expression in adult tissues (a) or embryos collected at the indicated time windows (b). α -tubulin was used as loading control. O: ovaries, T: testis, C: carcasses. **c**, Confocal images of eggs or embryos laid by w^{1118} or dhd^{J5} females and stained for DHD (left) and DNA (right). A close-up of the region containing the nuclei is shown on the right (arrows: male and female nuclei; PB: polar bodies). **d**, Strategy for trapping DHD on its protein targets: the replacement of the resolving cysteine with a serine (C34S) in the Cys-X-X-Cys motif is predicted to stabilize the mixed-disulfide between DHD and its target. **e**, Sperm nuclei in eggs laid by females of the indicated genotypes and stained as in (c) (see also Extended Data Fig. 6). The number of DHD-positive sperm nuclei is indicated for each genotype.



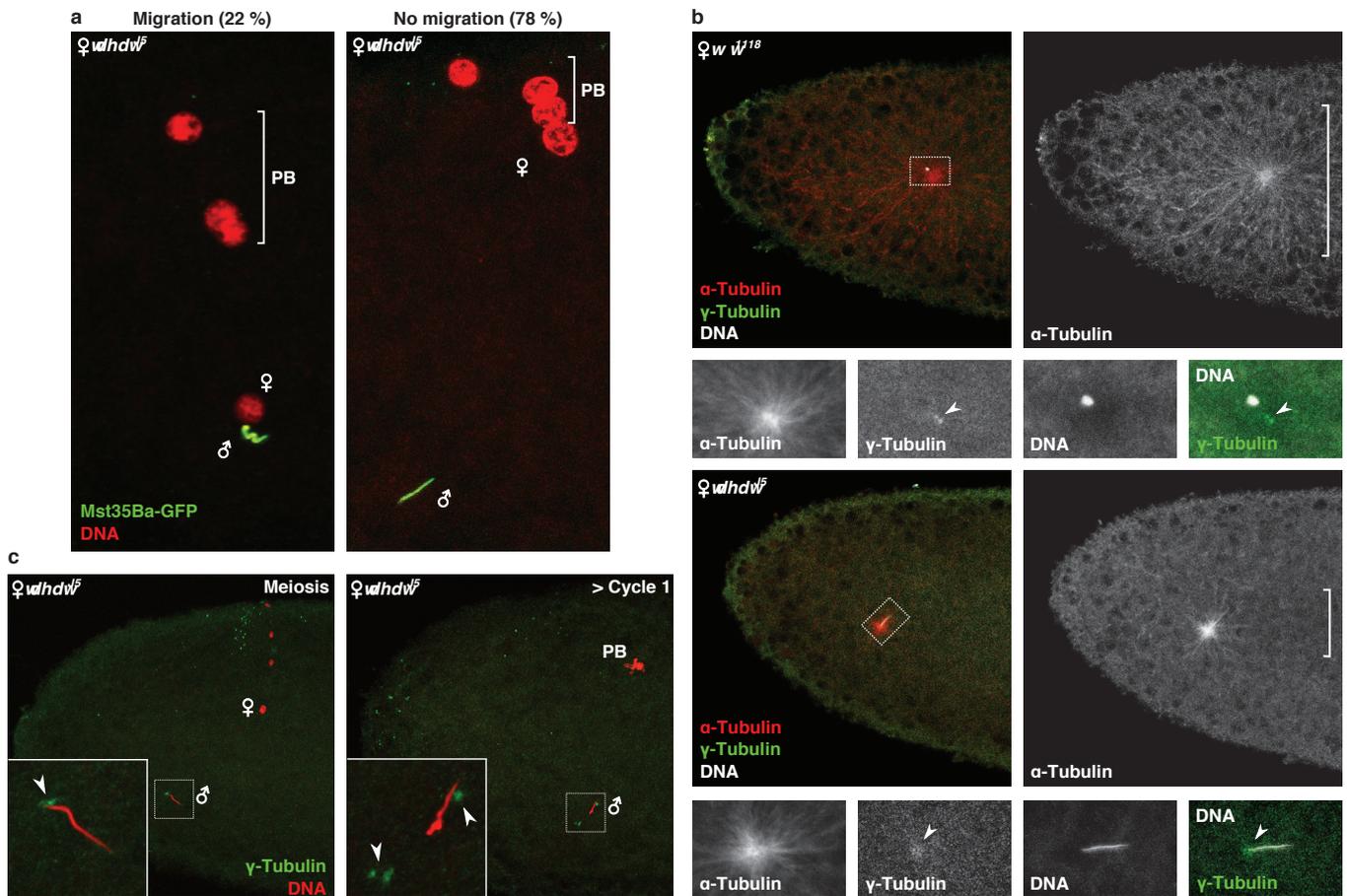
Extended Data Figure 1: Haploid development of *dhd* embryos.

Confocal images of preblastoderm embryos from *w*¹¹¹⁸ and *dhd*^{J5} females stained for DNA. *dhd* embryo contain haploid (n=4) nuclei.



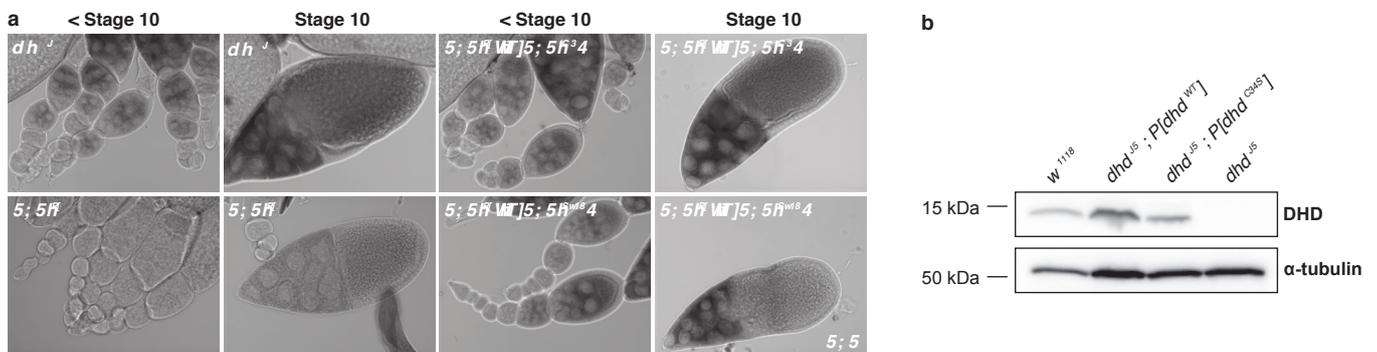
Extended Data Figure 2: Eggs from *Df1(1)JC70/dhd^{J5}* and in *dhd^{J5}/dhd^{J5}* females display identical phenotypes.

Confocal images of male nuclei from eggs laid by hemizygous *Df1(1)JC70/dhd^{J5}* or homozygous *dhd^{J5}/dhd^{J5}* females mated with *Mst35Ba-GFP* transgenic males. Eggs or embryos at the indicated stages were stained for GFP (green), histones (blue) and DNA (red).



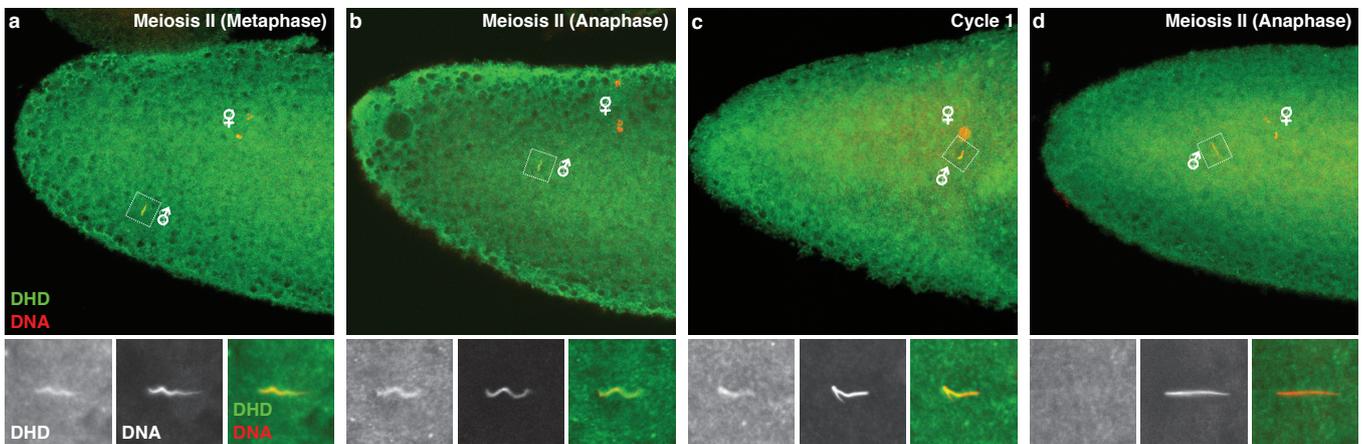
Extended Data Figure 3: Sperm aster formation and pronuclear migration are affected in *dhd* eggs.

a, Left: a *dhd* egg at pronuclear apposition. The three polar bodies (PB) are visible. Right: a *dhd* egg in which the female pronucleus failed to migrate and remained associated with the polar bodies. The respective percentage of each phenotype is indicated (n=586). Sperm nuclei were visualized using a *Mst35Ba-GFP* transgene (green) and DNA was stained with propidium iodide (red). **b**, Eggs in telophase of meiosis II from *w*¹¹¹⁸ and *dhd*^{J5} females stained for DNA (white), α -tubulin (red) and γ -tubulin (green) to reveal nuclei, the sperm aster and the centrosomes, respectively (the female meiotic products are not visible on these confocal sections). In *w*¹¹¹⁸ eggs, the anti- γ -tubulin stains the zygotic centrosome (which contains a pair of sperm centrioles) at proximity of the male pronucleus (100%, n=25; arrowhead, inset). In *dhd* eggs, the centrosome appears diffused and almost systematically attached (98%, n=53) to the compacted sperm nucleus (arrowhead, inset). The brackets indicate the extent of the sperm aster in *w*¹¹¹⁸ and *dhd* eggs. **c**, Left: a *dhd* egg in telophase of meiosis II. Right: a *dhd* embryo after the end of cycle 1. The centrosomes (arrowheads, inset) have duplicated and detached from the male nucleus. The rosette of polar body (PB) chromosomes is visible. Green: γ -tubulin, red: DNA.



Extended Data Figure 5: Expression of the $P[dhd^{WT}]$ and $P[dhd^{C34S}]$ transgenes in ovaries.

a, *dhd* RNA *in situ* hybridization and **b**, Western blot analysis of DHD in w^{1118} , dhd^{J5} , $dhd^{J5}; P[dhd^{WT}]$ and $dhd^{J5}; P[dhd^{C34S}]$ ovaries.



Extended Data Figure 6: DHD^{C34S} is specifically trapped on the sperm nucleus.

Confocal images of eggs from *dhd^{J5}*; *P[dhd^{C34S}]* females stained for DHD (green) and DNA (red). Examples of eggs with a sperm nucleus positive (**a-c**, 36%, n=36) or negative **d**, for DHD.

Genotype of females	Genotype of males	No. of embryos	Hatching rate
w^{1118}	w^{1118}/Y	264	90.9
$w^*Df(1)dhd^{J5}/w^*Df(1)dhd^{J5}$	w^{1118}/Y	577	0
$Df(1)JC70/w^*Df(1)dhd^{J5}$	w^{1118}/Y	489	0
$w^*Df(1)dhd^{J5}/w^*Df(1)dhd^{J5}; CyO, P[dhd^{XhoI/XhoI}, w^+]/+$	w^{1118}/Y	136	80.1
$w^*Df(1)dhd^{J5}/w^*Df(1)dhd^{J5}$	$w^{1118}/Y; \Delta Mst35B/\Delta Mst35B$	328	0
$w^*Df(1)dhd^{J5}/w^*Df(1)dhd^{J5}; P[dhd^{WT}, w^+]/P[dhd^{WT}, w^+]$	w^{1118}/Y	251	80.5
$w^*Df(1)dhd^{J5}/w^*Df(1)dhd^{J5}; P[dhd^{C34S}, w^+]/P[dhd^{C34S}, w^+]$	w^{1118}/Y	955	0.2

Extended Data Table 1: Fertility tests.

The $Df(1)dhd^{J5}$ deficiency and the $P[dhd^{XhoI/XhoI}]$ genomic rescue transgene are described in Fig. 1. $Df(1)JC70$ is a large deficiency uncovering the dhd locus. $\Delta Mst35B$ mutation is described in¹⁸. $P[dhd^{WT}]$ and $P[dhd^{C34S}]$ transgenes are described in Fig 4.

232 **References**

- 234 [1] Miller, D., Brinkworth, M., and Iles, D. Reproduction **139**(2), 287–301 (2010).
233
- 235 [2] Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S.
236 FEBS Journal **277**(3), 599–604 (2010).
- 237 [3] Balhorn, R. The Journal of Cell Biology **93**(2), 298–305 (1982).
- 238 [4] Zirkin, B. R., Perreault, S. D., and Naish, S. J. In The Molecular Biology of Fertilization,
239 91–114. Heide Schatten (1989).
- 240 [5] Collet, J.-F. and Messens, J. Antioxidants & Redox Signaling **13**(8), 1205–1216 (2010).
- 241 [6] Berndt, C., Schwenn, J.-D., and Lillig, C. H. Chem. Sci. (2015).
- 242 [7] J. Svensson, M. and Larsson, J. Hereditas **144**(1), 25–32 (2007).
- 243 [8] Tsuda, M., Ootaka, R., Ohkura, C., Kishita, Y., Seong, K.-H., Matsuo, T., and Aigaki, T.
244 FEBS Letters **584**(15), 3398–3401 (2010).
- 245 [9] Svensson, M. J., Chen, J. D., Pirrotta, V., and Larsson, J. Chromosoma **112**(3), 133–143
246 (2003).
- 247 [10] Salz, H. K., Flickinger, T. W., Mittendorf, E., Pellicena-Pall, A., Petschek, J. P., and Albrecht,
248 E. B. Genetics **136**(3), 1075–1086 (1994).
- 249 [11] Pellicena-Pall, A., Stitzinger, S. M., and Salz, H. K. Mechanisms of Development **62**(1),
250 61–65 (1997).
- 251 [12] Loppin, B., Berger, F., and Couble, P. Dev. Biol. **231**(2), 383–396 (2001).
- 252 [13] Loppin, B., Dubruille, R., and Horard, B. Open Biology **5**(8), 150076 (2015).

- 253 [14] Jayaramaiah Raja, S. and Renkawitz-Pohl, R. Molecular and Cellular Biology **25**(14), 6165–
254 6177 (2005).
- 255 [15] Eren-Ghiani, Z., Rathke, C., Theofel, I., and Renkawitz-Pohl, R. Cell Reports **13**(11), 2327–
256 2335 (2015).
- 257 [16] Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurenon, A., Karr, T. L., and Couble, P. Nature
258 **437**(7063) (2005).
- 259 [17] Manier, M. K., Belote, J. M., Berben, K. S., Novikov, D., Stuart, W. T., and Pitnick, S.
260 Science **328**(5976), 354–357 (2010).
- 261 [18] Tirmarche, S., Kimura, S., Sapey-Triomphe, L., Sullivan, W., Landmann, F., and Loppin, B.
262 G3 **4**(11), 2241–2245 (2014).
- 263 [19] Bedford, J. M. and Calvin, H. I. J. Exp. Zool. **188**(2), 137–155 (1974).
- 264 [20] Lewis, J. D., Song, Y., de Jong, M. E., Bagha, S. M., and Ausi, J. Chromosoma **111**(8),
265 473–482 (2003).
- 266 [21] Alvi, Z. A., Chu, T.-C., Schawaroch, V., and Klaus, A. V. Protein Pept. Lett. **20**(1), 17–35
267 (2013).
- 268 [22] Oliva, R. and Dixon, G. H. Journal of Molecular Evolution **30**(4), 333–346 (1990).
- 269 [23] Gimenez-Bonafé, P., Ribes, E., Sautire, P., Gonzalez, A., Kasinsky, H., Kouach, M., Sautire,
270 P.-E., Ausió, J., and Chiva, M. European Journal of Cell Biology **81**(6), 341–349 (2002).
- 271 [24] Svensson, M. J., Stenberg, P., and Larsson, J. Development Genes and Evolution **217**(9),
272 639–650 (2007).
- 273 [25] Perreault, S. D., Barbee, R. R., and Slott, V. L. Dev. Biol. **125**(1), 181–186 (1988).

- 274 [26] Sutovsky, P. and Schatten, G. Biology of Reproduction **56**(6), 1503–1512 (1997).
- 275 [27] Li, J., Huan, Y., Xie, B., Wang, J., Zhao, Y., Jiao, M., Huang, T., Kong, Q., and Liu, Z.
276 Reproduction **148**(4), 367–375 (2014).
- 277 [28] Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Mller, H.-M., Botella-Munoz, J.,
278 Schneuwly, S., Schirmer, R. H., and Becker, K. Science **291**(5504), 643–646 (2001).
- 279 [29] Schuh, M., Lehner, C. F., and Heidmann, S. Curr. Biol. **17**(3) (2007).
- 280 [30] Santel, A., Winhauer, T., Blmer, N., and Renkawitz-Pohl, R. Mech. Dev. **64**(1-2), 19–30
281 (1997).
- 282 [31] Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. Proc. Natl. Acad. Sci.
283 U.S.A. **104**(9), 3312–3317 (2007).
- 284 [32] Dubruille, R., Orsi, G. A., Delabaere, L., Cortier, E., Couble, P., Marais, G. A. B., and
285 Loppin, B. Current Biology **20**(23), 2090–2099 (2010).

2.4 Résultats supplémentaires

2.4.1 DHD ne semble pas contrôler le recyclage du glutathion oxydé

Malgré les résultats de l'étude du mutant *dhd⁵*, nous ne pouvions pas exclure que DHD soit impliquée dans le recyclage du glutathion et que cette molécule puisse jouer un rôle dans la décondensation du noyau. Afin de tester l'impact de l'absence de cette thiorédoxine sur le niveau de réduction du stock de glutathion dans l'oocyte, j'ai tiré parti d'un senseur du glutathion sensible à son état de réduction. Ce senseur est la protéine fusion cyto-Grx1-roGFP2, qui a été construite et décrite dans [Albrecht et al., 2011] (Figure 20). Ce senseur est composé de la glutarédoxine 1 cytoplasmique (cyto-Grx1), qui réagit avec le glutathion et de la roGFP2, une GFP qui peut être excitée à 405 nm ou 488 nm selon que le glutathion est sous sa forme oxydée ou réduite.

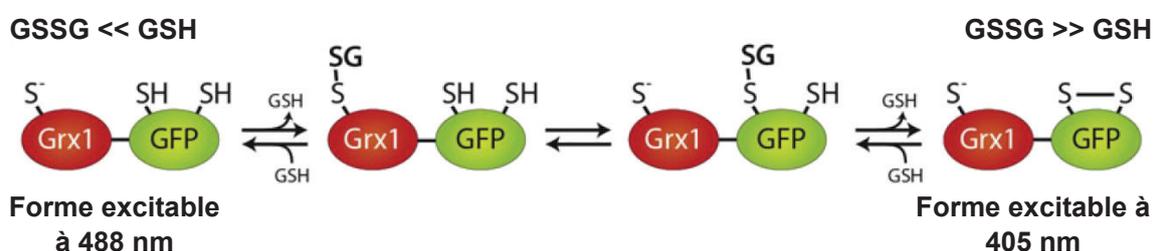


FIGURE 20. **Fonctionnement du senseur cyto-Grx1-roGFP2.**

La glutarédoxine 1 (Grx1) permet d'augmenter la spécificité au glutathion de la GFP sensible à l'état oxydoréducteur (roGFP2). Cette GFP est excitable à deux longueurs d'ondes différentes, 488 nm ou 405 nm, selon que son environnement est riche respectivement en GSH ou en GSSG. Le ratio des signaux collectés en excitant à 405 nm et à 488 nm est représentatif du ratio des différentes formes du glutathion (GSSG/GSH). Modifié d'après [Albrecht et al., 2011].

