



Chromatin reorganization during spermatogenesis : double bromodomain protein BRDT multiple task

Jonathan Gaucher

► To cite this version:

Jonathan Gaucher. Chromatin reorganization during spermatogenesis : double bromodomain protein BRDT multiple task. Biodiversity. Université de Grenoble, 2011. English. NNT : 2011GRENV088 . tel-01469951

HAL Id: tel-01469951

<https://theses.hal.science/tel-01469951>

Submitted on 16 Feb 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biodiversité, Développement et Oncogénèse**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jonathan GAUCHER

Thèse dirigée par **Sophie ROUSSEAUX**
préparée au sein du **Laboratoire de Saadi KHOCHBIN**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Rôle de la protéine à double bromodomaine BRDT dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse

Thèse soutenue publiquement le **20 décembre 2011**,
devant le jury composé de :

Pr. Stefan NONCHEV

Université Joseph Fourier, Grenoble

Président

Dr. Valérie BORDE

Institut Curie, Paris

Rapporteur

Dr. Patrick LOMONTE

Université Claude Bernard, Lyon

Rapporteur

Dr. Sophie ROUSSEAUX

Université Joseph Fourier, Grenoble

Examineur



RESUME / ABSTRACT

BRDT et la réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse

Pendant la spermiogénèse, phase haploïde de la gamétogénèse mâle, le génome mâle subit une réorganisation majeure, durant laquelle la plupart des histones sont enlevées et remplacées par les protéines de transition (TP) et les protamines. Ce processus conduit à la compaction extrême du génome mâle au sein du noyau du spermatozoïde.

Dans les spermatides allongées, les histones sont hyperacétylées juste avant leur éviction. Nous avons émis l'hypothèse que cette acétylation massive des histones pourrait être un signal pour l'enlèvement des histones et le recrutement de la machinerie de remodelage de la chromatine. BRDT est une protéine spécifique du testicule, appartenant à la famille BET, qui possède deux bromodomains capables de reconnaître les histones acétylées et qui a la capacité unique de compacter la chromatine hyperacétylée (Pivot-Pajot, 2003). Le premier bromodomaine de BRDT apparaît crucial pour ces fonctions (Morinière, 2009). Les souris porteuses d'une délétion du premier bromodomaine de BRDT, BD1, présentent une stérilité des mâles associée à des anomalies survenant lors de la spermiogénèse (Shang, 2007). Nous avons pu caractériser la fonction physiologique du premier bromodomaine de BRDT et montrer son rôle crucial dans le remplacement des histones hyperacétylées par les TP et les protamines au cours de la spermiogénèse.

Afin d'explorer les fonctions potentielles des autres domaines de BRDT, nous avons étudié des souris ayant une invalidation génétique complète de Brdt. Cette perte de BRDT engendre aussi une stérilité mâle, mais le phénotype montre une absence totale de cellules post-méiotiques. Enfin, un troisième modèle de souris a été obtenu suite à notre tentative de produire des souris porteuses d'une version tagguée de la protéine. L'exploration de ces modèles a permis de démontrer un rôle de BRDT, indépendant de la présence de BD1, dans la régulation du programme d'expression des gènes lors de l'entrée en méiose.

BRDT possède à la fois une fonction méiotique et post-méiotique avec l'implication de différents domaines protéiques.

Involvement of BRDT in chromatin reorganization during spermatogenesis

During spermiogenesis, the haploid phase of male gametogenesis, the male genome undergoes a major chromatin reorganization, during which most histones are removed and replaced by transition proteins (TP) and protamines. This process led to the tight compaction of the male genome into the sperm nucleus.

In elongating spermatids, histones are hyperacetylated just before their eviction. We have hypothesized that the massive acetylation of histones could be a signal for the removal of histones and the recruitment of the chromatin remodeling machinery. BRDT is a testis-specific protein, which belongs to the BET family. It has two bromodomains able to recognize acetylated histones and has the unique ability to compact hyperacetylated chromatin (Pivot-Pajot, 2003). The first bromodomain of BRDT appears crucial for these functions (Morinière, 2009). Mice carrying a deletion of the first bromodomain BD1 exhibit male sterility associated with abnormalities occurring during spermiogenesis (Shang, 2007). We were able to characterize the physiological function of the first bromodomain of BRDT and demonstrate its crucial role in the replacement of hyperacetylated histones by TP and protamines during spermiogenesis.

To explore the potential functions of others domains of the BRDT protein, we have studied mice with invalidation of the *Brdt* gene. This loss of BRDT also produces male sterility, but the phenotype shows a complete lack of post-meiotic cells. A third mouse model was obtained following our attempt to produce mice with a tagged version of the protein. The exploration of these models has demonstrated a role of BRDT, independent of the presence of BD1, in regulating the program of gene expression during entry into meiosis.

BRDT has both a meiotic and a post-meiotic function with the involvement of different protein domains.

SOMMAIRE

RESUME/ABSTRACT.....	1
SOMMAIRE.....	5
LISTE DES FIGURES.....	13
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE.....	17
<u>I. La Chromatine</u>	19
1. Structure et organisation fonctionnelle de la chromatine.....	19
1.1. A la découverte de la molécule de l'hérédité.....	19
- De la transmission des caractères à l'ADN	
- De la génétique à l'épigénétique	
1.2. Structure et composition de la chromatine.....	22
- La caractérisation du nucléosome	
- Les histones de cœur	
- Les histones de liaison	
1.3. Organisation fonctionnelle de la chromatine.....	26
- Les niveaux d'organisation de la chromatine	
- La compartimentalisation fonctionnelle de la chromatine	
2. Dynamique et plasticité de la chromatine.....	28
2.1. Incorporation de variants d'histones.....	29
2.2. Assemblage et désassemblage de la chromatine.....	30
- Les chaperonnes d'histones	
- Les complexes de remodelage ATP-dépendant	
2.3. Dynamique des modifications post-traductionnelles des histones (MPTh).....	34

- Une multitude de MPTh	
- Régulation et fonctions des MPTh	
2.4. Effecteurs du code histone.....	38
- Les modules de liaison aux MPTh	
- La famille des protéines à bromodomaine BET	
2.5. Modification de l'ADN par méthylation.....	44
- Régulation de la méthylation de l'ADN	
- Rôles de la méthylation de l'ADN	
<u>II. La spermatogenèse comme modèle d'étude de la réorganisation de la chromatine.....</u>	<u>49</u>
1. Déroulement de la spermatogenèse.....	49
1.1. Anatomie du testicule et de l'épididyme.....	49
1.2. Cycle de l'épithélium séminifère.....	51
- Chronologie de la spermatogenèse	
- Stades du cycle spermatogénique	
1.3. Les différentes phases de la spermatogenèse adulte.....	55
- La phase mitotique : auto-renouvellement et prolifération	
- La méiose : recombinaison génétique et divisions méiotiques	
- La spermiogenèse : empaquetage du génome	
- La maturation et la capacitation des spermatozoïdes	
1.4. La régulation transcriptionnelle au cours de la spermatogenèse.....	67
- Le métabolisme des ARN au cours de la spermatogenèse	
- L'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels	
2. Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse.....	72
2.1. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale.....	72
- L'empreinte parentale	

- Mise en place de l’empreinte parentale	
2.2. Incorporation de variants d’histones au cours de la spermatogenèse.....	75
- Les variants exprimés spécifiquement dans les cellules germinales	
- Les variants ubiquitaires exprimées dans les cellules germinales	
2.3. Dynamique des MPTh au cours de la spermatogenèse.....	80
- Acétylation	
- Méthylation	
- Phosphorylation	
- Ubiquitination	
- ADPriboseylation	
2.4. Remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines.....	83
- Les protéines de transition (TP)	
- Les protamines	
- Mécanisme moléculaire de l’échange des histones	
2.5. Organisation de la chromatine au sein du spermatozoïde.....	88
- Structure finale du noyau spermatique	
- L’épigénome transmis par le spermatozoïde	
<u>III. Etudes bibliographiques.....</u>	94
1. Les secrets de la disparition des histones au cours de la spermiogenèse.....	94
- Présentation de la revue publiée	
2. Les modèles de souris pour l’étude du remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse.....	94
- Présentation de la revue publiée	
<u>IV. Objectifs et plan de travail.....</u>	95

CHAPITRE 2 : RESULTATS.....	97
1. Les fonctions de BRDT au cours de la méiose et de la spermiogenèse.....	99
- Introduction	
- Principaux résultats	
- Présentation de l'article soumis	
2. Caractérisation structurale et fonctionnelle des bromodomaines de BRDT.....	113
- Introduction	
- Principaux résultats	
- Présentation de l'article publié	
3. Etude de la dynamique des MPT de H3 et H4 au cours de la gamétogenèse.....	115
- Introduction	
- Principaux résultats	
- Présentation de l'article publié	
4. Identification de facteurs impliqués dans la réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse.....	117
- Introduction	
- Principaux résultats	
- Présentation de l'article publié	
5. BRDT et l'infertilité humaine.....	119
- Présentation des recherches en cours	
6. BRDT et le remodelage de la chromatine acétylée.....	121
- Présentation des recherches en cours	
7. L'acétylation de H3K56 au cours de la spermatogenèse.....	123
- Présentation des recherches en cours	
8. Les multiples rôles de BRDT au cours de la spermatogenèse.....	125
- Présentation des recherches en cours	