Le senseur roGFP2 étant facilement oxydable à l'air libre, de nombreuses précautions doivent être prises lors de la dissection et de la fixation des tissus. J'ai donc tout d'abord cherché à savoir si ce senseur fonctionnait entre mes mains. Pour ce faire, j'ai répété l'une des expériences décrites dans [Albrecht et al., 2011], où ils tirent parti d'un shRNA contre la Thiorédoxine Réductase 1 (TrxR-1). En utilisant le driver *engrailed-Gal4* (*en-Gal4*), qui permet d'exprimer un shRNA (small hairpin RNA) dans la moitié postérieure des disques d'ailes, j'ai pu abolir l'expression de TrxR-1. Cela a entraîné une augmentation du ratio GSSG/GSH dans la partie postérieure des disques d'ailes et j'ai pu mesurer ce changement à l'aide du senseur cyto-roGFP2-Grx1 (Figure 21, (A)).

Une fois avoir constaté la fonctionnalité de ce biosenseur, j'ai introduit ce transgène en contexte mutant pour *dhd* et ai mesuré le ratio de glutathion oxydé/glutathion réduit des chambres d'œufs matures au confocal (Figure 21, (B)). Malgré l'absence d'un contrôle positif dans les ovocytes, comme l'inhibition de l'expression de *TrxR-1* ou de *Trx-2* dans les ovaires, cette expérience suggère qu'aucune différence de recyclage du glutathion n'est visible dans les ovaires, soutenant ainsi l'hypothèse que

DHD n'est pas impliquée dans le recyclage du glutathion. L'étude [Bauer et al., 2002] soutient également cette idée : en effet, dans cet article, les auteurs montrent que *in vitro*, DHD est très peu efficace pour réduire le glutathion, contrairement à Trx-2. Ces résultats suggèrent donc que DHD n'est pas impliquée dans le recyclage du glutathion dans les ovaires.

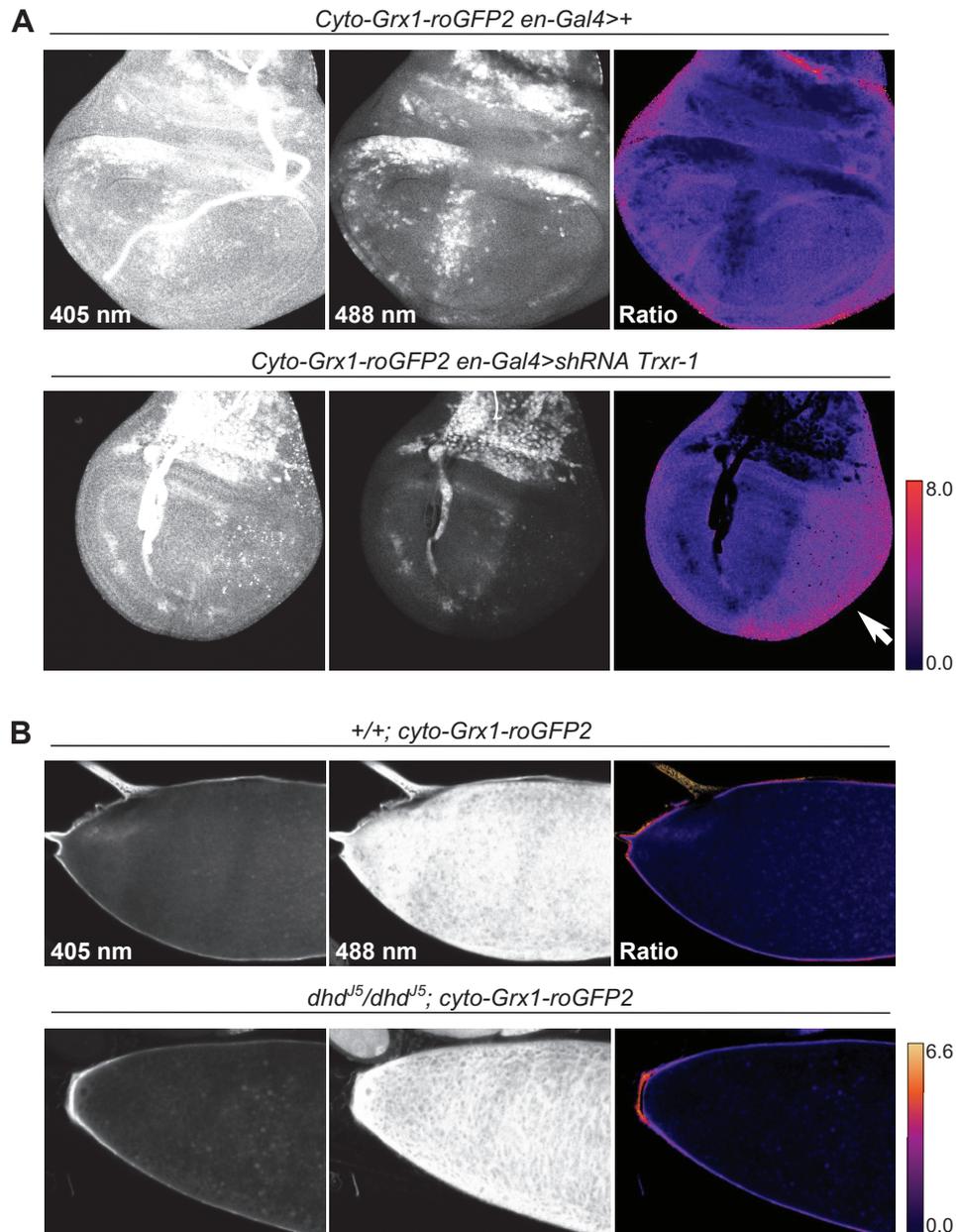


FIGURE 21. L'absence de DHD n'entraîne pas une oxydation de la réserve de glutathion dans les ovaires *dhdi⁵*. Les dégradés de couleur sont représentatifs des ratios GSSG/GSH mesurés. **(A)** Expérience contrôle dans des disques d'ailes exprimant le biosenseur cyto-roGFP2-Grx1. Les panels du haut montre des disques d'ailes où le niveau de TrxR-1 est normal dans les parties postérieures et antérieures du disque. Les panels du bas présentent des disques d'ailes où l'expression de TrxR-1 a été inhibée par ARNi dans la partie postérieure du disque (flèche). L'absence de TrxR-1 dans la partie postérieure des disques d'ailes entraîne un changement mesurable du ratio GSSG/GSH. **(B)** Ovocytes exprimant le senseur cyto-roGFP2-Grx1. Aucune différence du ratio GSSG/GSH n'est visible dans les chambres d'œufs matures en absence de DHD par rapport à des chambres d'œufs contrôles.

2.4.2 Trx-2 ne semble pas pouvoir remplacer DHD

L'étonnante fonction de DHD ainsi que son expression spécifique dans les ovaires m'ont amenées à me demander si la rupture des ponts disulfures de la chromatine spermatique est un rôle spécifique à DHD ou si cette fonction pouvait être assumée par une autre thiorédoxine.

Pour répondre à cette question, j'ai voulu exprimer *Trx-2* dans les mêmes conditions que *dhd* au moment de la fécondation (même quantité et même temporalité d'expression). Pour ce faire, j'ai construit un transgène où *Trx-2* est exprimé sous le contrôle des régions promotrices de *dhd* : *dhd>Trx-2* (Figure 22). J'ai introduit ce transgène dans un contexte mutant pour *dhd*, pour obtenir la souche *dhd^{Δ5}; P[dhd>Trx-2]* afin de tester la capacité de Trx-2 à remplacer DHD lors de la fécondation.

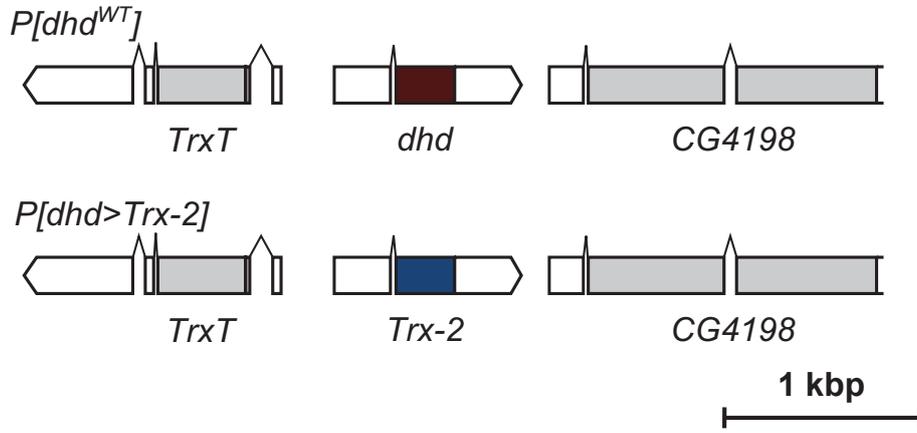


FIGURE 22. Schéma du contenu des transgènes *P[dhd^{WT}]* et *P[dhd>Trx-2]*. Le transgène *P[dhd^{WT}]* contient une région génomique de 4,3 kb contenant *dhd*. Dans le transgène *P[dhd>Trx-2]*, la région codante de *dhd* (marron) a été remplacée par celle de *Trx-2* (bleu), afin de pouvoir exprimer *Trx-2* sous le contrôle du promoteur de *dhd*.

Génotype des femelles	No. d'œufs	Taux d'éclosion (%)	Embryons morts développés (%)
<i>w¹¹¹⁸</i>	137	96,4	0
<i>+ ; ; P[dhd>Trx-2]</i>	303	89,1	3
<i>dhd^{Δ5}</i>	476	0	1,9
<i>dhd^{Δ5} ; ; P[dhd>Trx-2]</i>	289	0	42,9

TABLE 5. Test de fertilité des femelles (ratio 1 mâle : 1 femelle)

J'ai tout d'abord testé la fertilité des femelles *dhd^{Δ5}; P[dhd>Trx-2]*, qui se sont révélées stériles (Table 5). Sous réserve de l'expression correcte du transgène (en cours), ces résultats suggèrent que Trx-2 n'est pas capable de se substituer à DHD. Toutefois, le pourcentage d'embryons morts en cours de développement augmente

fortement pour les œufs pondus par les femelles dhd^{j5} ; $P[dhd > Trx-2]$ par rapport à ceux pondus par les femelles dhd^{j5} . Cela montre que les embryons issus de femelles dhd^{j5} ; $P[dhd > Trx-2]$ vont plus loin dans leur développement que ceux issus de femelles dhd^{j5} . Cela signifie que Trx-2 pourrait améliorer la décondensation du noyau mâle et/ou la migration du pronoyau femelle, deux phénotypes visibles dans les œufs dhd .

Ces résultats préliminaires suggèrent que Trx-2 ne peut pas remplacer DHD lors de la fécondation. Cependant, afin de pouvoir statuer sur l'impact de Trx-2 sur les événements de la fécondation en l'absence de DHD, je vais observer la cytologie de ces œufs, et plus particulièrement l'état de la chromatine paternelle et le pourcentage d'œufs où la migration du noyau femelle a eu lieu. De plus, afin de vérifier l'expression correcte du transgène $P[dhd > Trx-2]$, il est prévu de réaliser une expérience de Western Blot sur des extraits protéiques d'ovaires et de mesurer la présence de Trx-2 à l'aide d'un anticorps spécifique qui nous a gracieusement été fourni par Katja Becker.

3 *TrxT* est nécessaire au bon déroulement de la spermiogenèse

TrxT et DHD sont donc deux thiorédoxines sexuelles, qui pourraient être issues de la duplication et de la transposition de l'ancêtre de *Trx-2* [Svensson et al., 2007]. Ces deux thiorédoxines et l'organisation de leur locus sont conservées chez la plupart des espèces de drosophile [Svensson et al., 2007]. Alors que *dhd* est exprimé uniquement dans les ovaires, *TrxT* n'est présente que dans les testicules. De plus, de manière surprenante, *TrxT* a une séquence protéique plus grande que les autres thiorédoxines (Table 4) : au lieu des 10-12 kDa habituels, cette thiorédoxine a une taille d'environ 17 kDa, ce qui pourrait avoir une influence sur sa fonction. Étant donné le caractère essentiel de DHD, la thiorédoxine maternelle, je me suis demandée quel rôle pouvait jouer *TrxT* dans les testicules. Comme la délétion *Df(1)J5* couvre à la fois les locus de *TrxT* et de *dhd* (Figure 23), et que seule *TrxT* (et non DHD) est présente dans les testicules [Svensson et al., 2003], j'ai tiré parti de la souche *dhd^{ij5}* pour étudier l'impact de l'absence de *TrxT* lors de la spermatogenèse.

3.1 Étude phénotypique du mutant *TrxT*

Les mâles TrxT présentent un défaut de fertilité

Étonnamment, les mâles *TrxT* sont fertiles et ne semblent pas présenter de phénotypes particuliers [Svensson et al., 2003]. Afin d'évaluer la fertilité de ces mâles, j'ai effectué des tests de fertilité plus sensibles dans lequel 1 mâle *TrxT* est mis en présence de 10 femelles vierges sauvages. Ce type de test permet d'évaluer indirectement si le nombre de spermatozoïdes matures produit est normal ou non [Tirmarche et al., 2014]. Cela a révélé que les mâles *dhd^{ij5}*, c'est-à-dire mutants à la fois pour *dhd* et *TrxT*, présentent un niveau de fertilité plus bas que les mâles sauvages (Table 6), ce peut signifier que les mâles *dhd^{ij5}* ne produisent pas autant de spermatozoïdes matures que les mâles contrôles. L'introduction des transgènes *P[dhd^{XhoI/XhoI}]* et *P[dhd^{WT}]* (Figure 23) entraînent une augmentation de la fertilité, mais ne la restaure pas à un niveau normal (Table 6).

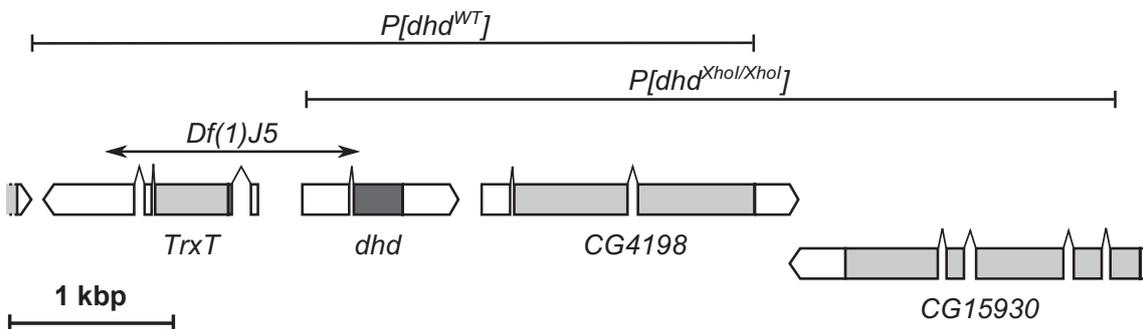


FIGURE 23. **Région génomique (4F4, chromosome X).** La délétion *Df(1)J5* touche les gènes *TrxT* et *dhd*. Le transgène *P[dhd^{XhoI/XhoI}]* couvre le locus de *dhd* mais pas celui de *TrxT* tandis que le transgène *P[dhd^{WT}]* comporte les deux gènes *dhd* et *TrxT*.

Génotype des mâles	No. d'œufs pondus	Taux d'éclosion (%)
w^{1118}	3236	90,5
dhd^{j5}	1263	57
$dhd^{j5}; P[dhd^{XhoI/XhoI}]$	630	71,3
$dhd^{j5}; P[dhd^{WT}]$	829	76,1

TABLE 6. **Fertilité des mâles** (ratio 1 mâle : 10 femelles).

Ce défaut de fertilité est dû à une perte massive de spermatides lors de la spermiogenèse

Afin de savoir si la spermiogenèse se déroulait normalement, j'ai marqué l'ADN les testicules de mâles sauvages (w^{1118}), mutants pour dhd et $TrxT$ (dhd^{j5}) et mutants uniquement pour $TrxT$ ($dhd^{j5}; P[dhd^{XhoI/XhoI}]$).

En observant les testicules de mâles $TrxT$, j'ai remarqué que de nombreuses spermatides étaient perdues au cours de la spermiogenèse ce qui expliquerait ce taux de fertilité plus bas que la normale (Figure 24). De plus, les spermatides en cours d'individualisation semblent anormales : contrairement aux testicules sauvages, où peu des spermatozoïdes matures sont visibles juste avant l'entrée de la vésicule séminale, les testicules mutants présentent de nombreux gamètes anormaux, qui semblent s'attarder à l'entrée de la vésicule séminale. Enfin, j'ai pu vérifier que les mâles mutants pour les deux thiorédoxines sexuelles présentent les mêmes phénotypes que les mâles mutants uniquement pour $TrxT$, ce qui montre que ces phénotypes ne sont pas dus à l'absence de DHD.

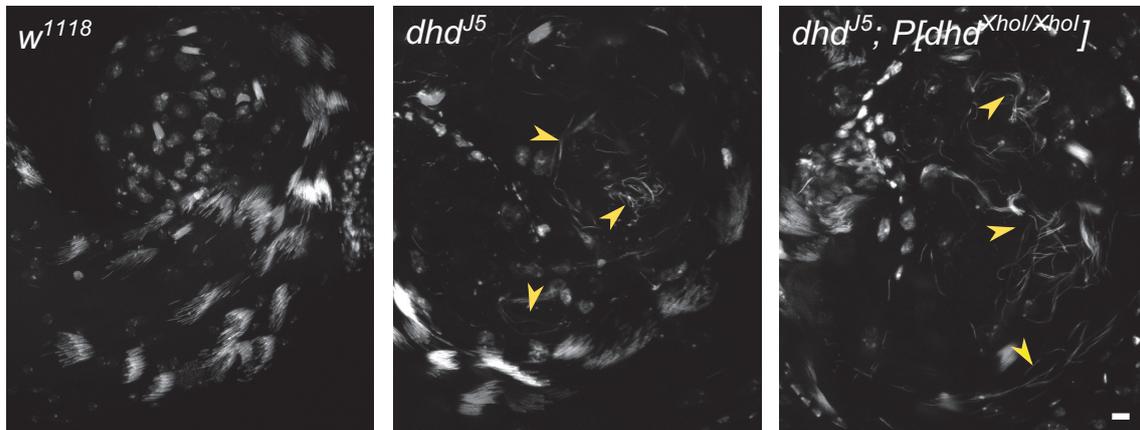


FIGURE 24. **Les mâles mutants pour $TrxT$ présentent une perte massive de spermatides lors de la spermiogenèse.** Les testicules dhd^{j5} et $dhd^{j5}; P[dhd^{XhoI/XhoI}]$ présentent le même phénotype : les spermatides en cours d'individualisation (flèches) semblent défectueuses et rester plus longtemps que la normale à l'entrée de la vésicule séminale. Dans les testicules sauvages (w^{1118}), les spermatides qui s'individualisent ne stagnent pas dans le testicules et sont stockées immédiatement. Barre d'échelle : 10 μ m.

Ce défaut de spermiogenèse n'est pas dû à un problème de remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse

Étant donné que les défauts des spermatides surviennent assez tardivement lors de la spermiogenèse, je me suis demandée si cela pouvait provenir d'un défaut de remodelage de la chromatine paternelle. Pour cela, j'ai étudié en détail la transition histone/SNBPs afin de voir si elle se déroulait correctement.

J'ai marqué contre les histones les testicules de mâles sauvages et mutants pour *TrxT* (Figure 25). Toutefois, je n'ai pas détecté d'histones rémanentes au sein de la chromatine des spermatides en cours d'individualisation, ce qui suggère que l'éviction des histones est normale.

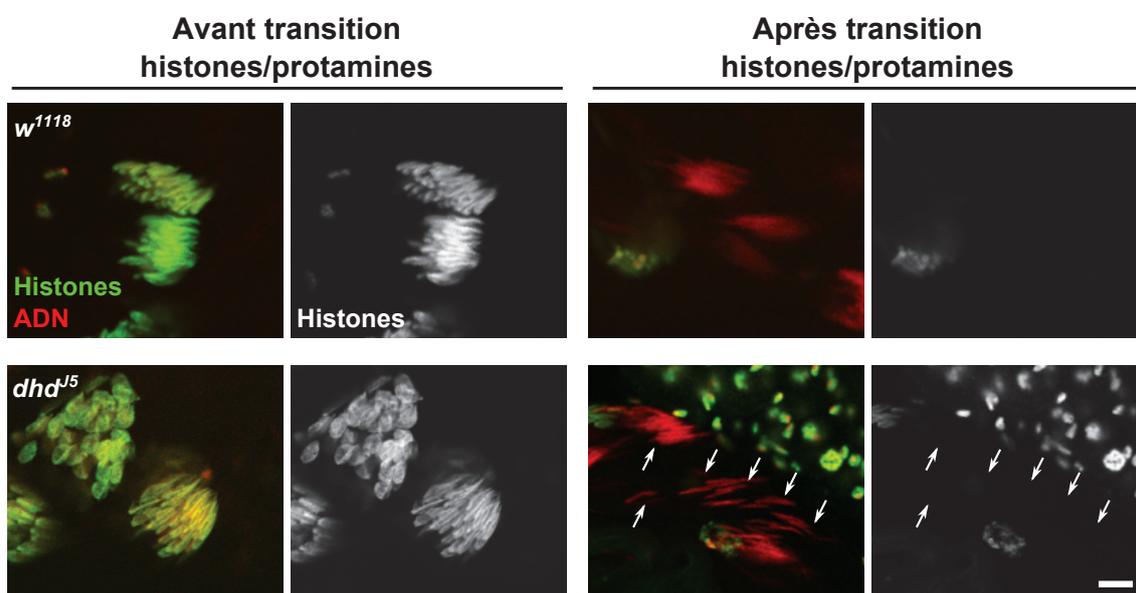


FIGURE 25. Dans les mutants *TrxT*, l'éviction des histones lors de la spermiogenèse se déroule normalement. Les histones (vert) sont enlevées normalement en absence comme en présence de *TrxT*. Dans les panels du bas montrant les noyaux spermatidiques après la transition histones/SNBPs (flèches), le signal des histones visible dans le coin supérieur correspond aux noyaux de cellules somatiques. L'ADN (rouge) est marqué par du iodure de propidium. Barre d'échelle : 10 μm .

Ensuite, afin de vérifier si l'incorporation des SNBPs au sein de la chromatine mâle est correcte, j'ai disséqué les testicules de mâles sauvages et mutants pour *TrxT* exprimant le transgène *Mst35Bb-GFP*. Ce transgène m'a permis de visualiser la SNBP *Mst35Bb*. Ce faisant, j'ai pu constater que dans les cas mutant et contrôle, la chromatine des spermatides en cours d'individualisation contient *Mst35Bb* de manière tout à fait normale et que les SNBPs sont incorporées stablement au sein de la chromatine (Figure 26).

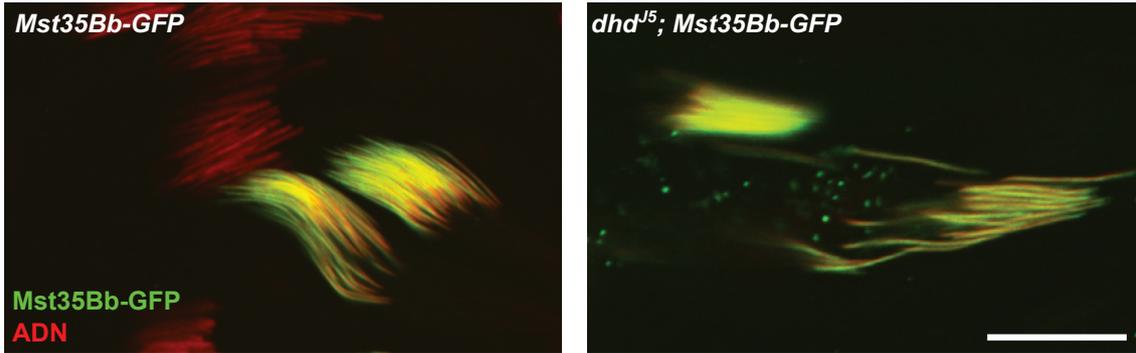


FIGURE 26. Dans les mutants *TrxT*, l'incorporation des SNBPs lors de la spermiogenèse se déroule normalement. Les SNBPs sont révélées grâce à l'expression de *Mst35Bb-GFP* transgénique (vert) chez des mâles sauvages (*Mst35Bb-GFP*) et mutants pour *TrxT* (*dhd^{J5}; Mst35Bb-GFP*). L'ADN est en rouge. Barre d'échelle : 10 μm .

Ces deux résultats soutiennent donc l'idée que la transition histone/SNBPs se déroule normalement en l'absence de TrxT.

L'absence de TrxT dans les testicules entraîne un dommage au niveau de l'ADN des spermatozoïdes matures

Étant donné les propriétés d'oxydoréduction de TrxT, les phénotypes observés sur les noyaux spermatidiques des mâles mutants pour *TrxT* peuvent être dus à un défaut de mise en place des ponts disulfures, mais également à un stress oxydant qui pourrait entraîner des dommages à l'ADN. Afin de tester cette seconde hypothèse, j'ai réalisé un marquage TUNEL sur des testicules issus de mâles sauvages et mutants. Ce marquage permet de révéler la présence de cassures dans la molécule d'ADN.

Cette expérience m'a permis de constater que, contrairement aux testicules des mâles sauvages (*w¹¹¹⁸*), les testicules de mâles mutants pour *TrxT* présentent un très fort marquage TUNEL juste avant l'entrée de la vésicule séminale (Figure 27, (A)), ce qui montre que le matériel génétique de ces gamètes est endommagé. La présence du signal TUNEL dans les deux génotypes au stade canoë sert de contrôle interne (Figure 27, (B)), ce qui valide cette expérience. En effet, on sait que, lors de la transition histones/SNBPs, des cassures transitoires apparaissent sur l'ADN spermatique [Rathke et al., 2007]. Ces cassures sont réparées en l'absence comme en présence de TrxT et aucun dommage à l'ADN n'est visible au sein des noyaux des spermatides juste avant l'individualisation (Figure 27 (B)).

Cette expérience montre donc qu'en l'absence de TrxT, on voit l'apparition de nombreuses cassures sur l'ADN des spermatozoïdes matures, ce qui n'est pas le cas dans les testicules sauvages (Figure 27, (B)).

Or, une trop forte concentration de H_2O_2 peut entraîner l'apparition de dommages à l'ADN [Imlay, 2003]. Mes résultats suggèrent donc que TrxT pourrait être responsable de l'homéostasie du peroxyde d'hydrogène au sein des testicules. On peut

3 *TrxT* est nécessaire au bon déroulement de la spermiogenèse

imaginer que ce maintien du niveau de H_2O_2 ait lieu par l'intermédiaire du GSH ou via le système peroxyrédoxine (Figure 19).

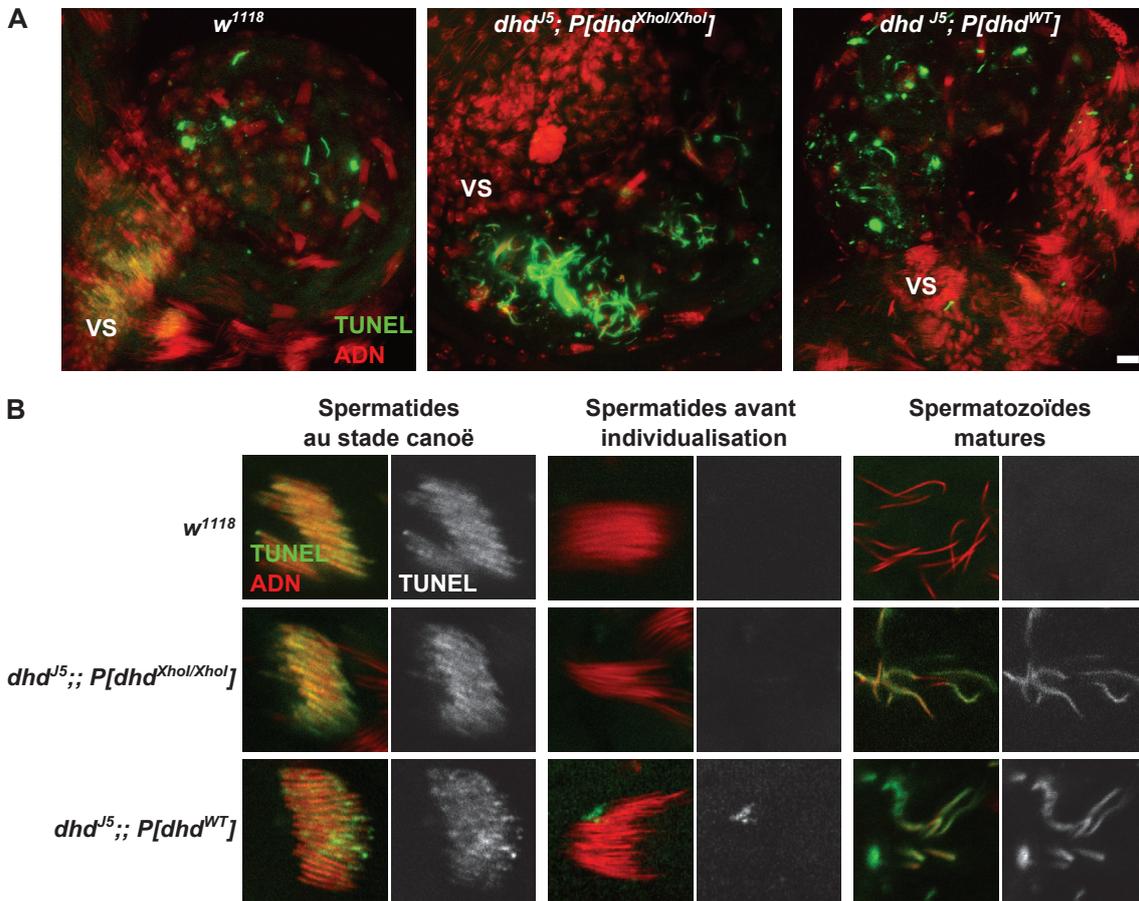


FIGURE 27. L'absence de *TrxT* entraîne l'apparition de cassures à l'ADN lors de la spermiogenèse. Les cassures d'ADN sont révélées par le marquage TUNEL (vert), tandis que l'ADN est marqué par du iodure de propidium (rouge). (A) Chez les mâles mutants pour *TrxT*, de nombreux spermatozoïdes présentent des cassures à l'ADN juste avant l'entrée de la vésicule séminale (VS), contrairement aux spermatozoïdes des testicules sauvages, où seuls quelques noyaux sont marqués. (B) Les cassures à l'ADN transitoires apparaissent et disparaissent normalement lors du remplacement des histones par les SNBPs. Toutefois, chez les mâles mutants pour *TrxT* (*dhc^{J5}; P[dhc^{XhoI/XhoI}]*), de nouvelles ruptures anormales apparaissent lors de l'individualisation des spermatozoïdes, ce qui n'est pas le cas chez les mâles contrôles (*w¹¹¹⁸*). L'expression du transgène *P[dhc^{WT}]* ne sauve pas le phénotype observé. Barres d'échelles : 10 μ m.

3.2 Les défauts observés ne semblent pas être dus à un problème d'homéostasie du glutathion

Afin de tester si le niveau de glutathion réduit était affecté en l'absence de TrxT, j'ai tiré parti de la protéine fusion cyto-roGFP2-Grx1. Comme expliqué précédemment (p. 103), cette protéine est un senseur du ratio de glutathion oxydé/glutathion réduit (GSSG/GSH) dans le cytoplasme des cellules.

J'ai donc construit une souche mutante pour *TrxT* exprimant ce senseur de glutathion (*dhd^{Δ5}*; *cyto-roGFP2-Grx1*) et ai mesuré le ratio de glutathion dans les testicules (Figure 28). Toutefois, je n'ai observé aucune différence entre les testicules issues de mâles contrôles et celles issues des mâles mutants pour *TrxT*, ce qui suggère que TrxT n'est pas responsable du recyclage du GSH dans les testicules. Toutefois, afin de valider cette expérience, il me faudrait introduire un contrôle positif, par exemple en utilisant une souche mutante pour *Trx-2* ou en inhibant l'expression de la thiorédoxine Réductase 1 (*TrxR-1*), qui est exprimée dans tous les tissus, ou de la thiorédoxine Réductase 2 (*TrxR-2*), qui est exprimée spécifiquement dans les testicules.

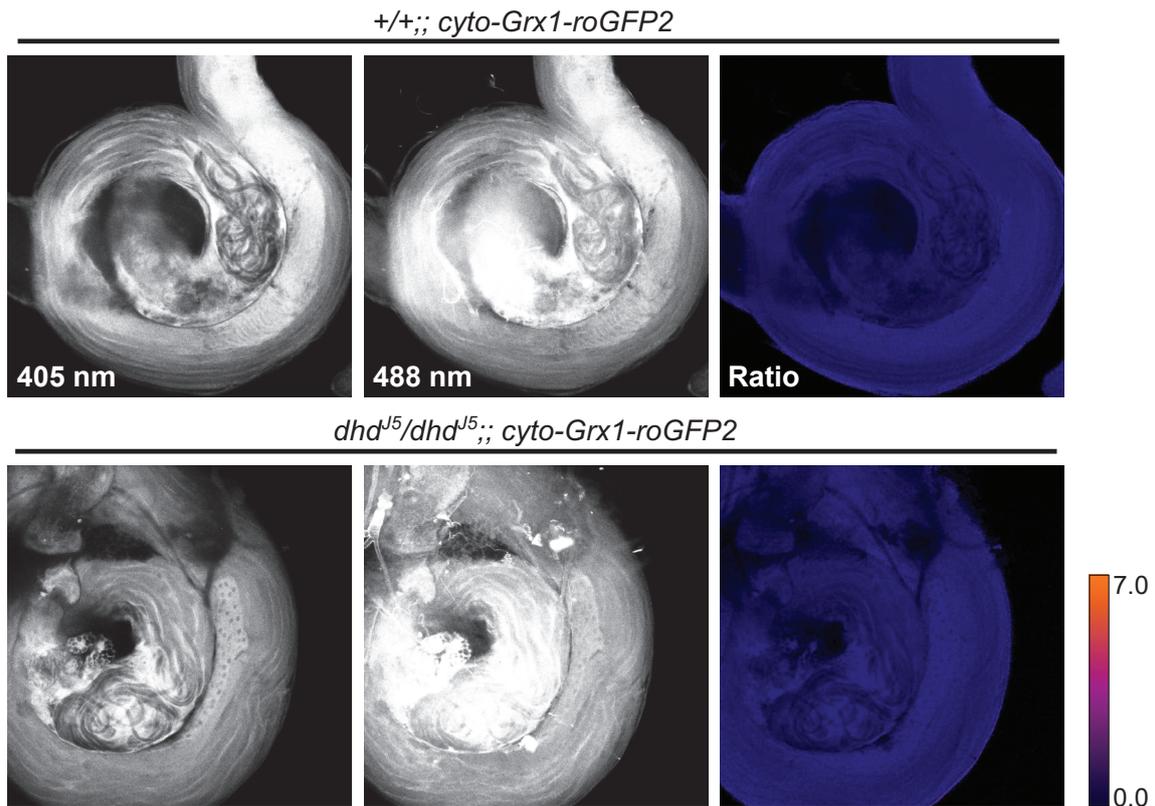


FIGURE 28. **L'absence de TrxT dans les testicules ne change pas le ratio GSSG/GSH.** Comparaison de testicules de mâles contrôles et mutants pour *TrxT* exprimant le transgène *cyto-Grx1-roGFP2*. Les panneaux de droite montre le ratio des signaux 405 nm/488 nm en fausses couleurs, ce qui correspond au ratio GSSG/GSH.

3.3 Le transgène $P[dhd^{WT}]$ ne sauve pas le phénotype causé par l'absence de *TrxT*.

Afin de vérifier si tous les phénotypes que j'ai pu observer sont dus à l'absence de la thiorédoxine paternelle, j'ai regardé si l'expression du transgène $P[dhd^{WT}]$ permet de sauver les défauts visibles chez les mâles *TrxT*. En effet, ce transgène comporte non seulement le gène *dhd*, mais également le gène *TrxT* (Figure 23).

Pour cela, j'ai tout d'abord mesuré leur fertilité (Table 6). De manière surprenante, l'expression de ce transgène ne restaure pas la fertilité à un niveau normal. Afin de mesurer l'impact de ce transgène sur la spermatogenèse, j'ai effectué une expérience de TUNEL sur les testicules de mâles *TrxT* exprimant le transgène $P[dhd^{WT}]$ (souche $dhd^{j5}; P[dhd^{WT}]$). J'ai ainsi constaté que la présence de ce transgène ne supprime pas l'apparition de cassures sur l'ADN des spermatozoïdes matures chez les mâles mutants pour *TrxT* (Figure 27).

Ces expériences peuvent indiquer deux choses : soit les phénotypes observés ne sont pas dus à l'absence de *TrxT*, mais à une autre mutation non identifiée portée par la souche dhd^{j5} , soit le transgène $P[dhd^{WT}]$ ne restaure pas l'expression normale de *TrxT*.

Afin de trancher entre ces deux hypothèses, il me faudrait tout d'abord mesurer l'expression de *TrxT* transgénique, par exemple en réalisant une expérience de RT-PCR contre la séquence codante pour cette thiorédoxine, mais également tester un autre transgène disponible, comme $P[w^+, snf^+, TrxT^+, dhd^+]$ décrit dans [Larochelle et al., 1998]. En effet, ce transgène porte une région génomique de 5,5 kb contenant les gènes *snf*, *TrxT* et *dhd* [Larochelle et al., 1998] et restaure l'expression de *TrxT* [Svensson et al., 2003].

Il nous faudrait également établir une nouvelle souche mutante où seul *TrxT* est touché, par exemple par la technique du CRISPR-Cas9. Si les défauts observés chez dhd^{j5} le sont également dans cette nouvelle souche mutante nulle pour *TrxT*, on pourra définitivement valider l'implication de *TrxT* dans ces phénotypes.

Discussion et Perspectives

L'esprit a autant besoin de livres qu'une épée de pierre à aiguiser pour conserver son tranchant.

GEORGES R. R. MARTIN
Le Trône de Fer

1 Condensation de l'ADN spermatique et rôle des différentes SNBPs

1.1 *Mst35Ba/b* est nécessaire à la structure de la chromatine spermatique

Grâce à la caractérisation de la souche $\Delta Mst35B$, j'ai confirmé que l'absence de *Mst35Ba* et *Mst35Bb* impactent la structure de la chromatine spermatique. En effet, en absence de ces deux SNBPs, de nombreuses spermatides sont perdues en cours de spermiogenèse, les noyaux des spermatozoïdes matures apparaissent tordus et, selon [Rathke et al., 2010], l'ADN spermatique est plus sensible aux rayons X, ce qui suggère un défaut de compaction de l'ADN.