CHAPITRE 3 : DISCUSSION / PERSPECTIVES.....	131
1. Fonctions de la vague d'acétylation au cours de la spermiogenèse.....	133
- Dynamique et régulation de la vague d'acétylation post-méiotique	
- L'acétylation des histones participe à la déstabilisation des nucléosomes	
- Le recrutement de facteurs à bromodomaine spécifiques	
2. Fonctions de la protéine BRDT au cours de la spermiogenèse.....	136
- L'échange des histones par les TP et les protamines	
- L'incorporation de variants d'histones	
- Vers un modèle <i>in vitro</i> d'échange des histones	
- La maintenance de l'empreinte parentale	
3. Fonctions de la protéine BRDT au cours de la méiose.....	141
- La régulation des programmes d'expression spermatogénique	
- L'architecture de la chromatine	
- Vers un modèle <i>in vitro</i> de différenciation des cellules germinales	
4. Implication de la protéine BRDT dans la fertilité humaine.....	143
- La mutation K61Q	
- Vers un mécanisme d'autorégulation de la fonction de la protéine BRDT	
5. Implication de la protéine BRDT dans les cancers.....	145
- Les antigènes « Cancer/Testis » (CT)	
- BRDT dans les cancers	
- Vers une thérapie ciblée	
6. Conclusion générale.....	147
CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE.....	149
CHAPITRE 5 : ANNEXE.....	169

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : De la transmission des caractères à l'ADN.....	20
Figure n°2 : De la génétique à l'épigénétique.....	22
Figure n°3 : Caractérisation du nucléosome.....	24
Figure n°4 : Structure et assemblage de l'histone de liaison H1.....	25
Figure n°5 : Niveaux d'organisation de la chromatine.....	27
Figure n°6 : Compartimentalisation de la chromatine.....	28
Figure n°7 : Dynamique et plasticité de la chromatine.....	29
Figure n°8 : Classification des variants en fonction de leur distribution tissulaire chez la souris.....	30
Figure n°9 : Fonctions cellulaires des chaperonnes d'histones.....	31
Figure n°10 : La mobilisation des nucléosomes.....	34
Figure n°11 : Les principales MPTh et leur régulation.....	35
Figure n°12 : Les principales MPTh et leurs fonctions associées.....	38
Figure n°13 : Les lecteurs du code histone.....	39
Figure n°14: Structure des bromodomaines.....	40
Figure n°15 : Les membres de la famille BET.....	41
Figure n°16 : Rôle de BRD4 dans la transcription.....	44
Figure n°17 : La méthylation de l'ADN.....	45
Figure n°18 : Rôle de la méthylation de l'ADN dans la transcription.....	47
Figure n°19 : Anatomie du testicule et de l'épididyme.....	50
Figure n°20 : Chronologie de la spermatogenèse.....	53
Figure n°21 : Stades du cycle spermatogénique chez la souris.....	54
Figure n°22 : La phase mitotique de la spermatogenèse.....	56
Figure n°23 : La méiose et ses deux divisions méiotiques.....	59
Figure n°24 : Synapsis et crossing-over au cours de la prophase I.....	61
Figure n°25 : Assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I.....	62
Figure n°26 : La recombinaison méiotique au cours de la prophase I.....	63
Figure n°27 : Les stades de la spermiogenèse chez la souris.	64

Figure n°28 : La spermiogenèse chez l'homme.....	66
Figure n°29 : Expression des piARN au cours de la spermatogenèse.....	69
Figure n°30 : Comportement des chromosomes sexuels au cours de la méiose.....	71
Figure n°31 : Découverte de l'empreinte parentale.....	73
Figure n°32 : Mise en place de l'empreinte paternelle au cours de la spermatogenèse.....	74
Figure n°33 : Incorporation de variants d'histones au cours de la spermatogenèse.....	79
Figure n°34 : La vague d'acétylation au cours de la spermiogenèse.....	80
Figure n°35 : Les MPTh et leurs enzymes de modification au cours de la spermatogenèse..	83
Figure n°36 : Remplacement des histones par les protéines de transition (TP) et les protamines au cours de la spermiogenèse.....	84
Figure n°37 : Les protéines de transition et les protamines chez la souris.....	85
Figure n°38 : Réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse.....	88
Figure n°39 : Organisation de la chromatine au sein du spermatozoïde.....	90
Figure n°40 : De la fécondation au développement embryonnaire précoce.....	93.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GENERALE

I. La Chromatine

1. Structure et organisation fonctionnelle de la chromatine

Aussi loin que remontent les documents écrits, nous avons remarqué et commenté les ressemblances existant entre les membres d'une même famille. La transmission de ces caractères d'une génération à la suivante est appelée hérédité. Au XIX^e siècle, Gregor Mendel (1822-1884) formule les lois de transmission des caractères qui portent son nom et qui sont à la base de la génétique. Parallèlement aux expériences de Mendel sur les pois, les premières manipulations de biologie cellulaire montrent l'importance des chromosomes dans cette transmission des caractères héréditaires.

1.1. A la découverte de la molécule de l'hérédité

- De la transmission des caractères à l'ADN

En 1882, Walther Flemming (1843-1905), l'un des fondateurs de la cytogénétique, observe au microscope une structure dense au sein du noyau qui absorbe les colorants basophiles comme les anilines. Il nomme cette structure "chromatine" (en référence au grec *chroma*, "coloré"). Il décrit pour la première fois, grâce à cette coloration, les étapes d'une mitose en visualisant la forme la plus compacte de la chromatine, les chromosomes (voir figure n°1A). En 1902, Walter Sutton (1877-1916) est le premier à observer une méiose et propose la théorie chromosomique de l'hérédité : les chromosomes seraient les supports des gènes. Il remarque que le modèle de séparation des chromosomes supporte tout à fait la théorie de Mendel. Sa théorie sera démontrée en 1911 par les travaux de Thomas Morgan (1866-1945) sur la génétique de la drosophile. La découverte et la caractérisation de la composition chimique de la chromatine se sont toutefois faites en plusieurs étapes. En 1869, Johann Friedrich Miescher (1844-1895) isole des noyaux cellulaires et met en évidence la présence d'une composante riche en phosphore qu'il nomme nucléine (du latin *nucleus*, "noyau"). Miescher démontre la présence de la nucléine dans les spermatozoïdes de plusieurs espèces, et émet l'hypothèse de son rôle dans la transmission des caractères héréditaires, seulement quatre ans après la publication des travaux de Mendel. En 1889, Richard Altmann (1852-1900) sépare à partir de la nucléine, des protéines et une substance acide, l'acide nucléique. En 1884, Albrecht Kossel (1853-1927) purifie la fraction protéique à partir de noyaux d'érythrocytes de poulet (Kossel, 1911) et baptise ces protéines "histones" (un mélange des termes *histos*, "tissue" en grec, et *peptones*, "protéines inconnues"). En 1896,

Kossel découvre que l'acide nucléique se compose de 4 bases azotées (A, C, T, G). En 1928, Phoebus Aaron Levene (1869-1940) identifie la présence de désoxyribose dans l'acide nucléique. On parle alors de l'acide désoxyribonucléique ou ADN. En 1944, Oswald Avery (1877-1955) découvre que l'ADN est responsable de la transformation génétique des bactéries et que ce serait bien le support de l'hérédité. Mais, certains scientifiques restent sceptiques et n'abandonnent pas l'idée que les protéines puissent porter l'information génétique. Quelques années plus tard, Al Hershey (1908–1997) et Martha Chase (1927-2003), qui travaillent sur les bactériophages, réalisent l'expérience de biologie moléculaire qui finit par convaincre la communauté scientifique. Ils démontrent que l'ADN est à l'origine de la reproduction du bactériophage et donc porteur de l'information génétique (Hershey and Chase, 1952). La structure de l'ADN proposée par Watson et Crick en 1953 achève de définir l'ADN comme macromolécule codante et permet de commencer à comprendre les fondements moléculaires des lois de Mendel (Watson and Crick, 1953). James Watson et Francis Crick s'appuyèrent sur un fait déjà établi par Erwin Chargaff (1905-2002) : pour une espèce donnée les quantités de bases A et T sont sensiblement égales, ainsi que les quantités de bases C et G. Par exemple chez l'homme : A=30,4 % et T=30,1 % ; C=19,6 % et G=19,9 %. Ce sont les règles d'équivalence de Chargaff (Chargaff et al., 1949). Cela leur a suggéré la complémentarité des bases. L'information portée par l'ADN est lue en utilisant le code génétique, qui établit la séquence des acides aminés dans les protéines.

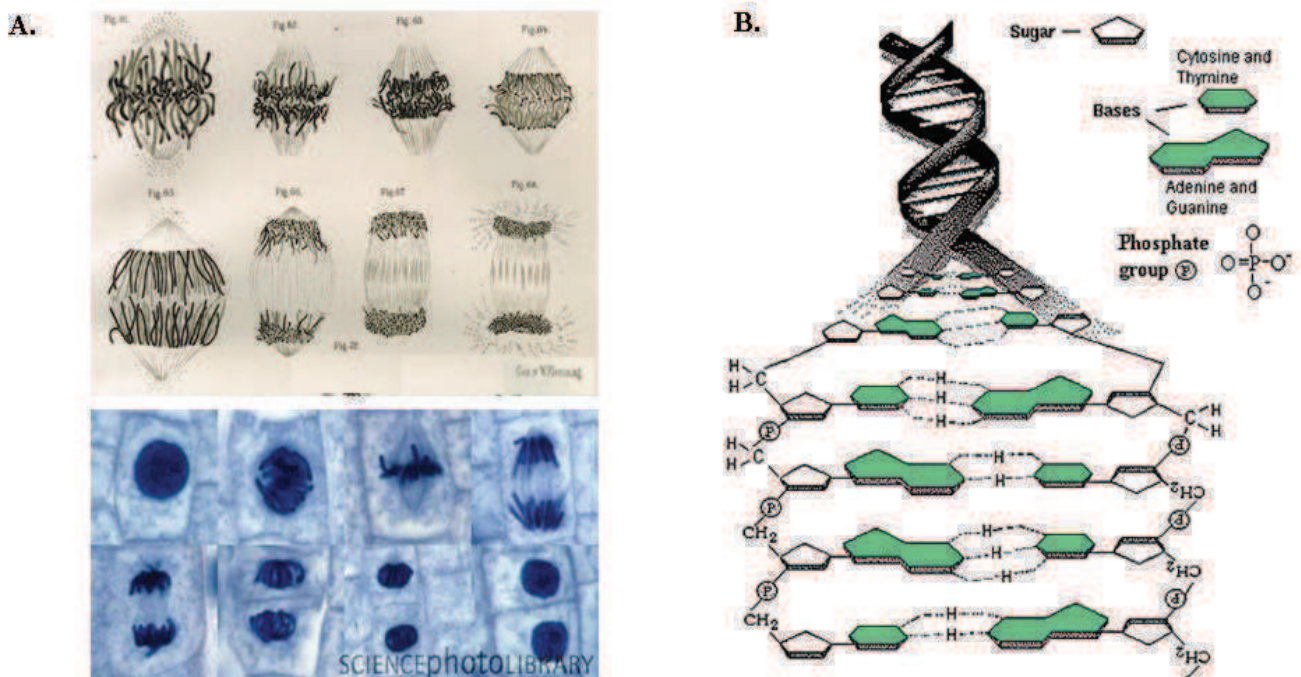


Figure n°1 : De la transmission des caractères à l'ADN. (A) Cellules animales en mitose dont on distingue clairement les chromosomes. Dessins de W. Flemming. Photos de cellules végétales en mitose (www.sciencephoto.com). (B) Structure et composition de la double hélice d'ADN. L'ADN est composé d'un squelette en sucre (le désoxyribose) relié par des liaisons esters aux groupements

phosphates. Chacune des bases (A, T, C, G) est attachée à un sucre. La combinaison de séquence des quatre bases le long du squelette détermine l'information génétique (www.accessexcellence.org).

- De la génétique à l'épigénétique

Cependant, restreindre le support de l'hérédité à l'ADN est très limitant, car cela ne permet pas d'expliquer comment deux cellules d'un même organisme, contenant le même génôme, sont différentes et comment elles transmettront leurs caractères différenciés à leur descendance (voir figure n°2A). Il faut donc "programmer" cette information génétique codée par l'ADN par des processus dits épigénétiques. Une autre preuve de la notion d'épigénétique est l'ensemble des différences physiques et biologiques qui apparaissent chez les vrais jumeaux (monozygotes) au cours de leur vie. L'épigénétique serait en fait "l'ensemble de ces choses bizarres et merveilleuses que la génétique ne sait pas expliquer." Denise Barlow (Vienne, Autriche).

Historiquement, le mot "épigenèse" remonte à Aristote (-384 -322) qui nomme ainsi le développement d'un œuf informe de façon graduelle aboutissant à un organisme aux tissus différenciés. Cette théorie s'opposa à celle du préformationnisme qui postulait que l'être vivant préexistait en miniature dans le germe. La controverse entre épigénisme et préformationnisme fut une controverse majeure de la biologie au XIX^e siècle. On attribue la paternité de l'épigénétique dans son sens moderne au biologiste Conrad Hal Waddington (1905-1975) qui la définit comme "la branche de la biologie qui étudie les interactions entre les gènes et leurs produits qui transforment le phénotype en un être" (voir figure n°2B). Il essaya de comprendre comment des modifications environnementales (température ou drogues) pouvaient influencer sur le développement d'un organisme (Waddington, 1952).

A l'heure actuelle, la définition la plus courante de l'épigénétique est "l'étude des changements héréditaires dans la fonction des gènes, ayant lieu sans altération de la séquence d'ADN". La composante protéique de la chromatine fournit ainsi un répertoire élargi d'informations qui s'ajoute à celle apportée par le code génétique (voir figure n°2C). Les propriétés et la composition de la chromatine sont dynamiques et varient d'un type cellulaire à l'autre, au cours du développement et de la différenciation.

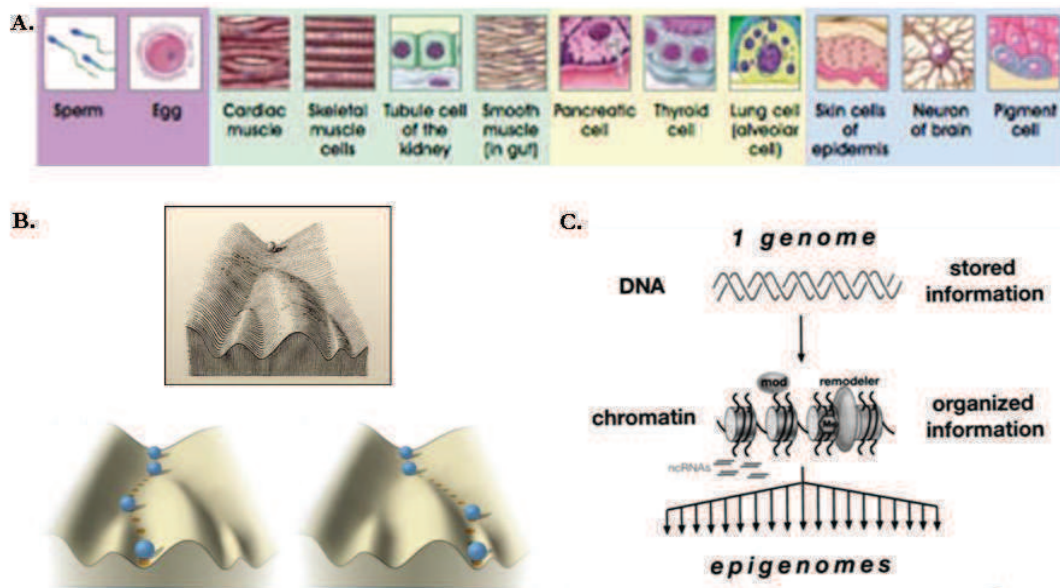


Figure n°2 : De la génétique à l'épigénétique. (A) Il existe près de 200 types cellulaires différents chez l'homme mais tous possèdent le même génome (www.stemcells.nih.gov). (B) Paysage épigénétique de C.H. Waddington (d'après Waddington, 1952). On peut imaginer que la bille bleue en haut de la colline est une cellule totipotente et qu'elle pourra emprunter l'un des différents chemins (correspondant à différentes voies de différenciation). (C) L'organisation de l'ADN sous forme de chromatine fournit un répertoire élargi d'information. A un génome, on associe une multitude d'épigénomes (www.epigenome-noe.net).

1.2. Structure et composition de la chromatine

- La caractérisation du nucléosome

Historiquement, la nature de la chromatine a été identifiée par des méthodes biochimiques et par microscopie électronique. La digestion partielle de la chromatine par la nucléase S7 génère de multiples fragments d'ADN de 180-200 paires de bases qu'on peut visualiser après migration électrophorétique (voir figure n°3A ; Hewish and Burgoyne, 1973). Cette structure régulière de la chromatine, confirmée plus tard par la microscopie électronique, révèle des particules espacées à intervalle régulier, en "collier de perles" (Olins and Olins, 1974 ; Oudet et al., 1975). En parallèle, des analyses biochimiques permettent de déterminer la stœchiométrie ADN 1 : 1 histones de cœur au sein du nucléosome (Kornberg and Thomas, 1974). Pierre Chambon définit le nucléosome comme unité fondamentale de la chromatine (Germond et al., 1976).

Le nucléosome se compose d'une particule de cœur et d'une région de liaison. La particule de cœur, très conservée entre espèce, se compose de 146 paires de bases d'ADN enroulé 1.7 fois autour d'un octamère d'histones contenant 2 copies de chaque histone H3, H4, H2A et H2B. La région de liaison a une longueur qui peut varier en fonction des espèces et des types cellulaires. Ainsi, la longueur totale de l'ADN au sein du nucléosome fluctue selon les espèces entre 160 et 241 paires de bases (Spadafora et al., 1976). La structure du nucléosome a été déterminée par cristallographie aux rayons X (voir figure n°3B ; Finch et al., 1977 ; Luger et al., 1997). Cette structure révèle comment l'ADN s'enroule autour de l'octamère d'histones mais aussi comment les histones interagissent entre elles (Richmond and Davey, 2003).

- Les histones de cœur

Les histones de cœur H3, H4, H2A et H2B sont de petites protéines basiques très conservées au cours de l'évolution (voir figure n°3C). La région la plus conservée est la partie centrale. Cette région comporte le domaine "histone fold" composé de trois hélices alpha séparées par deux boucles flexibles (voir figure n°3D ; Arents et al., 1991). Le motif de dimérisation "histone fold" permet aux histones d'interagir entre elles (H2A-H2B et H3-H4), via des interactions de nature hydrophobe. Les interactions entre H2A et H2B ainsi qu'entre H3 et H4 sont de type "poignée de mains" ou "handshake" (voir figure n°3D ; Arents et al., 1991). Le motif "histone fold" est également retrouvé dans de nombreuses protéines pouvant interagir avec la chromatine comme le complexe de remodelage ATP-dépendant CHRAC (CHROMatin Accessibility Complex) (Corona et al., 2000). Les queues amino-terminales des histones de cœur sont très variables, contrairement au domaine central et sont le site de nombreuses modifications post-traductionnelles pouvant altérer l'accessibilité à l'ADN mais aussi les interactions inter- et intra- nucléosomales (Strahl and Allis, 2000).

En absence de l'ADN et à force saline modérée (150 mM NaCl), les histones H3 et H4 s'associent en tétramère alors qu'H2A et H2B restent sous forme de dimère (Lusser and Kadonaga, 2004). A force saline élevée (2 M NaCl), l'octamère d'histones se reconstitue naturellement *in vitro* (Lusser and Kadonaga, 2004). H3 joue un rôle pivot dans la structuration générale du nucléosome car un axe de symétrie traverse le nucléosome au niveau de l'interface entre les deux molécules d'H3 (Luger et al., 1997).