Pourtant, les mâles $\Delta Mst35B$ sont fertiles, ce qui est assez surprenant quant on compare ce résultat au fait que, chez la souris et l'homme, les deux protamines P1 et P2 sont essentielles à la fertilité [Cho et al., 2001; Oliva, 2006; Jodar and Oliva, 2014]. Cela suggère que contrairement aux mammifères, il existe une redondance fonctionnelle de *Mst35Ba/b* avec les autres SNBPs. Leur absence au sein de la chromatine spermatique serait partiellement compensée par les autres SNBPs.

De manière intéressante, l'équipe a montré l'existence d'une interaction génétique entre les gènes *Mst35Ba/b* et *Mst77F* [Kimura and Loppin, submitted]. Chez les mâles homozygotes pour $\Delta Mst35B$, la suppression de l'un des deux allèles du gène *Mst77F* ($\Delta Mst35B/\Delta Mst35B$; $\Delta Mst77F/+$) suffit à provoquer la stérilité mâle et l'apparition de défauts majeurs de la structure chromatinienne. Cela soutient l'idée que même si l'absence de *Mst35Ba* et *Mst35Bb* pourrait être compensée par d'autres SNBPs, cette compensation n'est que partielle : elles sont nécessaires à la structuration de la chromatine paternelle.

1.2 Rôle des domaines HMG dans la condensation de l'ADN

Les mâles mutants pour les SNBPs présentent tous des défauts de condensation de l'ADN plus ou moins visibles [Rathke et al., 2010; Eren-Ghiani et al., 2015; Tirmarche et al., 2014]. Or, toutes les SNBPs identifiées chez *D. melanogaster* possèdent un domaine HMG [Eren-Ghiani et al., 2015; Doyen et al., 2015]. Ce domaine est également présent chez les protéines de transition tHMG-1, tHMG-2 et Tpl94D [Gärtner et al., 2015]. Cette boîte HMG est un motif de liaison à l'ADN, qui est non spécifique de la séquence nucléotidique. Ce domaine protéique en forme de L est constitué de trois hélices α . Il induit un changement de conformation de l'ADN et permet son repliement [Grosschedl et al., 1994]. Chez les SNBPs, il pourrait donc être à l'origine de leur capacité à condenser la chromatine spermatique.

Cette hypothèse est notamment soutenue par un résultat de l'étude [Eren-Ghiani et al., 2015]. Ils ont généré un mutant nommé *Prtl99C- Δ C* qui code pour une protéine Prtl99C tronquée en C-terminal au niveau de son domaine HMG. Or, les mâles homozygotes pour *Prtl99C- Δ C* présentent un noyau spermatique plus long que la normale, tout comme les mâles qui n'expriment pas *Prtl99C*.

D'un autre côté, une étude a montré que Mst77F est capable de condenser l'ADN *in vitro* [Kost et al., 2015]. Ils ont montré que Mst77F lie l'ADN via son domaine C-terminal (qui ne contient pas de boîte HMG), mais qu'en absence du domaine N-terminal (celui qui contient le domaine HMG), cette protéine est incapable de condenser l'ADN.

Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les domaines HMG soient responsables de la condensation de l'ADN. Afin de le prouver, il serait intéressant de remplacer les gènes endogènes des SNBPs par des versions codant pour des SNBPs dont la boîte HMG est mutée. Cela pourrait être réalisé grâce à la technique du CRISPR-Cas9 par exemple. Si ces mutants présentent les mêmes défauts chromatiniens que les mutants nuls pour les SNBPs, cela supporterait l'hypothèse que les domaines HMG sont nécessaires à la condensation de l'ADN.

2 DHD est requise pour la réduction des ponts disulfures du noyau spermatique

2.1 Le noyau spermatique de drosophile est stabilisé par des liaisons disulfures et non pas par des ions Zn^{2+}

Chez les mammifères placentaires, deux modèles de stabilisation de la chromatine spermatique s'opposent. Le premier, qui est communément accepté, propose que le noyau spermatique est stabilisé par des liaisons disulfures se formant entre les groupements thiols portés par les résidus cystéines [Balhorn, 1982, 2007]. Ce modèle se base notamment sur l'observation d'une oxydation des groupements thiols du noyau spermatique lors du passage dans l'épididyme et sur la possibilité de décondenser *in vitro* le noyau spermatique à l'aide d'un traitement réducteur. Le second propose que le noyau spermatique est stabilisé par des ions Zn^{2+} , qui lieraient les groupements thiols et imidazoles portés respectivement par les cystéines et les histidines [Björndahl and Kvist, 2010]. Le zinc masquerait donc les groupements thiols, qui ne seraient plus observables par les techniques usuelles, et serait chélaté par le DTT lors des tests de décondensation *in vitro*.

Au cours de ma thèse, j'ai montré que le noyau spermatique de drosophile pouvait également être décondensé par un traitement au DTT, ce que nous avons interprété comme la présence de liaisons disulfures qui stabilisent la chromatine spermatique. J'ai également montré qu'une thiorédoxine est requise pour la décondensation *in vivo* du noyau mâle, ce qui confirme cette interprétation. De plus, il a été montré que l'activité réductrice de DHD est nécessaire pour la poursuite du développement embryonnaire [Pellicena-Pallé et al., 1997]. Enfin, la démonstration de l'action directe de DHD sur le noyau mâle a été rendue possible par la création d'un mutant du site catalytique, ce qui soutient l'idée de l'existence de ponts disulfures au sein de la chromatine spermatique.

Ainsi, chez la drosophile, le noyau spermatique est stabilisé par des liaisons disulfures, et non pas par les ions zinc. Cela accrédite également le modèle de chromatine spermatique chez les mammifères qui est basé l'oxydation des cystéines.

2.2 DHD pourrait être spécifique de la réduction des SNBPs

J'ai montré que, au moment de la fécondation, DHD est présent au sein du noyau mâle. Bien que cette protéine soit extrêmement abondante dans le cytoplasme des œufs de drosophile, le noyau mâle est le seul endroit où l'on peut observer une accumulation de DHD^{C34S} , ce qui suggère que DHD réduit spécifiquement les SNBPs dans ce contexte.

Si tel est effectivement le cas, les mécanismes déterminant cette spécificité ne sont pas connus. Toutefois, l'un des aspects régissant cette spécificité pourrait résider dans l'absence de la deuxième proline dans la séquence protéique de DHD (Table 4). Cette proline est essentielle pour la conformation du site catalytique des thiorédoxines [Collet and Messens, 2010]. Son absence chez DHD pourrait peut être jouer sur la reconnaissance de son substrat. Un autre aspect qui pourrait être responsable de la spécificité de DHD est l'électrostaticité de cette protéine. En effet, l'étude [Berndt et al., 2015] propose que les thiorédoxines aient une surface électrostatique complémentaire avec celui de leur substrat. Or, selon des calculs préliminaires effectués par Christopher Lillig à partir de sa séquence protéique, DHD présenterait une surface électrostatique très différente de celles observées pour les thiorédoxines classiques (communication personnelle). Cela pourrait également constituer l'un des éléments expliquant cette apparente spécificité.

2.3 La réduction des liaisons disulfures pourrait-elle être prise en charge une protéine réductrice chez les mammifères ?

À travers l'étude du mutant $dhdj^5$, j'ai pu proposer que la décondensation du noyau spermatique chez *D. melanogaster* requière non pas du glutathion, mais une thiorédoxine dédiée. Mes résultats soutiennent l'idée que le glutathion ne peut pas être responsable de ce processus, qui est extrêmement rapide chez la drosophile.

Or, il est communément admis chez les mammifères que cette décondensation est prise en charge par le glutathion. Pourtant, aucune preuve directe n'a été faite de ce mécanisme. En effet, il a seulement été montré que le glutathion est nécessaire à la décondensation du noyau mâle [Perreault et al., 1988; Sutovsky and Schatten,

1997] et que sa concentration est plus forte dans des ovocytes matures par rapport aux ovocytes immatures [Yoshida et al., 1993; Luciano et al., 2006].

Il est donc possible que chez les mammifères également, la réduction des protamines soit prise en charge par une protéine à activité oxydoréductrice. Dans ce cas, le glutathion pourrait n'avoir qu'un rôle indirect et n'être requis que pour recycler l'agent réducteur des protamines. C'est par exemple ce qui a été proposé chez le cochon dans [Li et al., 2014] où les auteurs identifient PDIA3 (une protéine associée aux disulfides isomérases) comme potentiel agent réducteur des protamines.

Ainsi, à l'instar du mécanisme de réduction des ponts disulfures chez la drosophile, il est possible que cette réduction soit également prise en charge par une protéine spécifique chez les mammifères.

3 Importance et rôle des liaisons disulfures pour la chromatine spermatique

Au cours de l'étude du mutant *dhd⁵*, j'ai pu montrer l'existence de liaisons disulfures au sein de la chromatine spermatique. Nous avons supposé que ces liaisons stabilisent la chromatine spermatique, à l'instar de ce qui est montré chez les marsupiaux. En effet, la chromatine des noyaux spermatiques des marsupiaux qui ne possèdent pas de liaisons disulfures est beaucoup moins stable que celle des Plani-gales, où les SNBPs sont riches en résidus cystéines [Retief et al., 1995a; Retief et al., 1995b].

Toutefois, je n'ai pas étudié l'importance de ces liaisons sur la structure de la chromatine paternelle, ni leur impact sur la fertilité mâle. Pour ce faire, il faudrait muter spécifiquement tous les résidus cystéines d'un ou plusieurs SNBP(s). On pourrait choisir de le faire sur Mst77F et/ou Prlt99C, qui sont essentielles pour la structuration de la chromatine et la fertilité mâle. Pour y parvenir, l'une des stratégies envisageable serait de synthétiser une séquence génétique codant pour la SNBPs sans résidus cystéines, puis de substituer la version endogène de cette SNBPs par la version mutée, ce qui pourrait être réalisé par la technique du CRISPR-Cas9. Des tests de fertilité, l'observation cytologique des noyaux spermatiques ainsi que des tests de décondensation *in vitro* devraient permettre de mesurer la stabilité de la chromatine spermatique et ainsi de mesurer l'importance de ces liaisons disulfures.

4 Remodelage de la chromatine spermatique à la fécondation

Au cours de la fécondation, le noyau mâle subit un remodelage complet : les ponts disulfures reliant les SNBPs sont réduits, et les protamine-like sont remplacées par des histones fournies par l'œuf.

J'ai montré au cours de ma thèse que la rupture des liaisons disulfures est prise en charge par une thiorédoxine spécialisée, DHD. Toutefois la simple rupture des ponts disulfures ne permet pas l'enlèvement des SNBPs de la chromatine paternelle. Étant donné l'extrême rapidité de ce processus, il est difficilement imaginable que l'éviction des protamines se déroule de manière passive. Au contraire, cette étape

nécessite certainement une ou plusieurs protéine(s) particulière(s) qui enlèverai(en)t activement les protamine-like de la chromatine.

L'étude [Emelyanov et al., 2014] propose 4 protéines chaperonnes des SNBPs : NAP-1, NLP, Nph et TAP/p32. Cependant, cette étude [Emelyanov et al., 2014] se base sur un modèle *in vitro* de chromatine spermatique assemblé uniquement à partir d'ADN, de Mst35Ba et de Mst35Bb, et aucune observation du noyau mâle au moment de la fécondation n'est montré chez des embryons issues de femelles homozygotes mutantes pour ces protéines. Il est donc difficile d'affirmer qu'une ou plusieurs de ces protéines sont des acceptrices de SNBPs *in vivo*. Toutefois, il pourrait être intéressant de visualiser ces protéines dans le cadre d'œufs pondus par des femelles *dhd⁵*. Étant donné que le noyau mâle ne se décondense pas et que l'architecture spermatique reste intacte dans ces œufs, si l'une de ces protéines interagit avec les protamine-like, un marquage devrait être visible au niveau du noyau mâle.

Une autre protéine pourrait être l'acceptrice des protamine-like lors de la fécondation. En effet, certains œufs pondus par des femelles *Iswi¹* présentent un noyau mâle peu décondensé qui contient encore au moins Mst77F et Mst35Ba [Doyen et al., 2015]. ISWI est un remodeleur de chromatine dépendant de l'ATP qui serait notamment impliqué dans la mise en place de la chromatine spermatique [Doyen et al., 2015]. Dans les œufs issus de femelles sauvages, ISWI se localise spécifiquement au niveau du noyau mâle lors de la méiose femelle. Il serait pertinent de vérifier que cette localisation nucléaire persiste dans les œufs *dhd⁵*.

Il est intéressant de noter que seuls 7% des embryons contiennent des noyaux mâles présentant encore des SNBPs lors de la fécondation dans les œufs *Iswi¹* et que 40 % des embryons *Iswi¹* montrent une décondensation incomplète du noyau mâle. La décondensation du pronoyau mâle semble juste retardée et finit par avoir lieu dans ces œufs [Doyen et al., 2015]. Si ISWI est effectivement un accepteur de SNBPs, cela signifie soit que la décondensation peut avoir lieu de manière passive, ce qui entraîne un retard du remodelage chromatinien et donc des défauts d'embryogenèse, soit qu'ISWI n'est pas le seul accepteur de SNBPs et que plusieurs protéines pourraient être en charge de cette fonction. De plus, si il existe plusieurs protéines acceptrices de protamine-like, on peut supposer également qu'il existe des spécificités de prise en charge, chaque accepteur de SNBPs serait dans cette hypothèse plus ou moins spécifique de certaines protamine-like.

5 Contrôle de la production de DHD

J'ai pu confirmer que DHD est une thiorédoxine qui est exprimée spécifiquement dans les ovaires [Svensson et al., 2003] et j'ai montré que son existence est très restreinte dans le temps. En effet, cette protéine détectable uniquement dans les chambres d'œufs et dans les œufs qui n'ont pas dépassé la première mitose zygotique. Toutefois, l'ARN messager de DHD est présent dans le zygote jusqu'au stade 10 [Salz et al., 1994].

Il est en effet étonnant que cette protéine, qui est produite massivement dans les ovaires et présente en grande quantité dans les ovocytes matures, soit dégradée

aussi rapidement après la fécondation. Soit cette protéine est intrinsèquement instable, soit elle activement dégradée. Une hypothèse expliquant les raisons de cette dégradation très rapide pourrait être liée à la réactivité de DHD. En effet, contrairement à Trx-2, donc la fonction pourrait être la réduction du disulfide de glutathion [Bauer et al., 2002; Svensson and Larsson, 2007; Tsuda et al., 2010], DHD réagit peu avec le disulfide de glutathion [Bauer et al., 2002]. Par contre, il est possible qu'à cause des particularités de DHD (c'est-à-dire l'absence de la deuxième proline, ce qui pourrait modifier l'environnement de son site catalytique, et sa surface électrostatique apparemment particulière (voir p. 119)), elle puisse réagir avec d'autres protéines présentes dans l'embryon. Elle pourrait donc être toxique pour l'embryon et causer des défauts développementaux, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette thiorédoxine est si rapidement dégradée après la fécondation.

6 Rôle de TrxT lors de la spermiogenèse

J'ai démontré au cours de ma thèse que TrxT est nécessaire au bon déroulement de la spermiogenèse. Toutefois, le temps m'a manqué pour finaliser cette étude. Cette partie sera donc pour moi l'occasion de proposer les différentes expériences que j'aurai aimé avoir l'opportunité de mettre en place, afin d'élucider le rôle exact de la thiorédoxine paternelle dans la spermiogenèse.

6.1 Visualisation de TrxT

Afin de mieux cerner la fonction de TrxT, il est nécessaire de visualiser la protéine au sein du testicule. Est-elle nucléaire, comme le suggère l'expression du transgène *TrxT-EYFP* [Svensson et al., 2003]? Dans ce cas, on pourrait envisager un lien avec la mise en place des ponts disulfures des protamine-like, ce qui pourrait expliquer l'apparition de cassures à l'ADN. Est-elle cytoplasmique? Un rôle dans l'homéostasie du H_2O_2 serait alors probable.

Deux options sont possibles pour visualiser TrxT : construire un transgène codant pour une protéine fusion TrxT par exemple, ou faire produire un anticorps spécifique de la thiorédoxine paternelle.

La visualisation de TrxT grâce à un anticorps spécifique semble la meilleure option. Elle offre l'avantage de ne pas présenter de biais d'expression de TrxT. Malheureusement, il n'existe pas d'anticorps disponible qui soit spécifique de cette thiorédoxine pour le moment. Il est donc nécessaire de faire produire cet anticorps, puis de vérifier sa spécificité.

La création d'un transgène nécessite quelques précautions : il faut être sûr d'avoir inclut les régions régulatrices de *TrxT* afin que l'expression de la protéine transgénique soit la même que celle de la protéine endogène. De plus, l'expression de transgène peut être influencée par le site d'insertion du transgène. Enfin, l'ajout d'une étiquette peut perturber la fonctionnalité de la thiorédoxine, ce qui est peut-être le cas de la protéine fusion TrxT-EYFP décrite dans [Svensson et al., 2003]. Il faudrait s'assurer de sa fonctionnalité en l'exprimant en contexte mutant pour TrxT et en vérifiant la restauration d'une fertilité normale et de l'absence de dommages l'ADN spermatique. Toutefois, si toutes ces conditions sont remplies, la protéine transgénique offre l'avantage d'être détectable facilement, que ce soit en Western Blot ou

en immunofluorescence. Si la protéine transgénique TrxT-EYFP n'est pas fonctionnelle, il faudrait envisager d'en construire une autre. Cette nouvelle protéine devrait plutôt porter une étiquette V5, qui est plus petite et risque donc moins de perturber la fonctionnalité de TrxT.

6.2 Comment sont mises en place les liaisons disulfures des SNBPs ?

Si la localisation nucléaire de TrxT est vérifiée [Svensson et al., 2003], il est possible que TrxT soit impliquée plus ou moins directement dans l'établissement des liaisons disulfures qui stabilisent le noyau spermatique.

Chez les mammifères, ces liaisons disulfures sont mises en place à l'aide de H_2O_2 . Chez la souris, le maintien de l'homéostasie du H_2O_2 est pris en charge par les glutathiones peroxydases (GPx) [Chabory et al., 2010] tandis que snGPx4, une glutathione peroxydase nucléaire, joue le rôle de disulfide isomérase et est responsable de la mise en place des liaisons disulfures des protamines [Conrad et al., 2005].

L'une des manières d'aborder le problème de la mise en place des ponts disulfures et du rôle que pourrait jouer TrxT serait de comparer la quantité de groupements thiols libres sur les noyaux spermatiques issus de testicules *TrxT* ou de testicules sauvages. Il suffirait pour cela de disséquer les vésicules séminales d'individus sauvages et *TrxT*, et de marquer les noyaux à l'aide de monoBromoBimane (mBrB), un molécule fluorescente qui lie les groupements thiols qui ne sont pas engagés dans une liaison disulfure. Si on observe un plus fort signal de mBrB dans les noyaux spermatiques issus de mâles *TrxT*, cela suggérerait que *TrxT* est nécessaire à l'établissement des liaisons disulfures. Quant à savoir si ce rôle est direct ou non, on pourrait réutiliser la stratégie qui a permis de stabiliser DHD sur le noyau mâle. On pourrait piéger *TrxT* sur sa cible en mutant la deuxième cystéine en sérine de son site catalytique et observer la localisation de la protéine *TrxT*^{C35S}.

Toutefois, *TrxT* n'est pas la seule candidate à la mise en place des liaisons disulfures. En effet, selon <http://flybase.org>, il existe deux autres protéines à domaine thiorédoxine qui sont spécifiques des testicules : *CG6888* et *CG8517*. *CG8517* n'a pas du tout été caractérisée, mais on sait qu'elle est exprimée spécifiquement dans les testicules. *CG6888* est également une candidate sérieuse pour la mise en place des liaisons disulfures. En effet, non seulement elle est spécifique des testicules mais deux études ont montré qu'elle fait partie du protéome du spermatozoïde [Dorus et al., 2006; Wasbrough et al., 2010]. Il serait intéressant d'en générer les mutants et de regarder si la stabilité de la chromatine spermatique y est affectée.