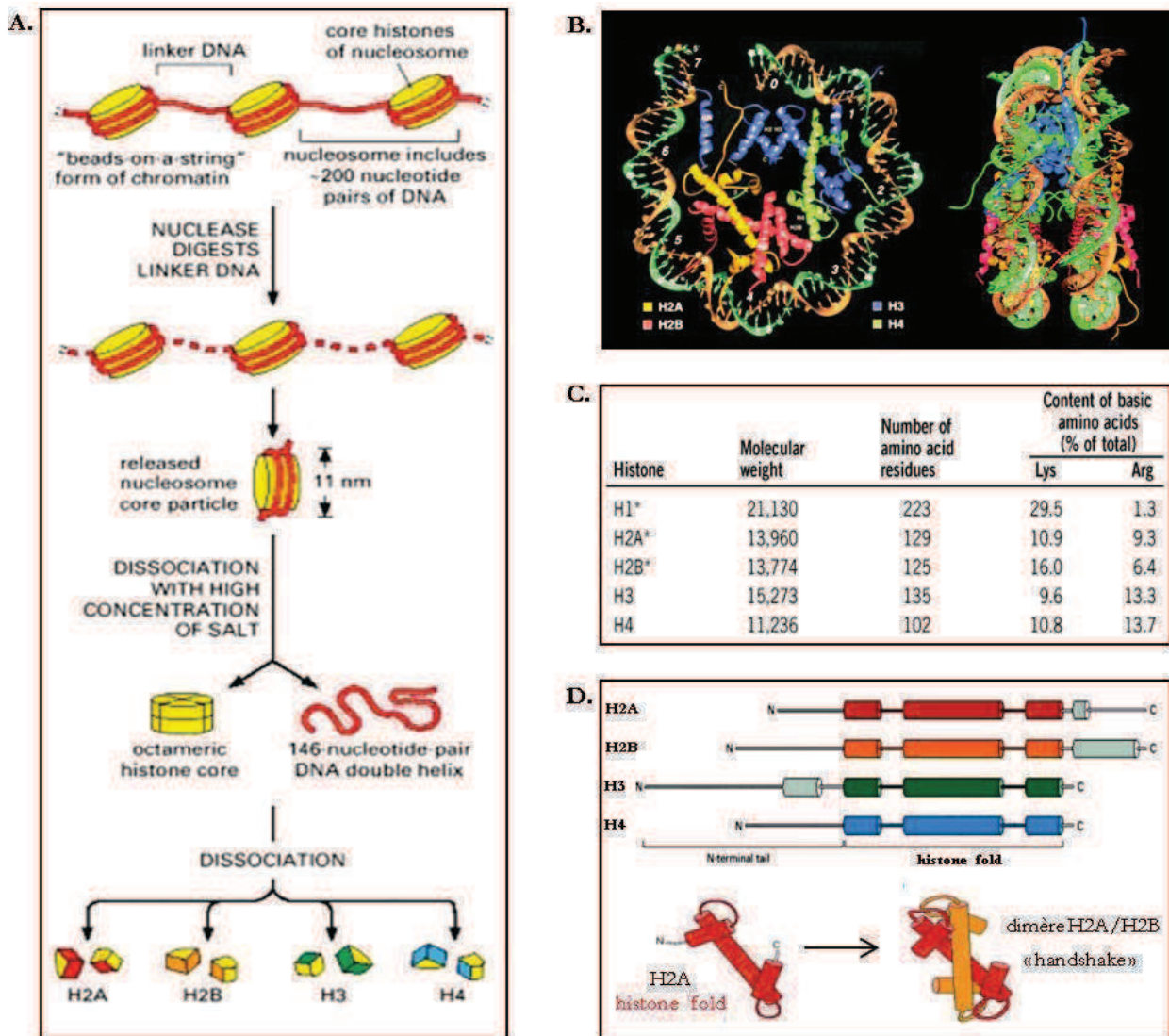


Figure n°3 : Caractérisation du nucléosome. (A) Identification schématique de la particule nucléosomale par des approches biochimiques. La chromatine, en collier de perles, digérée par la nucléase au niveau des régions de l'ADN de liaison, libère la particule nucléosomale de cœur. Le nucléosome soumis à de forte concentration en sels se dissocie et libère l'ADN et les histones de cœur (livre Molecular Biology of the Cell). (B) Structure de la particule nucléosomale de cœur déterminée par cristallographie aux rayons X à une résolution de 2,7 Angstrom (Luger et al., 1997). (C) Caractéristiques biochimiques des histones. Composition et poids moléculaire des histones canoniques H1, H4, H3, H2A et H2B. (D) Les histones possèdent dans leur domaine central un motif très conservé en hélices alpha, l'"histone-fold". Les cylindres représentent des hélices alpha. Les interactions des dimères d'histones se font en "poignée de main" via le motif "histone fold" (livre Molecular Biology of the Cell).

- Les histones de liaison

L'histone de liaison, nommé H1 s'associe avec la région d'ADN de liaison entre deux nucléosomes, au niveau des points d'entrée et de sortie de l'ADN sur le nucléosome (voir figure n°4B). H1 avec la particule de cœur du nucléosome constitue le "chromatosome". H1 est composé de 3 domaines : un domaine central globulaire, essentiel pour l'interaction avec l'ADN et deux queues amino- et carboxy- terminales non structurées soumises à plusieurs modifications post-traductionnelles (voir figure n°4A ; Godde and Ura, 2008). La structure du domaine central globulaire a été déterminée pour la première fois en 1987 pour le variant H5 d'érythrocytes de poulet (Cloure et al., 1987). Les histones H1 peuvent moduler l'interaction des nucléosomes adjacents et ainsi jouer sur la compaction de la chromatine (voir figures n°4C et 4D). Cependant leur rôle précis est toujours un sujet de controverse (Godde and Ura, 2008).

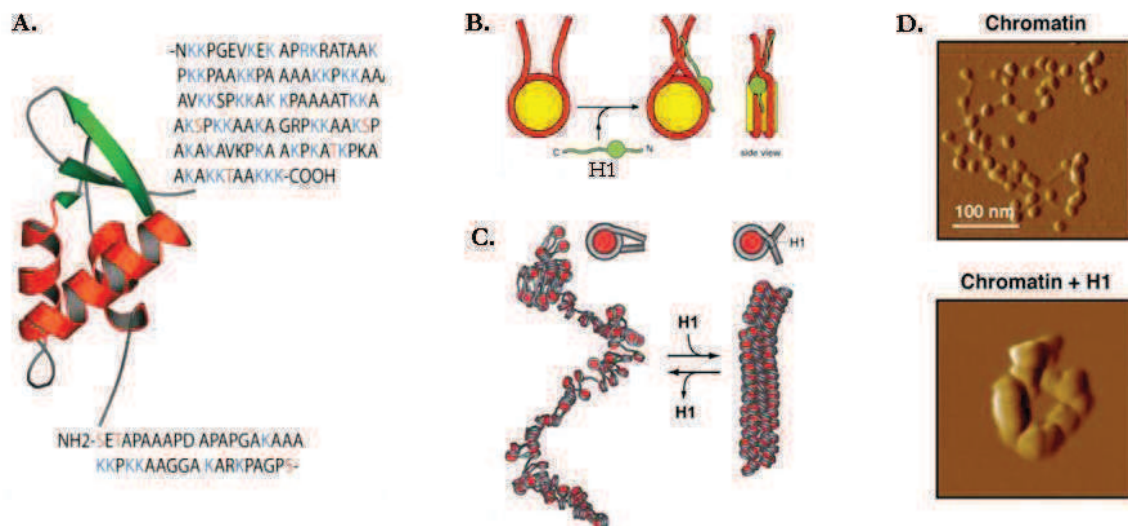


Figure n°4 : Structure et assemblage de l'histone de liaison H1 (A) Structure de H1 avec son domaine central globulaire et ses extrémités terminales non structurées (Khorasanizadeh et al., 2004) (B) Assemblage de H1 au niveau de la région d'ADN de liaison du nucléosome et formation du chromatosome (= nucléosome + H1 ; d'après le livre Molecular Biology of the Cell). (C) Compaction de la chromatine par H1 (Kepper et al., 2008). (D) Chromatine visualisée en microscopie à force atomique (AFM). Sans H1 la chromatine est organisée en "collier de perles". L'ajout de H1 provoque la compaction de la chromatine (images personnelles du Dr. David Wacker).

1.3. Organisation fonctionnelle de la chromatine

- Les niveaux d'organisation de la chromatine

Dans une cellule, environ deux mètres d'ADN doivent être compactés pour tenir au sein d'un noyau de quelques microns, parfois très petit comme le noyau du spermatozoïde (voir figure n°5A). Malgré ce degré de compaction extrême, l'ADN doit être rapidement accessible pour réguler son métabolisme lors des événements de transcription, réplication, réparation, recombinaison et division. La dynamique d'organisation de la chromatine peut réguler potentiellement toutes les fonctions du génome.

Le nucléosome constitue un premier niveau de structuration de la chromatine. Les nucléosomes avec les 20 à 60 paires de bases d'ADN de liaison, peuvent former, à faible force saline, une fibre de 11 nm en "collier de perles". Si l'on ajoute l'histone de liaison H1 ou des ions Mg^{2+} , cette structure en "collier de perles" s'enroule pour former une fibre avec une structure hélicoïdale d'un diamètre de 30 nm (Robinson and Rhodes, 2006).

L'organisation de la fibre de 30 nm au sein du noyau n'est pas connue en détail et reste toujours l'objet de débats. A l'heure actuelle il existe deux modèles : les oligosomes pourraient s'arranger en hélice à un brin (modèle du solénoïde) ou en hélice à deux brins (modèle du zigzag). Mais ces deux structures pourraient bien coexister dans le noyau et correspondre à différents états fonctionnels de la chromatine (voir figure n°5B).

Les niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine sont peu connus. La fibre de 30 nm pourrait s'arranger ensuite sous forme de boucles le long d'une matrice protéique centrale appelée matrice nucléaire ou "nuclear scaffold" (voir figure n°5C). Enfin, le chromosome mitotique représente le niveau de compaction maximale de la chromatine organisée sous forme nucléosomale (voir figure n°5D).

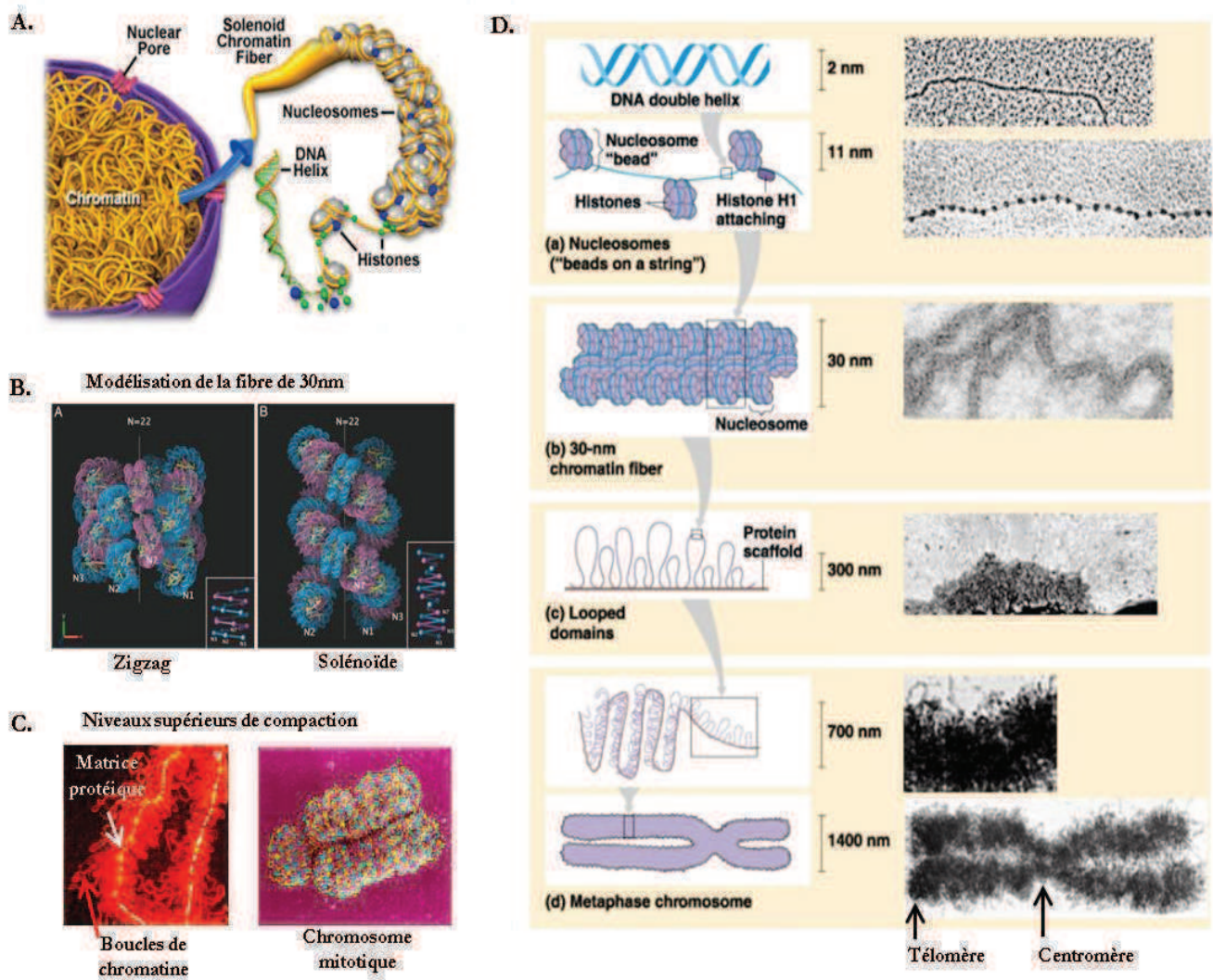


Figure n°5 : Niveaux d'organisation de la chromatine. (A) Organisation fonctionnelle de la chromatine. L'ADN est organisé sous forme d'un complexe nucléoprotéique qui permet sa compaction au sein du noyau (www.micro.magnet.fsu.edu). (B) Les deux modèles d'organisation de la fibre de 30 nm : le Zigzag et le Solénoïde (Robinson et al., 2006) (C) Niveaux supérieurs de compaction de la chromatine. La chromatine est organisée en boucles autour d'une matrice protéique dans l'ovocyte de Xénope. Chromosome mitotique acrocentrique de souris visualisé par microscopie électronique à balayage (Gall and Murphy, 1998). (D) De l'ADN au chromosome mitotique. Les différents niveaux de compaction de la chromatine. Schémas et microscopie électronique (Pearson Education).

- La compartimentalisation fonctionnelle de la chromatine

Historiquement, sur la base des observations au microscope électronique, la chromatine fut divisée en deux domaines distincts, l'hétérochromatine et l'euchromatine (voir figure n°6A). "L'hétérochromatine se définit comme une structure dense qui n'altère

pas son état de condensation au cours du cycle cellulaire alors que l'euchromatine est une structure claire et décondensée au cours de l'interphase" (Heitz et al., 1928). Par la suite, l'euchromatine a été décrite comme associée à une transcription active des gènes, alors que la transcription est majoritairement réprimée au sein de l'hétérochromatine.

Au sein d'une cellule en interphase, l'hétérochromatine se localise principalement à la périphérie du noyau et au nucléole. On distingue deux sous-catégories d'hétérochromatine : l'hétérochromatine constitutive ou l'hétérochromatine facultative. L'hétérochromatine constitutive, qui contient peu de gènes, est formée principalement de séquences répétées situées à proximité des centromères et des télomères. L'hétérochromatine facultative contient des régions codantes qui, bien qu'elles adoptent les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine constitutive, peuvent se décompacter sous certaines conditions et permettre ainsi la transcription de gènes normalement réprimés. L'exemple le plus remarquable est l'inactivation d'un des chromosomes X chez les femelles mammifères. Ce chromosome, lorsqu'il est compacté sous forme d'hétérochromatine facultative, est réprimé transcriptionnellement et forme le corpuscule de Barr (voir figure n°6B).

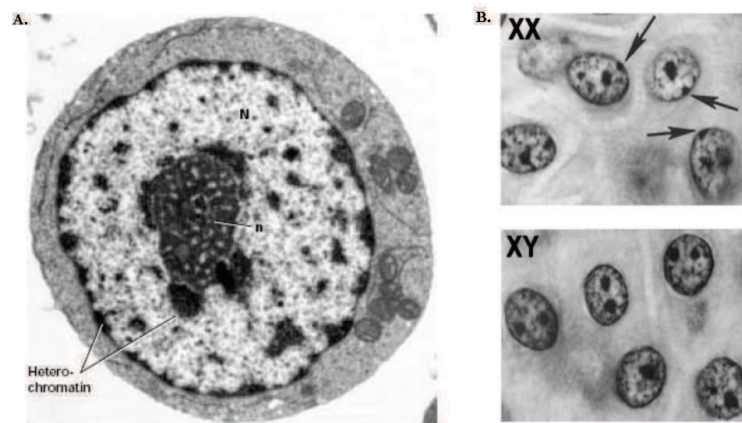


Figure n°6 : Compartimentalisation de la chromatine. (A) Lymphocyte faisant apparaître, en microscopie électronique, des domaines denses correspondant à l'hétérochromatine et des domaines clairs correspondant à l'euchromatine (www.netterimages.com) (B) Chez la femelle (XX), le X inactif s'inclus dans une masse dense d'hétérochromatine, le corpuscule de Barr (www.sciencephoto.com).

2. Dynamique et plasticité de la chromatine

La chromatine est une structure dynamique. Son remodelage lui confère de nouvelles propriétés structurales et fonctionnelles permettant le déroulement d'activités nucléaires comme la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. Plusieurs mécanismes principaux assurent cette plasticité de la chromatine comme la modification de l'ADN par

méthylation, l'incorporation de variants d'histone et la mobilisation des nucléosomes par les complexes de remodelage ainsi que la modification post-traductionnelle des histones (voir figure n°7).



Figure n°7 : Dynamique et plasticité de la chromatine. Les différents acteurs (non exclusif) du remodelage de la chromatine (d'après Jin et al., 2005).

2.1. Incorporation de variants d'histones

Chaque histone canonique peut exister sous forme de variants avec des degrés variables d'identité de séquences variables. Ces variations de séquences peuvent modifier les interactions intra- ou inter- nucléosomales et changer le répertoire de modifications post-traductionnelles des nucléosomes contenant ces variants. Le nucléosome variant peut posséder des propriétés structurales et fonctionnelles distinctes de celles du nucléosome conventionnel, canonique.

Certains variants peuvent être exprimés, soit dans tous les types cellulaires, ils sont alors dits ubiquitaires, soit posséder une expression restreinte à un tissu (tissu-spécifique) ou à certaines étapes du développement (voir figure n°8). L'expression des variants d'histones peut aussi être indépendante ou couplée à la réplication de l'ADN. Les gènes codant pour les histones canoniques sont généralement présents en multiples copies dans le génome et sont organisés en clusters. Par exemple, chez l'homme, il existe trois clusters sur les chromosomes 1 et 6 (Marzluff et al., 2002). Les histones canoniques présentent des caractéristiques atypiques pour des gènes eucaryotes, comme l'absence d'introns et une terminaison de la transcription signalée par une structure de type tige-boucle au lieu d'un signal de poly-adénylation. Les gènes codants pour les variants d'histones sont présents en une ou deux copies et sont dispersés dans tout le génome. Ils peuvent posséder un ou plusieurs introns ainsi qu'un signal de poly-adénylation. On connaît à l'heure actuelle une vingtaine de variants des histones H1, H2A, H2B et H3 mais pas de H4. On dénombre par exemple 10 formes de H1 : H1.1 à H1.5, H1°, H1T, H1T2, H1LS, H1oo (voir figure n°8)

Histones	Variants ubiquitaires	Variants spécifiques des cellules germinales mâles
H1	H1.1 à H1.5, H1°	H1t, H1T2, H1LS
H2A	H2A.X H2A.Z, MacroH2A	tH2A, H2ABbd, H2AL1, H2AL2, H2AL3
H2B	Pas de variants	tH2B, subH2Bv, H2BL1, H2BL2
H3	H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A	tH3
H4	Pas de variants	Pas de variants

Figure n°8 : Classification des variants en fonction de leur distribution tissulaire chez la souris.