6.3 L'absence de *TrxT* entraîne-t-elle bien une augmentation de H_2O_2 ?

Étant donné que des dommages à l'ADN surviennent lors de la spermiogenèse et le fait que les thiorédoxines sont responsables du recyclage des peroxyrédoxines,

et donc indirectement de l'homéostasie du H_2O_2 , il est également tentant de penser que l'absence de TrxT dans les testicules entraîne une augmentation en peroxyde d'hydrogène qui se traduirait par l'apparition de cassures de l'ADN.

Afin de vérifier si le niveau de H_2O_2 est affecté dans les testicules *TrxT*, on peut utiliser la protéine fusion cyto-roGFP2-Orp1, décrite dans [Albrecht et al., 2011]. Ce senseur fonctionne de la même manière que le senseur du glutathion cyto-roGFP2-Grx1, mais le remplacement de Grx-1 par la protéine Orp1 lui confère sa sensibilité au couple H_2O/H_2O_2 . Si le milieu où se trouve cette protéine fusion est riche en H_2O , la GFP sera excitable à 488 nm, si le milieu est riche en H_2O_2 , elle sera excitable à 405 nm.

De plus, il est aisé de vérifier la fonctionnalité de ce type de senseur. De la même manière que la sensibilité et la fonctionnalité de cyto-roGFP2-Grx1 a été contrôlée dans les disques d'ailes, on peut les tester pour le senseur cyto-roGFP2-Orp1. Il devrait suffire d'induire un ARNi contre *Jafrac1* ou *Jafrac2* (des thiorédoxines peroxydases responsables de la réduction du peroxyde d'hydrogène) dans les testicules. Cette inhibition de l'expression de *Jafrac1* ou *Jafrac2* devrait se traduire par l'augmentation du niveau de H_2O_2 , provoquant ainsi un accroissement du ratio H_2O_2/H_2O mesuré par le biosenseur.

6.4 TrxT est-elle responsable du recyclage de peroxyrédoxines dans les testicules ?

Si l'hypothèse selon laquelle TrxT est responsable de l'homéostasie du H_2O_2 est vérifiée, il serait alors probable que TrxT soit impliquée dans le recyclage d'une ou plusieurs peroxyrédoxines exprimées dans les testicules.

Selon <http://flybase.org>, il y a 8 peroxyrédoxines exprimées dans les testicules, dont une exprimée très fortement : *Jafrac2*, également connue sous le nom de dPrx4 [Radyuk et al., 2013]. Cette protéine est l'un des maillons de la chaîne de protection contre le stress oxydant chez la drosophile adulte mais joue également un rôle dans l'induction de l'apoptose lors de stress oxydant [Radyuk et al., 2013]. Afin de réduire le champ des cibles possibles de TrxT, on pourrait inhiber la production des différentes peroxyrédoxines par ARNi et regarder si la perte d'une ou plusieurs d'entre elles entraîne des dommages à l'ADN spermatique. Si tel est le cas, afin de vérifier si cette peroxyrédoxine est la cible de TrxT, on pourrait utiliser la même stratégie que celle qui a permis de piéger DHD sur le noyau spermatique. En mutant la deuxième cystéine du site catalytique de TrxT et immunoprécipitant cette thiorédoxine à partir d'extraits protéiques testiculaires, il devrait être possible de voir quelles peroxyrédoxines sont la cible de TrxT.

6.5 Comment TrxT est-elle recyclée ?

Il semble que TrxT soit nécessaire pour le maintien de l'intégrité du noyau spermatique. Ce rôle est certainement dû à son potentiel réducteur. Or, comme précisé précédemment (voir p. 58), les thiorédoxines sont des protéines qui nécessitent un

recyclage pour conserver leur activité réductrice. Ce recyclage est pris en charge par les thiorédoxines réductases (TrxR).

Or, chez la drosophile, il existe deux thiorédoxines réductases : TrxR-1, que l'on retrouve dans presque tous les organes de l'adulte, et TrxR-2, qui n'est présente que dans les testicules. Il existe des allèles mutants nuls pour TrxR-1, notamment *TrxR-1^Δ*, mais ils sont létaux [Missirlis et al., 2001]. Il n'existe pas de mutation nulle pour *TrxR-2*.

Étant donné que TrxR-2 est exprimée spécifiquement dans les testicules, elle est la candidate principale pour le recyclage de TrxT. Afin de tester cette hypothèse, il est possible d'inhiber l'expression de *TrxR-1* et *TrxR-2* dans les testicules afin de voir si on retrouve les défauts observables dans la souche mutante pour TrxT. Si tel était le cas de l'inhibition de l'expression de *TrxR-2* et non de *TrxR-1*, cela suggérerait que TrxR-2 est responsable de la réduction de TrxT. Il faudrait ensuite confirmer cette interaction. Cela pourrait être réalisé avec le mutant TrxT^{C35S} : il permettrait de piéger la TrxR-2 sur TrxT^{C35S}. On pourrait immunoprécipiter ce complexe et révéler la TrxR-2 à l'aide d'un anticorps spécifique ou par le biais d'expériences de spectrométrie de masse.

Conclusion

Seuls les Sith sont aussi absolus.

OBI-WAN KENOBI à DARK VADOR
Star Wars III (2005)

Cette thèse met en évidence les nombreuses similarités existant entre les mammifères et la drosophile que ce soit lors de la spermiogenèse que de la fécondation. Les SNBPs, qui font partie de la chromatine spermatique, la stabilisent par l'intermédiaire de liaisons disulfures. Ces liaisons sont rompues lors de la fécondation, ce qui permet la décondensation du noyau mâle et l'assemblage d'une chromatine nucléosomée. Toutes ces similarités suggèrent une certaine convergence évolutive des mécanismes moléculaires de la reproduction sexuée.

Or ce travail montre l'existence d'une protéine dédiée à la rupture des liaisons disulfures, ce qui remet en cause les connaissances des mécanismes mis en jeu lors du remodelage de la chromatine paternelle à la fécondation. L'existence de cette thiorédoxine maternelle chez la drosophile invite à envisager l'idée de l'existence d'une protéine à activité réductrice qui pourrait jouer le même rôle dans l'ovocyte mammifère. Ces travaux pourraient donc être importants pour mieux comprendre certains problèmes de stérilité maternelle, mais également pour améliorer les techniques d'assistance médicale à la reproduction.

D'un autre côté, cette thèse souligne l'importance des processus oxydoréducteurs non seulement pour la mise en place de la chromatine spermatique mais également pour la protection du génome paternel. La poursuite de ces travaux devrait permettre de mieux comprendre ces mécanismes complexes qui aboutissent à la production d'un gamète fonctionnel.

Matériels et Méthodes

Exterminate! Exterminate! Exterminate!

DALEK AU DOCTEUR
Doctor Who (1963-2016)

Lignées de Drosophiles

Les lignées sont maintenues à 25°C sur un milieu de culture standard.

Génotypes des lignées utilisées

*w*¹¹¹⁸
w; ; *P*[*Mst77F-EGFP*, *w*⁺/TM3,*Sb*¹
w; ; *P*[*Mst35Ba-GFP*, *w*⁺]
w; *P*[*w*^{+mw}*Dj-GFP*, *w*⁺]
w; *P*[*cid-GFP*, *w*⁺]
w; Δ *Mst35B*, *w*⁺
w; Δ *Mst35B*; *P*[*Mst77F-EGFP*, *w*⁺]/TM2
w; Δ *Mst35B*, *w*⁺/ Δ *prot*; *P*[*Mst77F-EGFP*, *w*⁺]/TM2
w; Δ *Mst35B*; *P*[*Mst35Ba-EGFP*, *w*⁺]
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*
w^{*}, *Df*(1)*J5*; *CyO*, *P*[*dhd*^{*XhoI/XhoI*}, *w*⁺]/+
Df(1)*JC70/FM7c*, *sn*⁺
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*; ; *P*[*dhd*^{WT}, *w*⁺]*attP3B*
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*; ; *P*[*dhd*^{C34S}, *w*⁺]*attP3B*
w; ; *P*[*cyto-roGFP2-Grx1*, *w*⁺]
w^{*}; *P*[*en2.4-GAL4*, *w*^{+mw}]/*CyO*; *P*[*cyto-roGFP2-Grx1*, *w*⁺]/TM2
*y*¹, *v*¹; *P*[*TRiP.HMJ21198*]*attP40*
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*; ; *P*[*cyto-roGFP2-Grx1*, *w*⁺]/TM2
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*; ; *P*[*Mst35Ba-GFP*, *w*⁺]
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*; ; *P*[*Mst35Bb-GFP*, *w*⁺]
w^{*}, *Df*(1)*J5/FM7c*; ; *P*[*dhd*>*Trx-2*, *w*⁺]*attP3B*
w^{*}; ; *P*[*dhd*>*Trx-2*, *w*⁺]*attP3B*

Tests de fertilité

Pour chaque test, 10 femelles vierges âgées de 3 jours ont été mises en présence à 25°C en présence de 10 mâles (Table 5) ou de 1 mâle (Table 6). Les mouches

ont été transférées au bout de 24h de ponte, les embryons ont été comptés, puis les embryons non éclos ont été comptabilisés au bout de 36h de développement.

Immunomarquages sur testicules entiers

Les testicules ont été disséqués dans du PBS-Triton 0,15 %, fixés pendant 25 min à température ambiante en PBS -Triton 0,15 %-formaldéhyde 3,7 %, rincés en PBS-Triton 0,15 % et immunomarqués suivant le protocole décrit dans [Bonnefoy et al., 2007]. L'immunomarquage anti-histones a été fait à l'aide du l'anticorps monoclonal souris anti-histones (Millipore # MABE71; 1 :1000) tandis que la GFP n'a pas été immunomarquée. Le marquage TUNEL a été réalisé à l'aide du kit "In Situ Cell Death Detection" (# 11684795910, Roche). Le mélange de marquage et les tissus ont été préparés suivant les instructions du manufacteur, excepté pour le marquage des testicules, où la durée d'incubation dans le mélange de marquage a été augmentée (2h à température ambiante). Les tissus ont été montés dans le milieu de montage Dako (Sigma) contenant 5 µg/mL de iodure de propidium. Les lames ont été observées avec un microscope confocal LSM 510 (Zeiss) et les images traitées avec les logiciels Gimp (<http://www.gimp.org>) et Inkscape (<https://inkscape.org/fr/>).

Préparation, imagerie et traitement des images des tissus exprimant roGFP2

Les disques d'ailes, les ovaires et les testicules ont été disséqués et préparés comme dans [Albrecht et al., 2011] et montés dans le milieu de montage Dako (Sigma) contenant 5 µg/mL de iodure de propidium. Les lames ont été observées avec un microscope confocal SP5X (Leica) et les images traitées avec les logiciels Inkscape 1.48v (<http://imagej.nih.gov/ij/>) et Inkscape (<https://inkscape.org/fr/>).

Anticorps utilisés

Cible	Dilution	Origine	Référence
Mst35B	1 :500	Obtenu auprès de F. Landmann	
Mst35B	1 :500	Obtenu auprès de S. Kimura	
Pan-histones	1 :1000	Millipore	#MABE71
GFP	1 :200	Roche	#118144600001
H3K27me2	1 :500	Millipore	#07-452
α-tubulin	1 :50	Abcam	#ab6160
γ-tubulin	1 :500	Sigma	#T5326
DHD	1 :1000	Généré dans l'équipe	

Construction des plasmides

pET-15B-dhd^{WT}

La région codante de *dhd* a été amplifiée à partir d'ADN génomique à l'aide des primers "NdeI-DhdCDS-fwd" et "DhdCDS-BamHI-rev". Cette séquence a été insérée dans le vecteur pET-15B à l'aide des sites de restriction NdeI et BamHI.

pW8-attB-dhd>Trx-2

Un fragment de 2122 pb codant pour la séquence du transgène $P[dhd^{WT}]$ compris entre les sites XhoI et XbaI a été synthétisée. Cette séquence est en tout point identique à celle du transgène *dhd^{WT}* à part pour la séquence codante de *dhd* qui a été remplacée par celle de *Trx2*. Cette séquence a ensuite été insérée à l'aide des sites de restriction XhoI et XbaI dans le plasmide pW8-attB-dhd^{WT} à la place du fragment existant.

Primers utilisés

Primers utilisés pour l'étude de la souche $\Delta Mst35B$

Mst35B-left-arm-fwd	5' -TAAATCCCGCGGCTGAAGGGGGTGGATTGATCG-3'
Mst35B-left-arm-rev	5' -TAAATTCGCAIGCATCCGAGGAAATGGAACGGG-3'
Mst35B-right-arm-fwd	5' -TAAATTCGGCGCCCTGCTCGTGCCAAACTCTATG-3'
Mst35B-right-arm-rev	5' -CGCTTCGTACGACAGCAAAATTG-3'
Mst35Ba Primer 3 rev	5' -GAAATCAAGCTTTGAGATAGGAAAAAAGTCTGA-3'
Mst35Ba Primer 4 fwd	5' -CTCTGGAAAAGCTTGAAGCAC-3'

Primers utilisés pour l'étude TrxT

TrxT-fwd	5' -CTAGTGCTCCAGAACGGCATTCTC-3'
TrxT-rev	5' -AGTGCGGAAACAAGGACCGATCTTG-3'

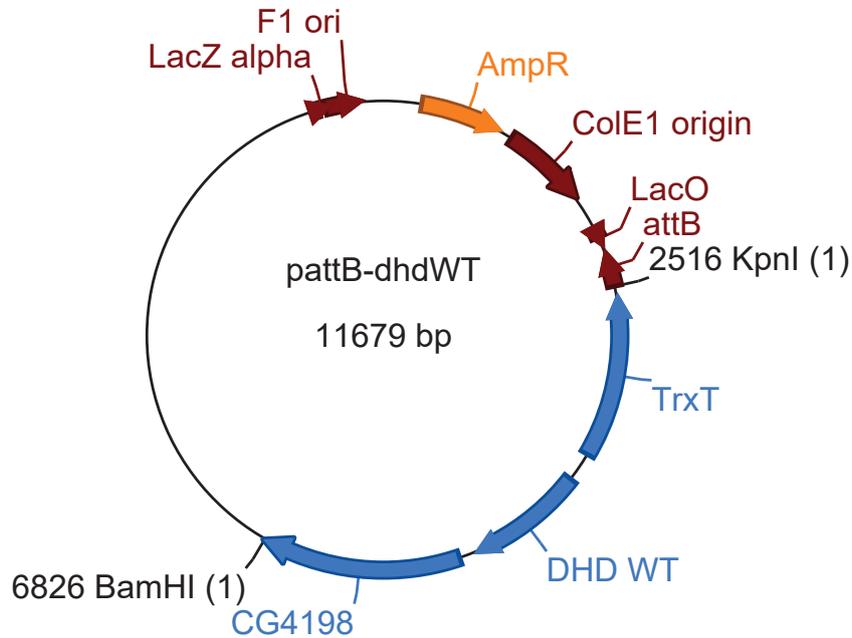
Primers utilisés pour l'étude de DHD

dhd-mutagenesis-fwd	5' -CATGGTGTGGTCCCAAGAAATGGAGAGC-3'
dhd-mutagenesis-rev	5' -GCTCTCCATTTCCCTTGGTGGACCCACCCATG-3'
dhd-Kpn-for	5' -GCCGGTACCCCAATATCCCTCCCAATATCC-3'
dhd-Bam-Rev	5' -GCCGGATCCGCTAAATGGAATCGCAATCGT-3'
T3-dhd-f	5' -AATTAAACCCCTCACTAAAGGGCGACGACAAAGCTAAATCGTGC-3'
T7-dhd-r	5' -TAAATACGACTCACTATAGGGTACCCACATCTCGCGCTTAC-3'
NdeI-Trx-2-fwd	5' -TAAATCCATATGATGGTGTACCCAGGTGAAAAGAT-3'
BamHI-Trx-2-rev	5' -TAAATTCGGATCCTTAGATATTTGGCCTTGTATGACA-3'
Trx-2-fwd	5' -ACCTATCGCATAGATGTGCC-3'
Trx-2-rev	5' -CACGCACCTTGATATGCCTTTGG-3'
NdeI-DhdCDS-fwd	5' -TAAATCCATATGATGGCATCCGTACGCACCCATG-3'
DhdCDS-BamHI-rev	5' -TAAATTCGGATCCTTACGCCCTTACCAGCTTGGC-3'
Transgene-U12-sens1-fwd	5' -CGGCTTGGAAATCGGTTGTTT-3'
Transgene-U12-sens1-rev	5' -CCGTCAGCTCCTCGAAATTG-3'
Transgene-U12-sens2-fwd	5' -CCTCGATGCGCTTGTGATAG-3'
Transgene-U12-sens2-rev	5' -GATGTCGACGCTAGCAGTG-3'
dhd-CDS-Not-fwd	5' -CCGGGGCCGCATGGCATCCGTACGCACCCAT-3'
dhd-CDS-Xba-rev	5' -CCTCTAGATTACGCCCTTACCAGCTTGG-3'
NotI-ATG-V5-dhd-fwd	5' -TAAATTCGGGGCCGCATGGGTAAGCCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCCTCG ATTCTACGGCATCCGTACGCACCCATGAA-3'

Cartes des constructions créées

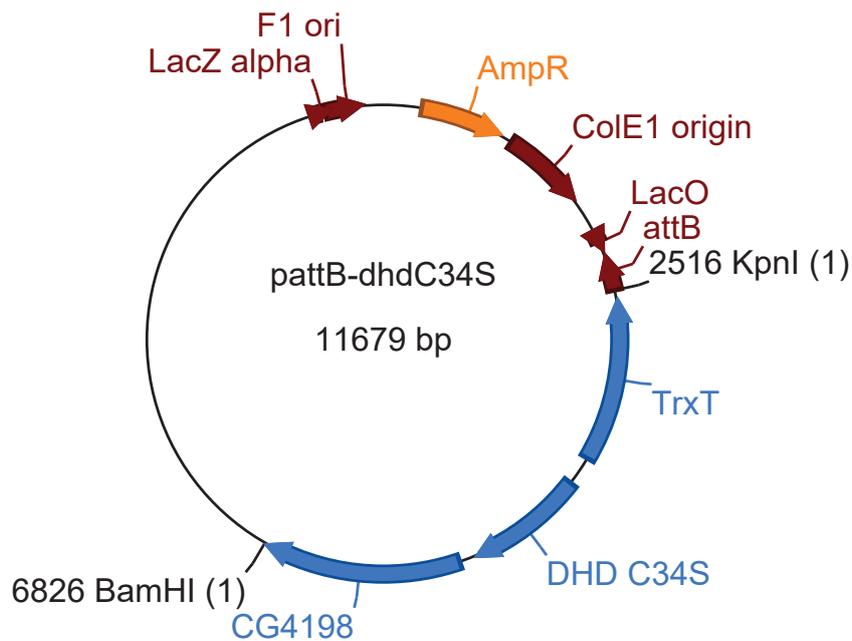
pattB-dhd^{WT}

Construit à l'aide des primers "dhd-Kpn-for" et "dhd-Bam-Rev".