2.2. Assemblage et désassemblage de la chromatine

- Les chaperonnes d'histones

Au cours du cycle cellulaire les histones ne sont pas continuellement associées avec l'ADN. Par exemple, au cours de la réplication, les histones néosynthétisées doivent être transportées dans le noyau puis incorporées à un endroit spécifique, alors que d'autres histones doivent être enlevées. Le devenir de ces histones enlevées reste d'ailleurs un mystère. Sont-elles dégradées, recyclées, stockées ?

Les histones sont des protéines extrêmement basiques, leur présence dans la cellule peut être toxique à cause des interactions intempestives et de la formation d'agrégats. Ainsi, la plupart du temps, quand les histones ne sont pas en complexe avec l'ADN, elles sont associées à des protéines spécialisées appelées chaperonnes d'histones. Ces protéines escortes sont essentielles au métabolisme des histones. Elles régulent le stock d'histones, participent à leur incorporation ou à leur éviction à des endroits précis dans la chromatine. De nombreux processus cellulaires nécessitent une éviction et un remplacement dynamique des histones. Aussi, les chaperonnes d'histones possèdent une activité cruciale dans les processus fondamentaux tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (voir figure n°9). Les chaperonnes peuvent fonctionner seules ou en complexe avec d'autres chaperonnes ou des enzymes de modifications.

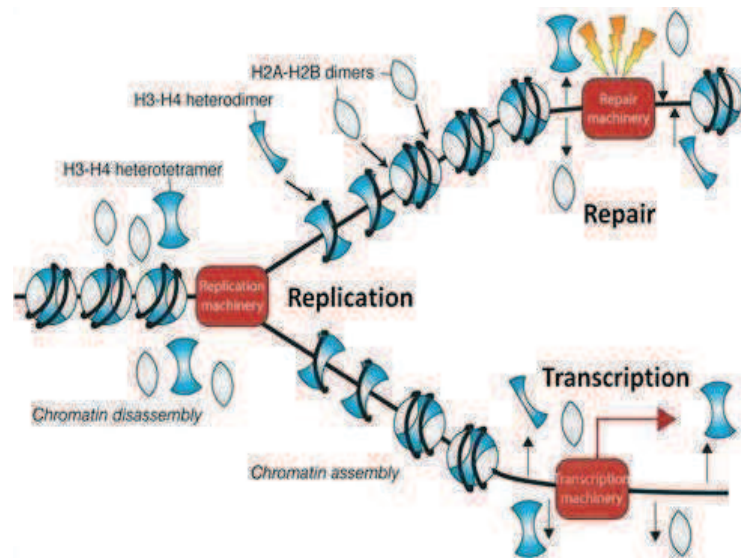


Figure n°9 : Fonctions cellulaires des chaperonnes d’histones. Les chaperonnes d’histones participent à l’incorporation et à l’enlèvement des histones lors du métabolisme de l’ADN (réplication, réparation et transcription) (De Koning et al., 2007).

Prévention de l’agrégation des histones

L’ovocyte de Xénope contient assez d’histones pour structurer le génome de 20 000 cellules somatiques (Woodland and Adamson, 1977). Le risque d’agrégation des histones entre elles y est donc particulièrement élevé. Ce stock d’histones attend d’être incorporé à la chromatine paternelle et à l’ensemble de la chromatine lors des premières divisions embryonnaires. Ces histones sont stockées grâce à des chaperonnes comme la nucléoplasmine Npm2 qui prend en charge les dimères H2A/H2B avant leur incorporation au pronoyau mâle et aux premières cellules de l’embryon (Krogan et al., 2003). Npm2 joue également un rôle crucial pour le stockage des histones dans les ovocytes de souris. En effet, les souris femelles invalidées pour ce gène sont stériles (Burns et al., 2003).

Incorporation et enlèvement des histones

Un ensemble d’approches *in vitro* et *in vivo* ont permis d’établir un premier modèle pour l’assemblage des nucléosomes par les chaperonnes lors de la réplication (Mizuguchi et al., 2004). La formation de la particule nucléosomale peut être subdivisée en deux étapes. Dans une première étape, les histones H3 et H4 associées en tétramère sont déposées sur l’ADN pour former un tétrasome. Deux chaperonnes d’histones participent à cette étape, le complexe CAF-1 (Chromatine Assembly Factor 1) et la protéine Asf1 (Anti-Silencing Factor1) (Okada et al., 2009 ; Alekseev et al., 2005). Dans une deuxième étape, les dimères d’histones (H2A/H2B) sont déposés sur l’ADN par la chaperonne NAP-1 (Nucleosome Assembly Protein 1) (Richardson et al., 2000a ; Batova et al., 2000). Enfin les complexes de

remodelage de la chromatine positionnent correctement les nucléosomes. D'autres chaperonnes d'histones peuvent intervenir dans des processus indépendants de la réplication (Rhodes et al., 2006). Par exemple, le complexe FACT chaperonne les histones H2A/H2B (Berghoff et al., 2006) lors de la transcription. En effet, FACT participerait à l'éviction des histones avant le passage de l'ARN polymérase (Plotnikoff et al., 2007) puis à la reconstitution des nucléosomes après le passage du complexe transcriptionnel (Capozzi et al., 2006). Les chaperonnes d'histones NAP1 et nucleoplasmine sont capables d'enlever les dimères H2A/H2B afin de faciliter la liaison de facteurs de transcription sur l'ADN.

Spécificité des chaperonnes

Comme l'illustre le mécanisme d'assemblage des nucléosomes lors de la réplication, certaines chaperonnes d'histones interagissent préférentiellement avec les histones (H3/H4), d'autres avec (H2A/H2B). En plus de cette spécificité, les chaperonnes d'histones sont également capables de reconnaître spécifiquement différents variants d'histones. Cette discrimination pourrait expliquer l'assemblage de variants d'histones sur l'ADN dans des contextes spécifiques. Par exemple, la chaperonne d'histone Chz1 interagit spécifiquement avec le variant d'histone Htz1 (homologue H2AZ chez la levure (Krogan et al., 2003)). Ce variant est retrouvé dans les nucléosomes au sein des promoteurs et il est enlevé lors de l'élongation de la transcription. De façon similaire, les chaperonnes d'histones CAF-1 et HIRA interagissent, pour leur part, de façon spécifique respectivement avec les variants d'histones H3.1 et H3.3. Ainsi, le variant H3.3 est déposé sur l'ADN indépendamment de la réplication alors que le variant d'histone H3.1 est assemblé en nucléosome lors de la réplication (Tagami et al., 2004 ; Loppin et al., 2005).

Plusieurs mécanismes permettent de cibler les chaperonnes d'histones sur les sites d'initiation de la transcription où elles peuvent enlever ou incorporer des histones. L'interaction avec la machinerie de remodelage de la chromatine permet de recruter directement les chaperonnes d'histones sur leur lieu d'action comme cela a été montré pour FACT qui se lie au complexe de remodelage CHD1 (Okada et al., 2009). De la même façon la chaperonne Asf1 permet l'enlèvement des histones spécifiquement acétylées grâce à sa coopération avec la protéine à bromodomaine TAF250 (Akai et al., 2010).

Les chaperonnes du testicule

Très peu de données sont disponibles sur les chaperonnes exprimées dans les cellules germinales mâles. Seule la chaperonne tNASP, l'isoforme testiculaire de NASP (Richardson et al., 2000b), est connue pour être impliquée dans le dépôt du variant d'histone de liaison testiculaire H1t pendant la spermatogénèse (Alekseev et al., 2005). La chaperonne de la famille des NAP, NAP1L4, est fortement exprimée dans le testicule et elle interagit *in vitro*, préférentiellement avec le variant d'histone H3t par rapport à l'histone canonique H3 (Tachiwana et al., 2008).

- Les complexes de remodelage ATP-dépendants

Les facteurs de remodelage de la chromatine sont des complexes multi-protéiques qui effectuent différents types de remaniement des nucléosomes tels que le changement de position des nucléosomes sur l'ADN, l'échange des histones ou l'éviction totale ou partielle des histones (voir figure n°10A). Par exemple, les complexes de la famille ISWI et SWI/SNF catalysent le glissement de l'ADN sur l'octamère d'histone et permettent la mobilisation du nucléosome. Ces remaniements de nucléosomes nécessitent la dissociation totale ou partielle des contacts ADN/histones pour permettre le repositionnement de l'ADN sur l'octamère d'histone. L'énergie nécessaire pour casser ces interactions est fournie par la sous-unité catalytique ATPase de ces facteurs de remodelage de la chromatine (voir figure n°10B). En régulant l'architecture de la chromatine, ces complexes multi-protéiques contrôlent l'accessibilité à l'ADN et interviennent dans de multiples processus nucléaires tels que la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN.

Les complexes de remodelage de la chromatine peuvent être classés en fonction des similarités de leur sous-unité catalytique et des motifs protéiques conservés qu'elles possèdent :

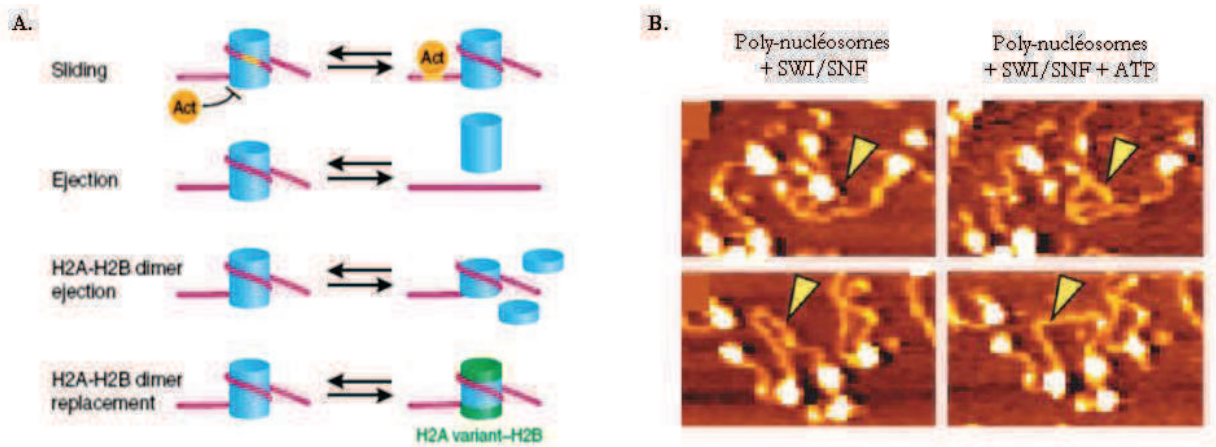
- la famille d'ATPase SWI/SNF (mating-type switching/sucrose non-fermenting) contient un domaine BROMO qui se lie aux des lysines acétylées,
- la famille d'ATPase ISWI (imitation of switch) possède des domaines SANT et SLIDE qui se lient respectivement aux queues d'histones et à l'ADN,
- la famille d'ATPase CHD (chromodomain) contient un domaine CHROMO qui peut lier les lysines méthylées,
- les familles INO80 (INOsito) et SWR (SWI/SNF related ATPase).

Le complexe SWI/SNF, avec sa taille d'environ 2000 kDa, est conservé de la levure à l'homme. Il est recruté sur la chromatine acétylée grâce au bromodomaine de sa sous-unité ATPase (Hassan et al., 2002). Il pourrait permettre l'expression d'environ 6% des gènes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Holstege et al., 1998). Les complexes de remodelage Mi2/NURD, appartenant à la famille CHD, assurent la déacétylation des histones par les HDACs et sont généralement associés à une répression de la transcription (Kehle et al., 1998).

Le complexe ISWI est important pour l'assemblage de la chromatine lors de la réplication. ISWI est ciblé sur la fourche de réplication via son interaction avec PCNA (Poot et al., 2004). Le complexe INO80, composé de 12 sous-unités, intervient par exemple lors de la réparation de l'ADN. Il se fixe directement aux histones H2AX phosphorylés aux abords des cassures double-brins de l'ADN et participe à l'éviction des histones de cœur et des variants sur environ 5000 paires de bases autour de la lésion (van Attikum et al, 2004 ; Tsukuda et al., 2005).

Le complexe SWR catalyse l'incorporation du variant H2AZ, particulièrement enrichi au niveau des promoteurs (Mizuguchi et al., 2004). Une des sous-unités du complexe SWR, Bdf1, pourrait participer à l'incorporation de H2AZ en ciblant les histones acétylées via ses bromodomains (Matangasombut and Buratowski, 2003). D'ailleurs, la délétion de Bdf1

associée aux mutations ponctuelles des lysines de H3 et H4, entraîne une diminution de la quantité de H2AZ sur les promoteurs (Zhang et al., 2005).



2.3. Dynamique des modifications post traductionnelles des histones (MPTh)

- Une multitude de MPTh

Les histones portent de nombreux sites de modifications post-traductionnelles notamment sur leurs queues amino-terminales non structurées. Celles-ci participent à la régulation de la compaction et de l'accessibilité de la chromatine. Elles assurent également le recrutement sur la chromatine de protéines effectrices spécifiques de façon spatio-temporelle précise (voir figure n°11). Il a été proposé que les modifications post-traductionnelles des histones (MPTh) forment un «code» déchiffré par des domaines protéiques spécifiques qui pourrait définir un état chromatinien particulier et permettrait de réguler un gène ou un locus (Strahl and Allis, 2000). Ces modifications covalentes ciblées sur des résidus spécifiques pour chaque histone sont catalysées, généralement de manière réversible, par des enzymes également spécifiques (voir figure n°11).

Les MPTh les plus étudiées à ce jour sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination, mais d'autres modifications ont également été décrites telles que l'ADP-

ribosylation, la sumoylation, la glycosylation, la biotinylation, la citrullination (voir figure n°12A). De plus, le nombre de modifications identifiées continue de s'accroître, grâce notamment à l'application de nouvelles approches technologiques en spectrométrie de masse. Cependant, peu d'études ont analysé la dynamique spatiotemporelle et le rôle physiologique de ces modifications dans des processus de différenciation tels que la spermatogenèse et leur lien avec la recombinaison méiotique, la synapsis, le comportement des chromosomes sexuels et le remodelage post-méiotique de la chromatine.

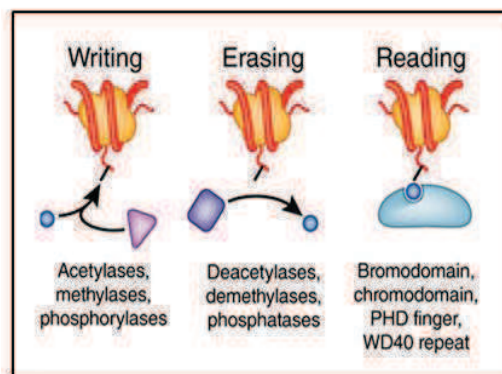
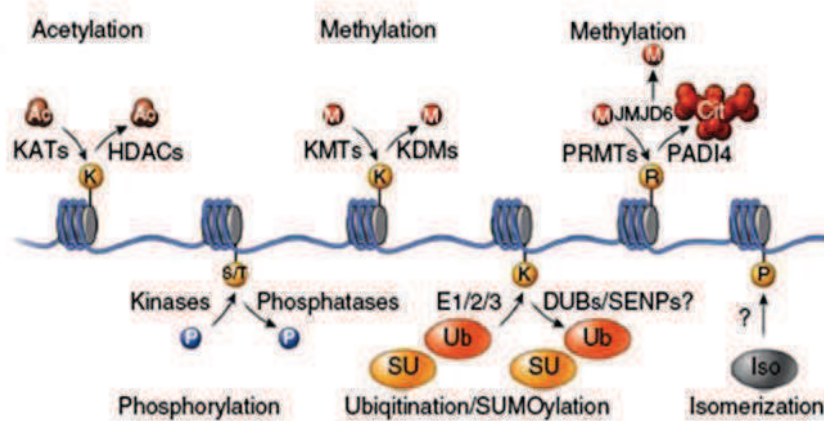


Figure n°11 : Les principales MPTh et leur régulation. Les MPTh résultent d'un équilibre de deux activités enzymatiques contraires. L'acétylation (Ac) des Lysines (K) est catalysée par les HAT et la réaction inverse de déacétylation par les HDAC. La méthylation des lysines est catalysée par les KMT et la déméthylation par les KDM. La méthylation des arginines est catalysée par les PRMT. La phosphorylation des sérines ou des thréonines est catalysée par les kinases et la déphosphorylation par les phosphatases. L'ubiquitination est catalysée par plusieurs enzymes E1, E2, E3 (d'après Latham and Dent, 2007)

- Dynamique des MPTh

L'acétylation

Toutes les histones sont susceptibles d'être acétylées sur des résidus lysines spécifiques. L'acétylation est régulée par l'équilibre qui existe entre l'acétylation et la désacétylation, catalysées respectivement par les lysines acétyltransférases (KATs) à partir de l'acétyl-coenzymeA et les lysines désacétylases (HDACs). Les KATs peuvent être divisées en trois familles (GNAT, MYST et CBP/P300) selon leur identité de séquence (Sternier and Berger, 2000). Les HDACs sont subdivisées en trois classes (I, II et III) en fonction de leur homologie de structure avec les déacétylases de levure (Thiagalingam et al., 2003).

Au niveau biochimique et biophysique, la neutralisation de la charge positive de la lysine peut mener à la diminution des contacts avec l'ADN chargé négativement au sein d'un nucléosome. Ces changements donnent naissance à une chromatine plus flexible, où l'ADN est plus accessible et permet l'activation de fonctions physiologiques tel que le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Eberharter and Becker, 2002). Au niveau cellulaire l'euchromatine apparaît plus acétylée que l'hétérochromatine complètement déacétylée.

L'acétylation de certains acides aminés peut avoir un effet drastique sur la structure de la fibre de chromatine et la stabilité des nucléosomes. Par exemple, l'acétylation de la queue amino-terminale de H4 sur la lysine 16 peut induire une modification de la structure d'ordre supérieur de la chromatine en empêchant la formation de la fibre de 30 nm (Shogren-Knaak et al., 2006). L'acétylation de l'histone H3 sur la lysine 56, localisée dans le domaine de cœur, affaiblit l'interaction H3-ADN au sein du nucléosome et favorise la dissociation du nucléosome. Avant d'être incorporées à la chromatine, les histones néosynthétisées lors de la réplication sont acétylées sur H4K5 et H4K12 par HAT1 (Reinberg et al., 2010).

La méthylation

La méthylation peut survenir sur les lysines qui peuvent être mono-, di- ou tri- méthylées, ou sur les arginines qui peuvent être mono- et di- méthylées de manière symétrique ou asymétrique. La méthylation des histones est réalisée par les méthyltransférases classées en fonction de l'acide aminé modifié. On distingue les lysines méthyltransférases (KMTs) qui méthylent les lysines et les protéines arginines méthyltransférases (PRMTs) qui méthylent les arginines. Le domaine catalytique majeur de la méthylation est le domaine SET. La spécificité de l'action des méthyltransférases, ainsi que le nombre de méthyles ajoutés dépend de la nature de chaque enzyme et de ses cofacteurs.

Trois lysines, en particulier, sont associées à une activation de la transcription lorsqu'elles sont méthylées : H3K4, H3K36 et H3K79. Inversement, la méthylation de H3K9, H3K27 et H4K20 est fréquemment associée à une répression de la transcription. La di- et tri-méthylation de H3K9 en particulier, est une marque typique de l'hétérochromatine, qui est directement reconnue par la protéine HP1 (Nielsen et al., 2001). Inversement la di- et tri-

méthylation de la lysine 4 de H3 est associée à l'euchromatine et à la transcription (voir figure n°12B).