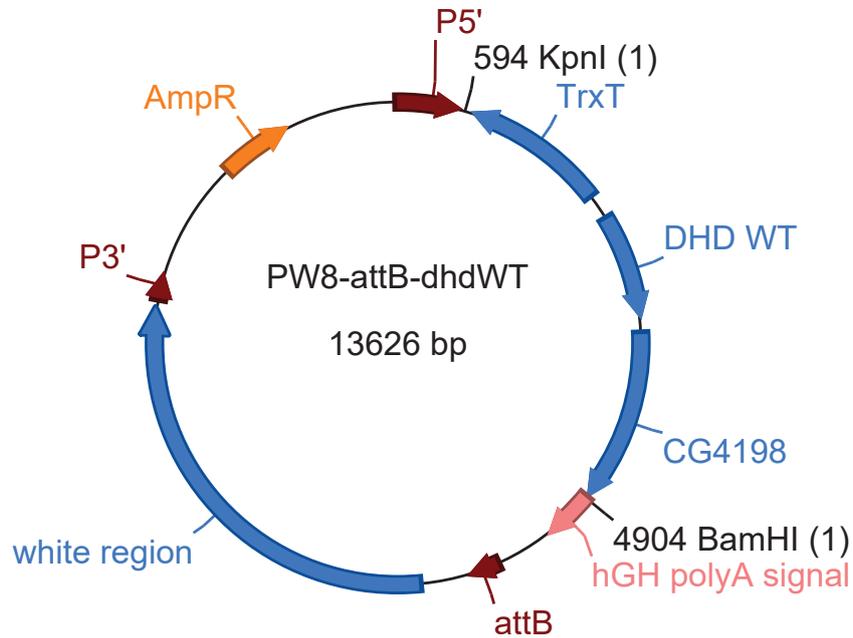
pattB-dhd^{C34S}

Construit à l'aide des primers "dhd-Kpn-for" et "dhd-Bam-Rev".



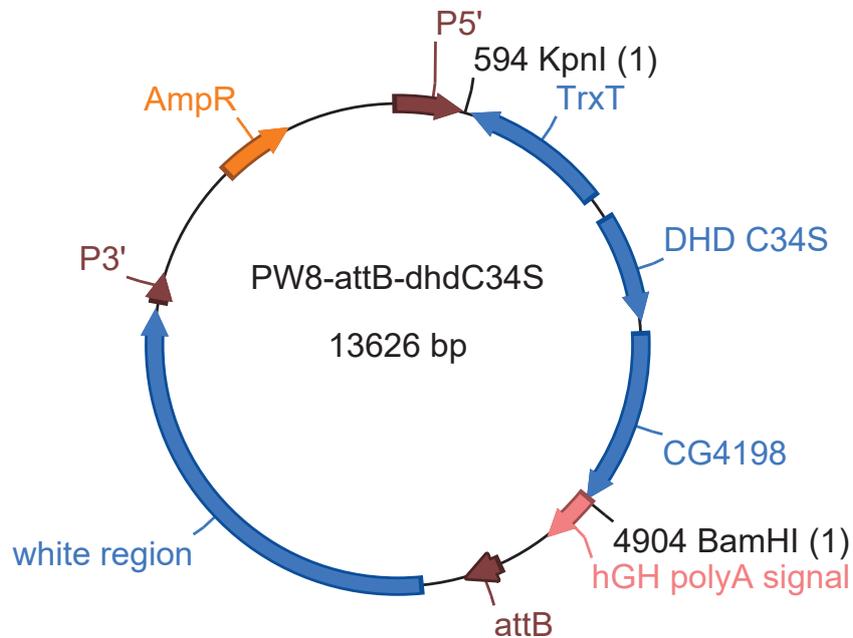
pW8-attB-dhd^{WT}

Construit à l'aide des primers "dhd-Kpn-for" et "dhd-Bam-Rev".



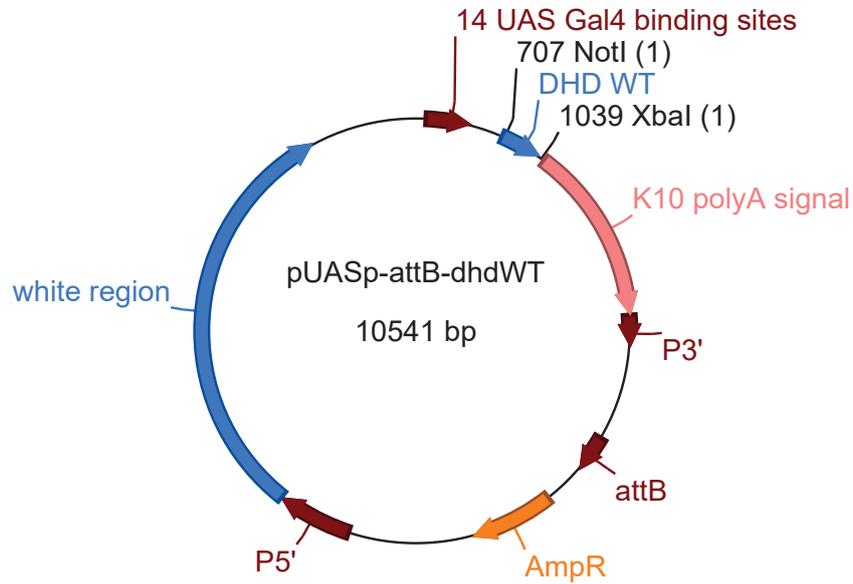
pW8-attB-dhd^{C34S}

Construit à l'aide des primers "dhd-Kpn-for" et "dhd-Bam-Rev".



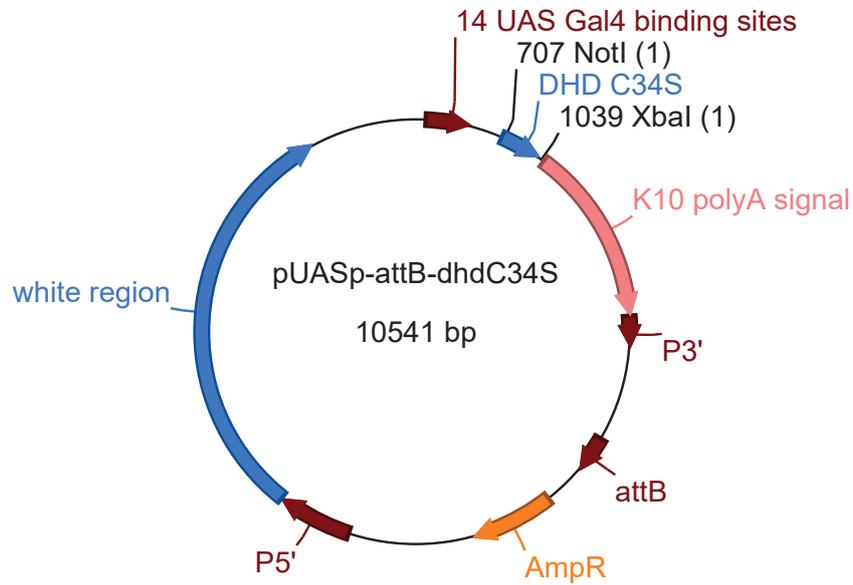
pUASP-attB-dhd^{WT}

Construit à l'aide des primers "dhd-CDS-Not-fwd" et "dhd-CDS-Xba-rev".



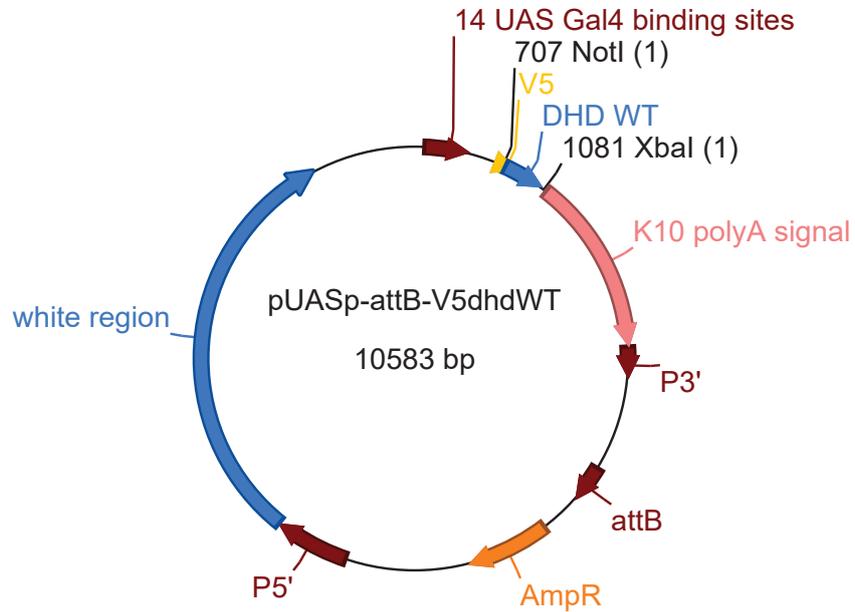
pUASP-attB-dhd^{C34S}

Construit à l'aide des primers "dhd-CDS-Not-fwd" et "dhd-CDS-Xba-rev".



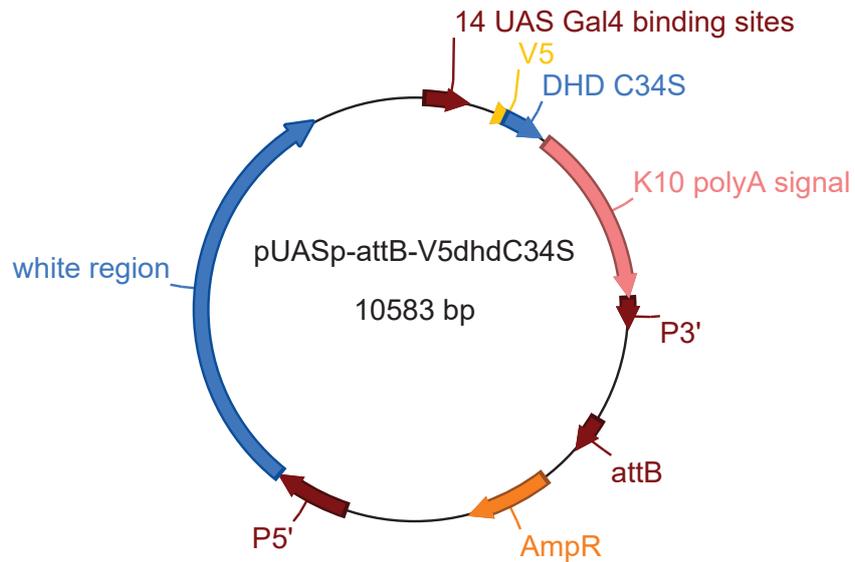
pUASP-attB-V5-dhd^{WT}

Construit à l'aide des primers "NotI-ATG-V5-dhd-fwd" et "dhd-CDS-Xba-rev".



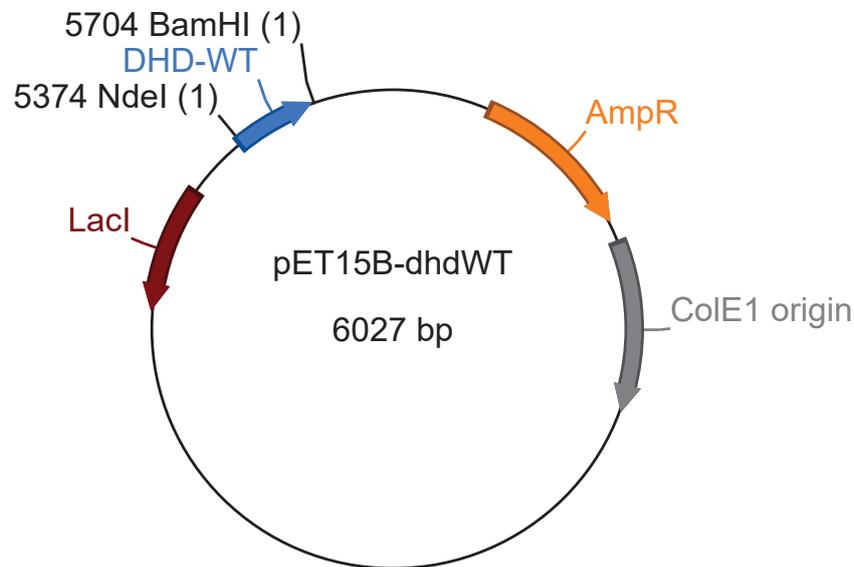
pUASP-attB-V5-dhd^{C34S}

Construit à l'aide des primers "NotI-ATG-V5-dhd-fwd" et "dhd-CDS-Xba-rev".



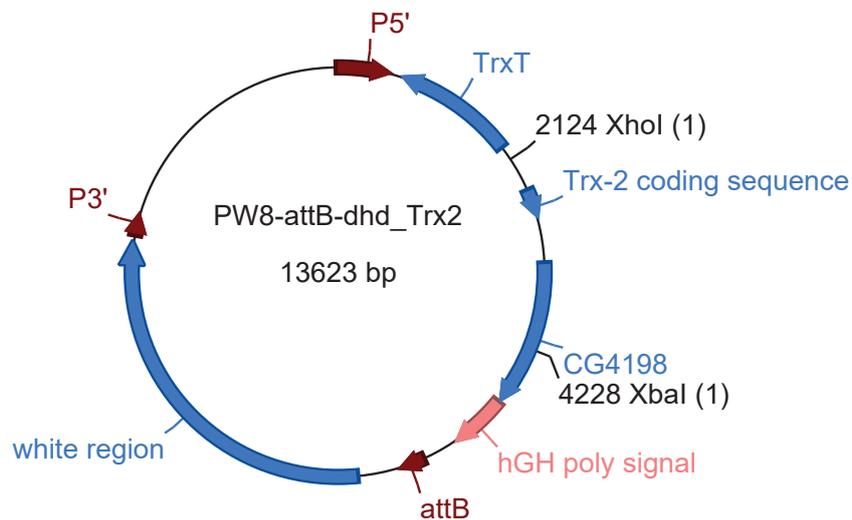
pET-15b-dhd^{WT}

Construit à l'aide des primers "NdeI-DhdCDS-fwd" et "DhdCDS-BamHI-rev".



pW8-attB-dhd>Trx-2

La séquence comprise entre les sites XhoI et XbaI a été synthétisée et insérée à l'aide ces sites de restriction dans le plasmide pW8-attB-dhd^{WT} à la place du fragment existant.



Bibliographie

- *Vous connaissez mes références.*
- *Oh oui, oui! Elles sont aux archives.*
- *Et je dirais même qu'elles encombrent!*

RUDOLPHE À FRANCIS
Les Barbouzes (1964)

- Akhmanova, A., Miedema, K., Wang, Y., Bruggen, M. v., Berden, J. H. M., Moudrianakis, E. N. and Hennig, W. [1997], 'The localization of histone H3.3 in germ line chromatin of *Drosophila* males as established with a histone H3.3-specific antiserum', *Chromosoma* **106**(6), 335–347.
- Albrecht, S. C., Barata, A. G., Grosshans, J., Teleman, A. A. and Dick, T. P. [2011], 'In Vivo Mapping of Hydrogen Peroxide and Oxidized Glutathione Reveals Chemical and Regional Specificity of Redox Homeostasis', *Cell Metabolism* **14**(6), 819–829.
- Arnér, E. S. J. and Holmgren, A. [2000], 'Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase', *European Journal of Biochemistry* **267**(20), 6102–6109.
- Ausió, J., González-Romero, R. and Woodcock, C. L. [2014], 'Comparative structure of vertebrate sperm chromatin', *Journal of Structural Biology* **188**(2), 142–155.
- Ausió, J. [1999], 'Histone H1 and Evolution of Sperm Nuclear Basic Proteins', *Journal of Biological Chemistry* **274**(44), 31115–31118.
- Ausió, J., Veghel, M. L. J. V., Gomez, R. and Barreda, D. [1997], 'The Sperm Nuclear Basic Proteins (SNBPs) of the Sponge *Neofibularia nolitangere* : Implications for the Molecular Evolution of SNBPs', *Journal of Molecular Evolution* **45**(1), 91–96.
- Awe, S. and 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.
- Baarends, W. M., Hoogerbrugge, J. W., Roest, H. P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J. H. J. and Grootegoed, J. A. [1999], 'Histone Ubiquitination and Chromatin Remodeling in Mouse Spermatogenesis', *Developmental Biology* **207**(2), 322–333.
- Balhorn, R. [1982], 'A model for the structure of chromatin in mammalian sperm', *The Journal of Cell Biology* **93**(2), 298–305.
- Balhorn, R. [2007], 'The protamine family of sperm nuclear proteins', *Genome Biol* **8**(9), 227.
- Balhorn, R., Brewer, L. and Corzett, M. [2000], 'DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides : Analysis of toroid stability using single DNA molecules', *Mol. Reprod. Dev.* **56**(S2), 230–234.
- Bandiera, A., Patel, U. A., Manfioletti, G., Rustighi, A., Giancotti, V. and Crane-Robinson, C. [1995], 'A Precursor-product Relationship in Molluscan Sperm Proteins from *Ensis minor*', *European Journal of Biochemistry* **233**(3), 744–749.
- Bastock, R. and St Johnston, D. [2008], '*Drosophila* oogenesis', *Current Biology* **18**(23), 1082–1087.
- Bauer, H., Kanzok, S. M. and Schirmer, R. H. [2002], 'Thioredoxin-2 but Not Thioredoxin-1 Is a Substrate of Thioredoxin Peroxidase-1 from *Drosophila melanogaster*', *Journal of Biological Chemistry* **277**(20), 17457–17463.

-
- Berkovits, B. D. and Wolgemuth, D. J. [2013], ‘The Role of the Double Bromodomain-Containing BET Genes During Mammalian Spermatogenesis’, *Curr Top Dev Biol* **102**, 293–326.
- Berndt, C., Schwenn, J.-D. and Lillig, C. H. [2015], ‘The specificity of thioredoxins and glutaredoxins is determined by electrostatic and geometric complementarity’, *Chem. Sci.* .
- Berruti, G. and Martegani, E. [2005], ‘The Deubiquitinating Enzyme mUBPy Interacts with the Sperm-Specific Molecular Chaperone MSJ-1 : The Relation with the Proteasome, Acrosome, and Centrosome in Mouse Male Germ Cells’, *Biol Reprod* **72**(1), 14–21.
- Björndahl, L. and Kvist, U. [2010], ‘Human sperm chromatin stabilization : a proposed model including zinc bridges’, *Molecular Human Reproduction* **16**(1), 23–29.
- Bonnefoy, E., Orsi, G. A., Couble, P. and Loppin, B. [2007], ‘The Essential Role of Drosophila HIRA for De Novo Assembly of Paternal Chromatin at Fertilization’, *PLoS Genetics* **3**(10).
- Boussouar, F., Rousseaux, S. and Khochbin, S. [2008], ‘A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code’, *Cell Cycle* **7**(22), 3499–3502.
- Braun, R. E. [2001], ‘Packaging paternal chromosomes with protamine’, *Nature Genetics* **28**(1), 10–12.
- Brewer, L., Corzett, M. and Balhorn, R. [2002], ‘Condensation of DNA by Spermatid Basic Nuclear Proteins’, *J. Biol. Chem.* **277**(41), 38895–38900.
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E. J., Roloff, T. C., Beisel, C., Schübeler, D., Stadler, M. B. and Peters, A. H. F. M. [2010], ‘Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa’, *Nat Struct Mol Biol* **17**(6), 679–687.
- Bunick, D., Balhorn, R., Stanker, L. H. and Hecht, N. B. [1990], ‘Expression of the rat protamine 2 gene is suppressed at the level of transcription and translation’, *Experimental Cell Research* **188**(1), 147–152.
- Caglar, G. S., Hammadeh, M., Asimakopoulos, B., Nikolettos, N., Diedrich, K. and Al-Hassani, S. [2005], ‘In Vivo and In Vitro Decondensation of Human Sperm and Assisted Reproduction Technologies’, *In Vivo* **19**(3), 623–630.
- Carlos, S., Jutglar, L., Borrell, I., Hunt, D. F. and Ausio, J. [1993], ‘Sequence and characterization of a sperm-specific histone H1-like protein of *Mytilus californianus*.’, *J. Biol. Chem.* **268**(1), 185–194.
- Caron, N., Veilleux, S. and Boissonneault, G. [2001], ‘Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein’, *Mol. Reprod. Dev.* **58**(4), 437–443.
- Castillo, J., Estanyol, J. M., Ballescà, J. L. and Oliva, R. [2015], ‘Human sperm chromatin epigenetic potential : genomics, proteomics, and male infertility’, *Asian J Androl* **17**(4), 601–609.

- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F. and Drevet, J. R. [2010], 'Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity', *J. Anim. Sci.* **88**(4).
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., Schoor, M., Gottwald, U., Habenicht, U., Drevet, J. R. and Vernet, P. [2009], 'Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice', *The Journal of Clinical Investigation* **119**(7), 2074–2085.
- Chauvière, M., Martinage, A., Debarle, M., Sautière, P. and Chevaillier, P. [1992], 'Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor', *European Journal of Biochemistry* **204**(2), 759–765.
- Chen, H. Y., Sun, J.-M., Zhang, Y., Davie, J. R. and Meistrich, M. L. [1998], 'Ubiquitination of Histone H3 in Elongating Spermatids of Rat Testes', *J. Biol. Chem.* **273**(21).
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-Ha, H., Choi, Y.-C., Hecht, N. B. and Eddy, E. M. [2001], 'Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice', *Nature Genetics* **28**(1), 82–86.
- Collet, J.-F. and Messens, J. [2010], 'Structure, Function, and Mechanism of Thio-redoxin Proteins', *Antioxidants & Redox Signaling* **13**(8), 1205–1216.
- Conrad, M., Ingold, I., Buday, K., Kobayashi, S. and Angeli, J. P. F. [2015], 'ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**(8), 1566–1574.
- Conrad, M., Moreno, S. G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Briemeier, M., Wurst, W., Maiorino, M. and Bornkamm, G. W. [2005], 'The Nuclear Form of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Is a Protein Thiol Peroxidase Contributing to Sperm Chromatin Stability', *Molecular and Cellular Biology* **25**(17), 7637–7644.
- Corona, D. F. V. and Tamkun, J. W. [2004], 'Multiple roles for ISWI in transcription, chromosome organization and DNA replication', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1677**(1–3), 113–119.
- Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S. and Watts-Tobin, R. J. [1961], 'General nature of the genetic code for proteins', *Nature* **192**, 1227–1232.
- de Mateo, S., Ramos, L., de Boer, P., Meistrich, M. and Oliva, R. [2011], 'Protamine 2 precursors and processing', *Protein Pept. Lett.* **18**(8), 778–785.
- De Renzis, S., Elemento, O., Tavazoie, S. and Wieschaus, E. F. [2007], 'Unmasking Activation of the Zygotic Genome Using Chromosomal Deletions in the Drosophila Embryo', *PLoS Biology* **5**(5).
- DeRouchev, J., Hoover, B. and Rau, D. C. [2013], 'A Comparison of DNA Compaction by Arginine and Lysine Peptides : A Physical Basis for Arginine Rich Protamines', *Biochemistry* **52**(17), 3000–3009.

-
- Dhar, S., Thota, A. and Rao, M. R. S. [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.
- Dorus, S., Busby, S. A., Gerike, U., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Karr, T. L. [2006], ‘Genomic and functional evolution of the *Drosophila melanogaster* sperm proteome’, *Nat Genet* **38**(12), 1440–1445.
- Dorus, S., Freeman, Z. N., Parker, E. R., Heath, B. D. and Karr, T. L. [2008], ‘Recent Origins of Sperm Genes in *Drosophila*’, *Molecular Biology and Evolution* **25**(10), 2157–2166.
- Doyen, C. M., Chalkley, G. E., Voets, O., Bezstarosti, K., Demmers, J. A., Moshkin, Y. M. and Verrijzer, C. P. [2015], ‘A Testis-Specific Chaperone and the Chromatin Remodeler ISWI Mediate Repackaging of the Paternal Genome’, *Cell Reports* **13**(7), 1310–1318.
- Doyen, C. M., Moshkin, Y. M., Chalkley, G. E., Bezstarosti, K., Demmers, J. A., Rathke, C., Renkawitz-Pohl, R. and Verrijzer, C. P. [2013], ‘Subunits of the Histone Chaperone CAF1 Also Mediate Assembly of Protamine-Based Chromatin’, *Cell Reports* **4**(1), 59–65.
- Dubruille, R. and Loppin, B. [2015], ‘Protection of *Drosophila* chromosome ends through minimal telomere capping’, *Journal of Cell Science* **128**(10), 1969–1981.
- Eirén-López, J. M., Frehlick, L. J. and Ausió, J. [2006], ‘Protamines, in the Footsteps of Linker Histone Evolution’, *Journal of Biological Chemistry* **281**(1), 1–4.
- Eirín-López, J. M. and Ausió, J. [2009], ‘Origin and evolution of chromosomal sperm proteins’, *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **31**(10), 1062–1070.
- Eirín-López, J. M., Lewis, J. D., Howe, L. A. and Ausió, J. [2006], ‘Common Phylogenetic Origin of Protamine-like (PL) Proteins and Histone H1 : Evidence from Bivalve PL Genes’, *Molecular Biology and Evolution* **23**(6), 1304–1317.
- Emelyanov, A. V., Rabbani, J., Mehta, M., Vershilova, E., Keogh, M. C. and Fyodorov, D. V. [2014], ‘*Drosophila* TAP/p32 is a core histone chaperone that cooperates with NAP-1, NLP, and nucleophosmin in sperm chromatin remodeling during fertilization’, *Genes & Development* **28**(18), 2027–2040.
- Eren-Ghiani, Z., Rathke, C., Theofel, I. and Renkawitz-Pohl, R. [2015], ‘Prtl99c Acts Together with Protamines and Safeguards Male Fertility in *Drosophila*’, *Cell Reports* **13**(11), 2327–2335.
- Fabian, L. and Brill, J. A. [2012], ‘*Drosophila* spermiogenesis’, *Spermatogenesis* **2**(3), 197–212.
- Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. and Steger, K. [2004], ‘In Vivo Effects of Histone-Deacetylase Inhibitor Trichostatin-A on Murine Spermatogenesis’, *Journal of Andrology* **25**(5), 811–818.
- Finch, J. T. and Klug, A. [1976], ‘Solenoidal model for superstructure in chromatin.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

73(6), 1897–1901.

- Foe, V. E., Odell, G. M. and Edgar, B. A. [1993], Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo : point and counterpoint, *in* ‘The development of *Drosophila melanogaster*’, cold spring harbor laboratory press edn, Vol. 1, Bate, Michael and Arias, Alfonso Martinez, pp. 149–300.
- Foresta, C., Flohé, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F. and Maiorino, M. [2002], ‘Male Fertility Is Linked to the Selenoprotein Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase’, *Biol Reprod* **67**(3), 967–971.
- Fortes, M. R. S., Satake, N., Corbet, D. H., Corbet, N. J., Burns, B. M., Moore, S. S. and Boe-Hansen, G. B. [2014], ‘Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls’, *Andrology* **2**(3), 370–378.
- Fuller, M. T. [1993], Spermatogenesis, *in* ‘The development of *Drosophila melanogaster*’, cold spring harbor laboratory press edn, Vol. 1, Bate, Michael and Arias, Alfonso Martinez, pp. 71–147.
- Gaucher, J., Boussouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., Hery, P., Jounier, S., Depaux, A., Vitte, A.-L., Guardiola, P., Pernet, K., Debernardi, A., Lopez, F., Holota, H., Imbert, J., Wolgemuth, D. J., Gérard, M., Rousseaux, S. and Khochbin, S. [2012], ‘Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt’, *EMBO J* **31**(19), 3809–3820.
- Gimenez-Bonafé, P., Ribes, E., Sautière, P., Gonzalez, A., Kasinsky, H., Kouach, M., Sautière, P.-E., Ausió, J. and Chiva, M. [2002], ‘Chromatin condensation, cysteine-rich protamine, and establishment of disulphide interprotamine bonds during spermiogenesis of *Eledone cirrhosa* (Cephalopoda)’, *European Journal of Cell Biology* **81**(6), 341–349.
- Godmann, M., Auger, V., Ferraroni-Aguiar, V., Sauro, A. D., Sette, C., Behr, R. and Kimmins, S. [2007], ‘Dynamic Regulation of Histone H3 Methylation at Lysine 4 in Mammalian Spermatogenesis’, *Biol Reprod* **77**(5), 754–764.
- Gong, S., Gabriel, M. C. S., Zini, A., Chan, P. and O’Flaherty, C. [2012], ‘Low Amounts and High Thiol Oxidation of Peroxiredoxins in Spermatozoa From Infertile Men’, *Journal of Andrology* **33**(6), 1342–1351.
- Green, G. R., Balhorn, R., Poccia, D. L. and Hecht, N. B. [1994], ‘Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins’, *Mol. Reprod. Dev.* **37**(3), 255–263.
- Grosschedl, R., Giese, K. and Pagel, J. [1994], ‘HMG domain proteins : architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures’, *Trends in Genetics* **10**(3), 94–100.
- Gärtner, S. M. K., Rothenbusch, S., Buxa, M. K., Theofel, I., Renkawitz, R., Rathke, C. and Renkawitz-Pohl, R. [2015], ‘The HMG-box-containing proteins tHMG-1 and tHMG-2 interact during the histone-to-protamine transition in *Drosophila* spermatogenesis’, *European Journal of Cell Biology* **94**(1), 46–59.

-
- Hentschel, C. C. and Birnstiel, M. L. [1981], ‘The organization and expression of histone gene families’, *Cell* **25**(2), 301–313.
- Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., Emoto, K., Umeda, M. and Nakagawa, Y. [2001], ‘Failure of the Expression of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in the Spermatozoa of Human Infertile Males’, *Biol Reprod* **64**(2), 674–683.
- Imlay, J. A. [2003], ‘Pathways of Oxidative Damage’, *Annual Review of Microbiology* **57**(1), 395–418.
- Inoue, A. and Zhang, Y. [2014], ‘Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes’, *Nat Struct Mol Biol* **21**(7), 609–616.
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. and Kadonaga, J. T. [1996], ‘Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays.’, *Mol Cell Biol* **16**(6), 3112–3124.
- Itoh, T., Ausio, J. and Katagiri, C. [1997], ‘Histone H1 variants as sperm-specific nuclear proteins of *Rana catesbeiana*, and their role in maintaining a unique condensed state of sperm chromatin’, *Molecular Reproduction and Development* **47**(2), 181–190.
- Iuso, D., Czernik, M., Toschi, P., Fidanza, A., Zacchini, F., Feil, R., Curtet, S., Buchou, T., Shiota, H., Khochbin, S., Ptak, G. E. and Loi, P. [2015], ‘Exogenous Expression of Human Protamine 1 (hPrm1) Remodels Fibroblast Nuclei into Spermatid-like Structures’, *Cell Rep* **13**(9), 1765–1771.
- Jayaramaiah Raja, S. and Renkawitz-Pohl, R. [2005], ‘Replacement by *Drosophila melanogaster* Protamines and Mst77f of Histones during Chromatin Condensation in Late Spermatids and Role of Sesame in the Removal of These Proteins from the Male Pronucleus’, *Molecular and Cellular Biology* **25**(14), 6165–6177.
- Jodar, M. and Oliva, R. [2014], ‘Protamine alterations in human spermatozoa’, *Adv. Exp. Med. Biol.* **791**, 83–102.
- Julianelli, V., Farrando, B., Alvarez Sedo, C., Calvo, L., Romanato, M. and Calvo, J. C. [2012], ‘Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa’, *Human Reproduction* **27**(7), 1930–1938.
- Jutglar, L., Borrell, J. I. and Ausió, J. [1991], ‘Primary, secondary, and tertiary structure of the core of a histone H1-like protein from the sperm of *Mytilus*.’, *J. Biol. Chem.* **266**(13), 8184–8191.
- Kamakaka, R. T. and Biggins, S. [2005], ‘Histone variants : deviants?’, *Genes Dev.* **19**(3).
- Kaneuchi, T., Sartain, C. V., Takeo, S., Horner, V. L., Buehner, N. A., Aigaki, T. and Wolfner, M. F. [2015], ‘Calcium waves occur as *Drosophila* oocytes activate’, *PNAS* **112**(3), 791–796.
- Kanzok, S. M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J. K., Müller, H.-M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R. H. and Becker, K. [2001], ‘Substitution of the Thioredoxin System for Glutathione Reductase in *Drosophila melanogaster*’,

- Science* **291**(5504), 643–646.
- Karlenius, T. C. and Tonissen, K. F. [2010], ‘Thioredoxin and Cancer : A Role for Thioredoxin in all States of Tumor Oxygenation’, *Cancers* **2**(2), 209–232.
- Kasinsky, H. E., Huang, S. Y., Mann, M., Roca, J. and Subirana, J. A. [1985], ‘On the diversity of sperm histones in the vertebrates : IV. Cytochemical and amino acid analysis in Anura’, *The Journal of Experimental Zoology* **234**(1), 33–46.
- Kawasaki, K., Philpott, A., Avilion, A. A., Berrios, M. and Fisher, P. A. [1994], ‘Chromatin decondensation in *Drosophila* embryo extracts’, *The Journal of Biological Chemistry* **269**(13), 10169–10176.
- Kimura, S. [2013], ‘The Nap family proteins, CG5017/Hanabi and Nap1, are essential for *Drosophila* spermiogenesis’, *FEBS Letters* **587**(7), 922–929.
- Kimura, S. and Loppin, B. [2015], ‘Two bromodomain proteins functionally interact to recapitulate an essential BRDT-like function in *Drosophila* spermatocytes’, *Open Biol* **5**(2).
- Kimura, S. and Loppin, B. [submitted], The *Drosophila* chromosomal protein Mst77f is proteocally processed to generate an essential component of mature sperm chromatin.
- Koehler, J. K., Würschmidt, U. and Larsen, M. P. [1983], ‘Nuclear and chromatin structure in rat spermatozoa’, *Gamete Res.* **8**(4), 357–370.
- Konev, A. Y., Tribus, M., Park, S. Y., Podhraski, V., Lim, C. Y., Emelyanov, A. V., Vershilova, E., Pirrotta, V., Kadonaga, J. T., Lusser, A. and Fyodorov, D. V. [2007], ‘CHD1 Motor Protein Is Required for Deposition of Histone Variant H3.3 into Chromatin in Vivo’, *Science* **317**, 1087–1090.
- Kornberg, R. D. [1974], ‘Chromatin structure : a repeating unit of histones and DNA’, *Science* **184**(4139), 868–871.
- Kornberg, R. D. [1977], ‘Structure of Chromatin’, *Annual Review of Biochemistry* **46**(1), 931–954.
- Kossel, A. [1884], ‘Ueber einen peptonartigen Bestandtheil des Zellkerns.’, *Zeitschrift für physiologische Chemie* **8**(6), 511–515.
- Kossel, A. [1897], ‘Ueber die basischen Stoffe des Zellkerns.’, *Zeitschrift für physiologische Chemie* **22**(2), 176–187.
- Kost, N., Kaiser, S., Ostwal, Y., Riedel, D., Stützer, A., Nikolov, M., Rathke, C., Renkawitz-Pohl, R. and Fischle, W. [2015], ‘Multimerization of *Drosophila* sperm protein Mst77f causes a unique condensed chromatin structure’, *Nucleic Acids Res* **43**(6), 3033–3045.
- Krsticevic, F. J., Santos, H. L., Januario, S., Schrago, C. G. and Carvalho, A. B. [2010], ‘Functional Copies of the Mst77f Gene on the Y Chromosome of *Drosophila melanogaster*’, *Genetics* **184**(1), 295–307.

-
- Krsticevic, F. J., Schrago, C. G. and Carvalho, A. B. [2015], ‘Long-Read Single Molecule Sequencing to Resolve Tandem Gene Copies : The Mst77y Region on the *Drosophila melanogaster* Y Chromosome’, *G3 (Bethesda)* **5**(6), 1145–1150.
- Laberge, R.-M. and Boissonneault, G. [2005], ‘On the Nature and Origin of DNA Strand Breaks in Elongating Spermatids’, *Biol Reprod* **73**(2), 289–296.
- Larochelle, S., Pandur, J., Fisher, R. P., Salz, H. K. and Suter, B. [1998], ‘Cdk7 is essential for mitosis and for in vivo Cdk-activating kinase activity’, *Genes Dev.* **12**(3), 370–381.
- Leser, K., Awe, S., Barckmann, B., Renkawitz-Pohl, R. and Rathke, C. [2012], ‘The bromodomain-containing protein tBRD-1 is specifically expressed in spermatocytes and is essential for male fertility’, *Biology Open* **1**(6), 597–606.
- Lewis, J. D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M. J., Chiva, M. and Ausió, J. [2004], ‘Histone H1 and the origin of protamines’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(12), 4148–4152.
- Lewis, J. D., Song, Y., de Jong, M. E., Bagha, S. M. and Ausió, J. [2003], ‘A walk though vertebrate and invertebrate protamines’, *Chromosoma* **111**(8), 473–482.
- Li, J., Huan, Y., Xie, B., Wang, J., Zhao, Y., Jiao, M., Huang, T., Kong, Q. and Liu, Z. [2014], ‘Identification and characterization of an oocyte factor required for sperm decondensation in pig’, *Reproduction* **148**(4), 367–375.
- Lifton, R. P., Goldberg, M. L., Karp, R. W. and Hogness, D. S. [1978], ‘The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster* : functional and evolutionary implications’, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **42**, 1047–1051.
- Lillig, C. H., Berndt, C. and Holmgren, A. [2008], ‘Glutaredoxin systems’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1780**(11), 1304–1317.
- Lillig, C. H. and Holmgren, A. [2006], ‘Thioredoxin and Related Molecules ?From Biology to Health and Disease’, *Antioxidants & Redox Signaling* **9**(1), 25–47.
- Lin, C.-J., Koh, F. M., Wong, P., Conti, M. and Ramalho-Santos, M. [2014], ‘Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote’, *Dev. Cell* **30**(3), 268–279.
- Lüke, L., Tourmente, M., Dopazo, H., Serra, F. and Roldan, E. R. S. [2016], ‘Selective constraints on protamine 2 in primates and rodents’, *BMC Evolutionary Biology* **16**, 21.
- Lüke, L., Tourmente, M. and Roldan, E. R. S. [2016], ‘Sexual Selection of Protamine 1 in Mammals’, *Mol Biol Evol* **33**(1), 174–184.
- Lüke, L., Vicens, A., Tourmente, M. and Roldan, E. R. S. [2014], ‘Evolution of Protamine Genes and Changes in Sperm Head Phenotype in Rodents’, *Biol Reprod* **90**(3), 67.
- Loppin, B., Berger, F. and Couble, P. [2001], ‘The *Drosophila* maternal gene *sé-same* is required for sperm chromatin remodeling at fertilization’, *Chromosoma* **110**(6), 430–440.

- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurençon, A., Karr, T. L. and Couble, P. [2005], 'The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus', *Nature* **437**(7063).
- Loppin, B., Dubruille, R. and Horard, B. [2015], 'The intimate genetics of *Drosophila* fertilization', *Open Biology* **5**(8), 150076.
- Lu, J. and Holmgren, A. [2014], 'The thioredoxin antioxidant system', *Free Radical Biology & Medicine* **66**, 75–87.
- Lu, S. C. [2009], 'Regulation of glutathione synthesis', *Mol Aspects Med* **30**(1-2), 42–59.
- Luciano, A. M., Goudet, G., Perazzoli, F., Lahuec, C. and Gérard, N. [2006], 'Glutathione content and glutathione peroxidase expression in in vivo and in vitro matured equine oocytes', *Mol. Reprod. Dev.* **73**(5), 658–666.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. and Richmond, T. J. [1997], 'Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution', *Nature* **389**(6648).
- Lusser, A., Urwin, D. L. and Kadonaga, J. T. [2005], 'Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly', *Nat Struct Mol Biol* **12**(2), 160–166.
- Lévesque, D., Veilleux, S., Caron, N. and Boissonneault, G. [1998], 'Architectural DNA-Binding Properties of the Spermatidal Transition Proteins 1 and 2', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **252**(3), 602–609.
- Maeda, K., Hägglund, P., Finnie, C., Svensson, B. and Henriksen, A. [2006], 'Structural Basis for Target Protein Recognition by the Protein Disulfide Reductase Thioredoxin', *Structure* **14**(11), 1701–1710.
- Maier, W. M., Nussbaum, G., Domenjoud, L., Klemm, U. and Engel, W. [1990], 'The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene.', *Nucleic Acids Res* **18**(5), 1249–1254.
- Malo, A. F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A. J. and Roldan, E. R. [2006], 'Sperm design and sperm function', *Biol Lett* **2**(2), 246–249.
- Marcon, L. and 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.
- Marzluff, W. F., Gongidi, P., Woods, K. R., Jin, J. and Maltais, L. J. [2002], 'The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes', *Genomics* **80**(5), 487–498.
- McKay, D. J., Renaux, B. S. and Dixon, G. H. [1986], 'Human sperm protamines', *European Journal of Biochemistry* **156**(1), 5–8.
- Meister, A. and Anderson, a. M. E. [1983], 'Glutathione', *Annual Review of Biochemistry* **52**(1), 711–760.

-
- Meistrich, M. L., Mohapatra, B., Shirley, C. R. and Zhao, M. [2003], 'Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis', *Chromosoma* **111**(8), 483–488.
- Meistrich, M. L., Trostle-Weige, P. K., Lin, R., Allis, C. D. and Bhatnagar, Y. M. [1992], 'Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids', *Mol. Reprod. Dev.* **31**(3), 170–181.
- Meyer-Ficca, M. L., Scherthan, H., Bürkle, A. and Meyer, R. G. [2005], 'Poly(ADP-ribose)ylation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis', *Chromosoma* **114**(1), 67–74.
- Miescher, F. [1871], Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen, in 'Medicinischem-chemische Untersuchungen', Berlin : a. Hirschwald edn, Vol. 4, Hoppe-Seyler, Felix, pp. 441–460.
- Miescher, F. [1874], 'Das Protamin, eine neue organische Base aus den Samenfäden des Rheinlachs', *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **7**(1), 376–379.
- Milks, K. J., Moree, B. and Straight, A. F. [2009], 'Dissection of CENP-C directed Centromere and Kinetochore Assembly', *Mol. Biol. Cell* **20**(19), 4246–4255.
- Missirlis, F., Phillips, J. P. and Jäckle, H. [2001], 'Cooperative action of antioxidant defense systems in Drosophila', *Current Biology* **11**(16), 1272–1277.
- Méndez-Lago, M., Bergman, C. M., Pablos, B. d., Tracey, A., Whitehead, S. L. and Villasante, A. [2011], 'A Large Palindrome With Interchromosomal Gene Duplications in the Pericentromeric Region of the D. melanogaster Y Chromosome', *Mol Biol Evol* **28**(7), 1967–1971.
- Mortimer, D. [1985], The Male Factor in Infertility. Part I. Semen analysis., in 'Current Problems in Obstetrics Gynecology and Fertility.', Vol. 8, Chicago, USA : Year Book Medical Publishers, p. 87.
- Mozzetta, C., Boyarchuk, E., Pontis, J. and Ait-Si-Ali, S. [2015], 'Sound of silence : the properties and functions of repressive Lys methyltransferases', *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**(8), 499–513.
- Nelson, J. E. and Krawetz, S. A. [1993], 'Linkage of human spermatid-specific basic nuclear protein genes. Definition and evolution of the P1->P2->TP2 locus.', *J. Biol. Chem.* **268**(4), 2932–2936.
- Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Conrad, M., Drevet, J. R. and Kocer, A. [2012], 'Epididymis Response Partly Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in snGPx4 and GPx5 Double Mutant Mice', *PLoS ONE* **7**(6).
- O'Flaherty, C. [2014], 'Peroxiredoxins : hidden players in the antioxidant defence of human spermatozoa', *Basic Clin Androl* **24**.
- O'Flaherty, C. [2015], 'Redox regulation of mammalian sperm capacitation', *Asian Journal of Andrology* **17**(4), 583–590.
- Ohtsuki, K., Nishikawa, Y., Saito, H., Munakata, H. and Kato, T. [1996], 'DNA-binding sperm proteins with oligo-arginine clusters function as potent activators

- for egg CK-II', *FEBS Letters* **378**(2), 115–120.
- Olins, A. L. and Olins, D. E. [1974], 'Spheroid Chromatin Units (ν Bodies)', *Science* **183**(4122), 330–332.
- Oliva, R. [2006], 'Protamines and male infertility', *Hum. Reprod. Update* **12**(4), 417–435.
- Oliva, R. and Dixon, G. H. [1990], 'Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure', *Journal of Molecular Evolution* **30**(4), 333–346.
- Orsi, G. A., Algazeery, A., Meyer, R. E., Capri, M., Sapey-Triomphe, L. M., Horard, B., Gruffat, H., Couble, P., Ait-Ahmed, O. and Loppin, B. [2013], 'Drosophila Yemanuclein and HIRA Cooperate for De Novo Assembly of H3.3-Containing Nucleosomes in the Male Pronucleus', *PLoS Genet* **9**(2), e1003285.
- Orsi, G. A., Couble, P. and Loppin, B. [2009], 'Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development', *Int. J. Dev. Biol.* **53**(2-3), 231–243.
- Padeken, J., Mendiburo, M. J., Chlamydas, S., Schwarz, H.-J., Kremmer, E. and Heun, P. [2013], 'The Nucleoplasmin Homolog NLP Mediates Centromere Clustering and Anchoring to the Nucleolus', *Molecular Cell* **50**(2), 236–249.
- Palmer, D. K., O'Day, K. and Margolis, R. L. [1990], 'The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei', *Chromosoma* **100**(1), 32–36.
- Pellicena-Pallé, A., Stitzinger, S. M. and Salz, H. K. [1997], 'The function of the Drosophila thioredoxin homologue encoded by the deadhead gene is redox-dependent and blocks the initiation of development but not DNA synthesis', *Mechanisms of Development* **62**(1), 61–65.
- Perreault, S. D., Barbee, R. R. and Slott, V. L. [1988], 'Importance of glutathione in the acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes', *Dev. Biol.* **125**(1), 181–186.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W. and Behne, D. [2001], 'Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation', *The FASEB Journal* **15**(7), 1236–1238.
- Philpott, A. and Leno, G. H. [1992], 'Nucleoplasmin remodels sperm chromatin in Xenopus egg extracts', *Cell* **69**(5), 759–767.
- Philpott, A., Leno, G. H. and Laskey, R. A. [1991], 'Sperm decondensation in Xenopus egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin', *Cell* **65**(4), 569–578.
- Pirrotta, V. [2016], 'The Necessity of Chromatin : A View in Perspective', *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**(1).
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. and Khochbin, S. [2003], 'Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein', *Mol. Cell. Biol.* **23**(15), 5354–5365.

-
- Price, C. S. C., Dyer, K. A. and Coyne, J. A. [1999], ‘Sperm competition between *Drosophila* males involves both displacement and incapacitation’, *Nature* **400**(6743), 449–452.
- Puigdomènech, P., Martínez, P., Cabré, O., Palau, J., Bradbury, E. M. and Crane-Robinson, C. [1976], ‘Studies on the Role and Mode of Operation of the Very-Lysine-Rich Histones in Eukaryote Chromatin’, *European Journal of Biochemistry* **65**(2), 357–363.
- Qian, M.-X., Pang, Y., Liu, C. H., Haratake, K., Du, B.-Y., Ji, D.-Y., Wang, G.-F., Zhu, Q.-Q., Song, W., Yu, Y., Zhang, X.-X., Huang, H.-T., Miao, S., Chen, L.-B., Zhang, Z.-H., Liang, Y.-N., Liu, S., Cha, H., Yang, D., Zhai, Y., Komatsu, T., Tsuruta, F., Li, H., Cao, C., Li, W., Li, G.-H., Cheng, Y., Chiba, T., Wang, L., Goldberg, A. L., Shen, Y. and Qiu, X.-B. [2013], ‘Acetylation-Mediated Proteasomal Degradation of Core Histones during DNA Repair and Spermatogenesis’, *Cell* **153**(5), 1012–1024.
- Radyuk, S. N., Klichko, V. I., Michalak, K. and Orr, W. C. [2013], ‘The effect of peroxiredoxin 4 on fly physiology is a complex interplay of antioxidant and signaling functions’, *FASEB J* **27**(4), 1426–1438.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. and Renkawitz-Pohl, R. [2014], ‘Chromatin dynamics during spermiogenesis’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1839**(3), 155–168.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R. and Renkawitz-Pohl, R. [2007], ‘Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*’, *Journal of Cell Science* **120**(9), 1689–1700.
- Rathke, C., Barckmann, B., Burkhard, S., Jayaramaiah-Raja, S., Roote, J. and Renkawitz-Pohl, R. [2010], ‘Distinct functions of Mst77f and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis’, *European Journal of Cell Biology* **89**(4), 326–338.
- Raychaudhuri, N., Dubrulle, R., Orsi, G. A., Bagheri, H. C., Loppin, B. and Lehner, C. F. [2012], ‘Transgenerational Propagation and Quantitative Maintenance of Paternal Centromeres Depends on Cid/Cenp-A Presence in *Drosophila* Sperm’, *PLoS Biol* **10**(12).
- Reece, J., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B. and Campbell, N. A. [2011], *Campbell Biology*, Benjamin Cummings / Pearson.
- Reeves, R. [2010], ‘HMG Nuclear Proteins : Linking Chromatin Structure to Cellular Phenotype’, *Biochim Biophys Acta* **1799**(1-2), 3.
- Reeves, R. H., Gearhart, J. D., Hecht, N. B., Yelick, P., Johnson, P. and O’Brien, S. J. [1989], ‘Mapping of PRM 1 to Human Chromosome 16 and Tight Linkage of Prm-1 and Prm-2 on Mouse Chromosome 16’, *J Hered* **80**(6), 442–446.
- Retief, J. D., Krajewski, C., Westerman, M., Winkfein, R. J. and Dixon, G. H. [1995], ‘Molecular Phylogeny and Evolution of Marsupial Protamine P1 Genes’,

- Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **259**(1354), 7–14.
- Retief, J. D., Rees, J. S., Westerman, M. and Dixon, G. H. [1995], ‘Convergent evolution of cysteine residues in sperm protamines of one genus of marsupials, the Planigales.’, *Mol Biol Evol* **12**(4), 708–712.
- Richmond, T. J. and Davey, C. A. [2003], ‘The structure of DNA in the nucleosome core’, *Nature* **423**(6936), 145–150.
- Robinson, D. N. and Cooley, a. L. [1997], ‘Genetic Analysis of the Actin Cytoskeleton in the Drosophila Ovary’, *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**(1), 147–170.
- Romanato, M., Julianelli, V., Zappi, M., Calvo, L. and Calvo, J. [2008], ‘The presence of heparan sulfate in the mammalian oocyte provides a clue to human sperm nuclear decondensation in vivo’, *Human Reproduction* **23**(5), 1145–1150.
- Rooney, A. P., Zhang, J. and Nei, M. [2000], ‘An Unusual Form of Purifying Selection in a Sperm Protein’, *Molecular Biology and Evolution* **17**(2), 278–283.
- Roque, A., Ponte, I. and Suau, P. [2011], ‘Secondary structure of protamine in sperm nuclei : an infrared spectroscopy study’, *BMC Structural Biology* **11**, 14.
- Salz, H. K., Flickinger, T. W., Mittendorf, E., Pellicena-Pallé, A., Petschek, J. P. and Albrecht, E. B. [1994], ‘The Drosophila maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development.’, *Genetics* **136**(3), 1075–1086.
- Saperas, N. and Ausió, J. [2013], ‘Sperm Nuclear Basic Proteins of Tunicates and the Origin of Protamines’, *Biol Bull* **224**(3), 127–136.
- Saperas, N., Chiva, M., Pfeiffer, D. C., Kasinsky, H. E. and Ausió, J. [1997], ‘Sperm Nuclear Basic Proteins (SNBPs) of Agnathans and Chondrichthyans : Variability and Evolution of Sperm Proteins in Fish’, *Journal of Molecular Evolution* **44**(4), 422–431.
- Schnakenberg, S. L., Siegal, M. L. and Bloch Qazi, M. C. [2012], ‘Oh, the places theyâll go : Female sperm storage and sperm precedence in Drosophila melanogaster’, *Spermatogenesis* **2**(3), 224–235.
- Shalgi, R., Seligman, J. and Kosower, N. S. [1989], ‘Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation : analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane.’, *Biology of Reproduction* **40**(5), 1037–1045.
- Shang, E., Nickerson, H. D., Wen, D., Wang, X. and 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.
- Shirley, C. R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R. and Meistrich, M. L. [2004], ‘Abnormalities and Reduced Reproductive Potential of Sperm from Tnp1- and Tnp2-Null Double Mutant Mice’, *Biol Reprod* **71**(4), 1220–1229.

-
- Singh, J. and Rao, M. R. [1988], 'Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle', *Biochem. Int.* **17**(4), 701–710.
- Smith, T. B., Baker, M. A., Connaughton, H. S., Habenicht, U. and Aitken, R. J. [2013], 'Functional deletion of Txndc2 and Txndc3 increases the susceptibility of spermatozoa to age-related oxidative stress', *Free Radical Biology and Medicine* **65**, 872–881.
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. and Steger, K. [2002], 'Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis', *Andrologia* **34**(6), 384–390.
- Spradling, A. C. [1993], Developmental genetics of oogenesis, in 'The development of *Drosophila melanogaster*', cold spring harbor laboratory press edn, Vol. 1, Bate, Michael and Arias, Alfonso Martinez, pp. 1–70.
- Stros, M., Launholt, D. and Grasser, K. D. [2007], 'The HMG-box : a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins', *Cell. Mol. Life Sci.* **64**(19-20), 2590–2606.
- Sutovsky, P. and Schatten, G. [1997], 'Depletion of glutathione during bovine oocyte maturation reversibly blocks the decondensation of the male pronucleus and pronuclear apposition during fertilization.', *Biology of Reproduction* **56**(6), 1503–1512.
- Svensson, M. J., Chen, J. D., Pirrotta, V. and Larsson, J. [2003], 'The ThioredoxinT and deadhead gene pair encode testis- and ovary-specific thioredoxins in *Drosophila melanogaster*', *Chromosoma* **112**(3), 133–143.
- Svensson, M. J. and Larsson, J. [2007], 'Thioredoxin-2 affects lifespan and oxidative stress in *Drosophila* : Thioredoxins in *Drosophila*', *Hereditas* **144**(1), 25–32.
- Svensson, M. J., Stenberg, P. and Larsson, J. [2007], 'Organization and regulation of sex-specific thioredoxin encoding genes in the genus *Drosophila*', *Development Genes and Evolution* **217**(9), 639–650.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. [2004], 'Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis', *Cell* **116**(1), 51–61.
- Tanphaichitr, N., Sobhon, P., Taluppeth, N. and Chalermisarachai, P. [1978], 'Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man', *Experimental Cell Research* **117**(2), 347–356.
- Tessarz, P. and Kouzarides, T. [2014], 'Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics', *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(11), 703–708.
- Tirmarche, S., Kimura, S., Sapey-Triomphe, L., Sullivan, W., Landmann, F. and Loppin, B. [2014], '*Drosophila* protamine-like mst35ba and mst35bb are required for proper sperm nuclear morphology but are dispensable for male fertility', *G3* **4**(11), 2241–2245.
- Tsuda, M., Ootaka, R., Ohkura, C., Kishita, Y., Seong, K.-H., Matsuo, T. and Aigaki, T. [2010], 'Loss of Trx-2 enhances oxidative stress-dependent phenotypes

- in *Drosophila*', *FEBS Letters* **584**(15), 3398–3401.
- Turner, B. M. [1991], 'Histone acetylation and control of gene expression', *Journal of Cell Science* **99**(1), 13–20.
- Tyler, J. K., Collins, K. A., Prasad-Sinha, J., Amiott, E., Bulger, M., Harte, P. J., Kobayashi, R. and Kadonaga, J. T. [2001], 'Interaction between the *Drosophila* CAF-1 and ASF1 Chromatin Assembly Factors', *Mol. Cell. Biol.* **21**(19), 6574–6584.
- Utsuno, H., Miyamoto, T., Oka, K. and Shiozawa, T. [2014], 'Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa', *Hum. Reprod.* **29**(11), 2374–2381.
- van der Heijden, G. W., Dieker, J. W., Derijck, A. A. H. A., Muller, S., Berden, J. H. M., Braat, D. D. M., van der Vlag, J. and de Boer, P. [2005], 'Asymmetry in Histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote', *Mechanisms of Development* **122**(9), 1008–1022.
- Vilfan, I. D., Conwell, C. C. and Hud, N. V. [2004], 'Formation of Native-like Mammalian Sperm Cell Chromatin with Folded Bull Protamine', *Journal of Biological Chemistry* **279**(19), 20088–20095.
- Vries, M. D., Ramos, L., Housein, Z. and Boer, P. D. [2012], 'Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis', *Biology Open* **1**(5), 446–457.
- Wahl, M. C., Irmeler, A., Hecker, B., Schirmer, R. H. and Becker, K. [2005], 'Comparative Structural Analysis of Oxidized and Reduced Thioredoxin from *Drosophila melanogaster*', *Journal of Molecular Biology* **345**(5), 1119–1130.
- Wasbrough, E. R., Dorus, S., Hester, S., Howard-Murkin, J., Lilley, K., Wilkin, E., Polpitiya, A., Petritis, K. and Karr, T. L. [2010], 'The *Drosophila melanogaster* sperm proteome-II (DmSP-II)', *Journal of Proteomics* **73**(11), 2171–2185.
- Watson, J. D. and Crick, F. H. [1953], 'Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid', *Nature* **171**(4356), 737–738.
- Wu, F., Caron, C., Robertis, C. D., Khochbin, S. and Rousseaux, S. [2008], 'Testis-Specific Histone Variants H2al1/2 Rapidly Disappear from Paternal Heterochromatin after Fertilization', *Journal of Reproduction and Development* **54**(6), 413–417.
- Yelick, P. C., Balhorn, R., Johnson, P. A., Corzett, M., Mazrimas, J. A., Kleene, K. C. and 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.
- York-Andersen, A. H., Parton, R. M., Bi, C. J., Bromley, C. L., Davis, I. and Weil, T. T. [2015], 'A single and rapid calcium wave at egg activation in *Drosophila*', *Biol Open* **4**(4), 553–560.
- Yoshida, M., Ishigaki, K., Nagai, T., Chikyu, M. and Pursel, V. G. [1993], 'Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes : relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus.', *Biology of reproduction* **49**(1), 89–94.

-
- Yu, Y. E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C. R., Deng, J. M., Russell, L. D., Weil, M. M., Behringer, R. R. and Meistrich, M. L. [2000], 'Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(9), 4683–4688.
- Zalensky, A. O., Breneman, J. W., Zalenskaya, I. A., Brinkley, B. R. and Bradbury, E. M. [1993], 'Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm', *Chromosoma* **102**(8), 509–518.
- Zhao, M., Shirley, C. R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R. R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R. and Meistrich, M. L. [2004], 'Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development', *Genesis* **38**(4), 200–213.
- Zhao, M., Shirley, C. R., Yu, Y. E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J. M., Arango, N. A., Terry, N. H. A., Weil, M. M., Russell, L. D., Behringer, R. R. and 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.
- Zhong, L. and Belote, J. M. [2007], 'The testis-specific proteasome subunit Pros ?6t of *D. melanogaster* is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis', *Development* **134**(19), 3517–3525.
- Zhu, P. and Li, G. [2016], 'Structural insights of nucleosome and the 30-nm chromatin fiber', *Current Opinion in Structural Biology* **36**, 106–115.