La phosphorylation

La phosphorylation des résidus sérine, thréonine ou tyrosine est un mécanisme de régulation majeur de la vie de la cellule. La phosphorylation de H3S10 et H3S28 est impliquée dans la condensation des chromosomes au début de la mitose. La phosphorylation de ces sérines est médiée par les kinases mitotiques Aurora (Hans and Dimitrov, 2001).

La phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX est associée à la réparation des cassures double-brins de l'ADN chez les mammifères (Rogakou et al., 1998). Dans les cellules somatiques, ce résidu peut être phosphorylé par les kinases de la famille des PI3 kinases ATM, DNA-PK et ATR (Stiff et al., 2004).

L'ubiquitination

L'ubiquitine est une protéine acide globulaire de 8,6 kDa hautement conservée chez les eucaryotes. L'ubiquitination est l'addition d'une ou plusieurs ubiquitines sur les lysines. L'ajout de plusieurs copies d'ubiquitine sur une protéine engendre généralement son hydrolyse par le protéasome. En revanche, la mono-ubiquitination de la partie carboxy-terminale des histones ne conduit pas forcément à leur dégradation. Cette modification sur les histones exercerait une fonction dans la spermatogenèse, dans la réponse au stress, ainsi que dans la formation de l'hétérochromatine et la régulation de la transcription. Par exemple, la mono-ubiquitination de H2B sur K120 est associée à l'activation et l'élongation de la transcription (Pavri et al., 2006) et à l'inverse, la mono-ubiquitination de H2A sur K119 est impliquée dans le maintien de la répression transcriptionnelle imposée par le complexe Polycomb (Wang et al., 2004).

L'ADPriboseylation

La poly(ADPribose)ylation est la fixation d'un polymère d'(ADPribose), plus ou moins long et éventuellement branché, à une protéine. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille poly(ADPribose) polymérase (PARP), ubiquitaire chez les eucaryotes ; la réaction inverse par l'enzyme poly(ADPribose) glycohydrolase (PARG). La famille des PARP compte 17 membres qui catalysent le transfert séquentiel d'ADP-ribose sur des acides glutamiques ou acides asparagiques, en utilisant le NAD⁺ comme cofacteur (Schreiber et al., 2006). Toutes les histones sont susceptibles d'être ADPribosylées, et cette modification pourrait altérer l'organisation du nucléosome. La poly(ADP-ribos)ylation est impliquée à la fois dans la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN (d'Amours et al., 1999).

L'hypothèse du code histone proposé par Strahl et Allis stipule que le métabolisme de l'ADN (réplication, réparation, transcription..) est régulé en partie par les modifications chimiques des protéines histones. La multitude de possibilités données par ce code permet de multiples interprétations de l'information génétique contenue dans l'ADN (Strahl and Allis, 2000). De nombreuses modifications d'histones sont corrélées à la structure de la chromatine et au niveau d'expression des gènes (voir figure n°12B). Ces modifications peuvent aussi dialoguer entre elles. Par exemple, l'acétylation de H3K14 inhibe la phosphorylation de H3S10 (Demidov et al., 2009). Elles peuvent également recruter des protéines via des domaines de reconnaissance spécifiques. Par exemple lors de la mitose, la phosphorylation massive de H3S10 empêche la protéine HP1 de se fixer à H3K9me3 (Fischle et al., 2005). D'autre part, l'ubiquitination de H2BK123 est essentielle pour permettre la méthylation de H3K79 et la formation d'hétérochromatine (Jia et al., 2005).

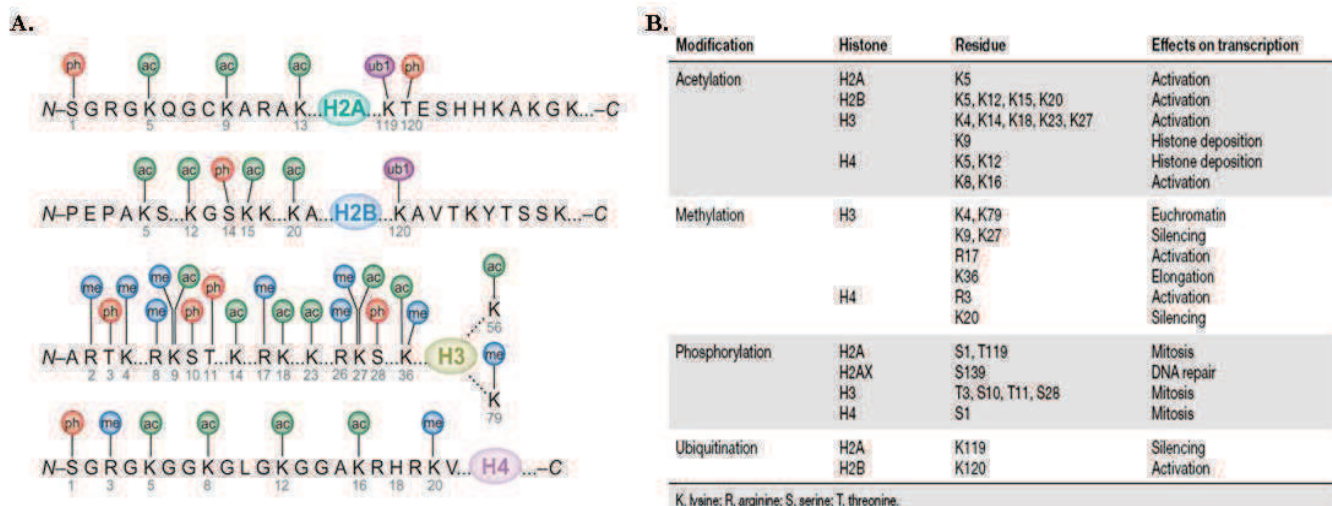


Figure n°12 : Les principales MPTh et leurs fonctions associées. (A) Les principales modifications post-traductionnelles des histones identifiées à ce jour chez l'homme. Liste disponible sur www.abcam.com (B) Les effets des MPTh sur le métabolisme de l'ADN (www.medscape.com).

2.4. Effecteurs du code histone

- Les modules de liaison aux MPTh

La fonction principale des MTPH réside probablement dans le recrutement de complexes protéiques effecteurs spécifiques à un endroit et à un moment défini. Ces protéines effectrices peuvent altérer la structure de la chromatine et permettre par exemple le

recrutement de la polymérase, de complexes de remodelage, d'enzymes de modification (Taverna et al., 2007). Les domaines effecteurs sont capables de reconnaître un ou plusieurs résidus, modifiés ou non (voir figure n°13A et 13C). Par exemple, le domaine ADD riche en cystéine de Dnmt3L reconnaît H3K4 non méthylée ($K_d = 2.1 \mu M$). Cette affinité diminue d'environ 20 fois quand le résidu devient mono-méthylé ($K_d = 36 \mu M$) et n'est plus mesurable quand le résidu est di- et tri- méthylé. Ainsi, l'absence de la marque activatrice H3K4 méthylée pourrait faciliter le recrutement de Dnmt3L et de son partenaire catalytique Dnmt3a pour méthyliser l'ADN (Taverna et al., 2007).

A l'heure actuelle, les domaines les mieux caractérisés sont les chromodomains et les bromodomains qui fixent respectivement les marques de méthylation et d'acétylation (voir figure n°13B).

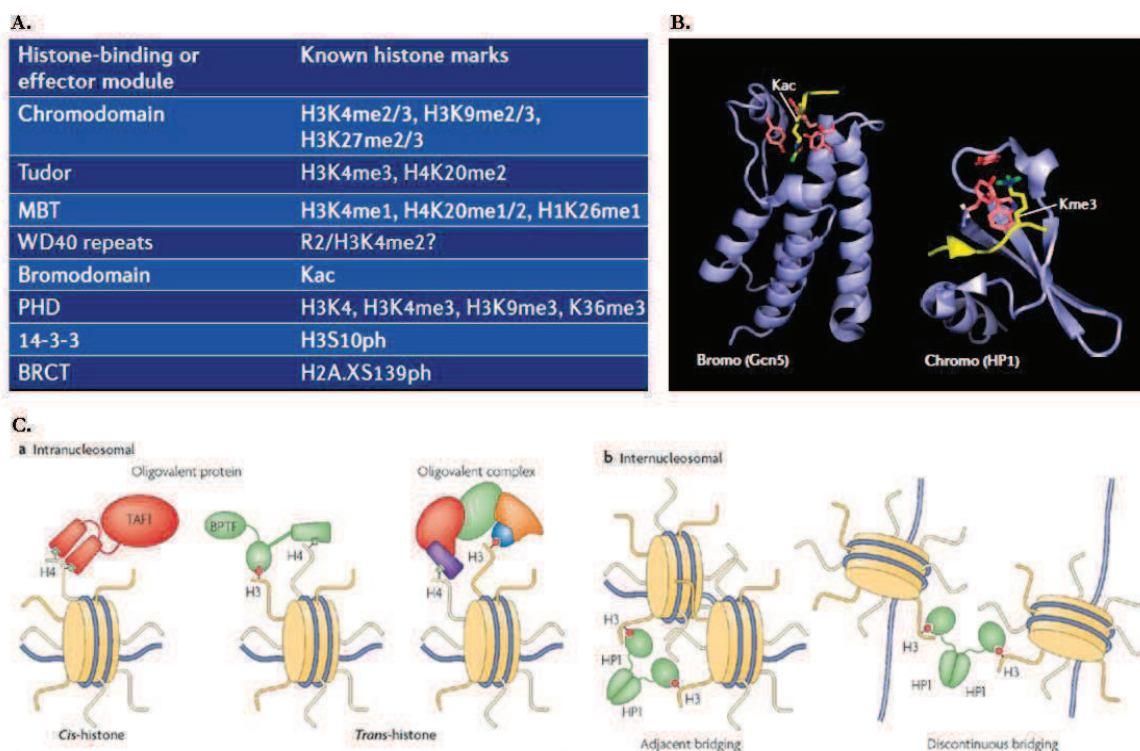


Figure n°13 : Les lecteurs du code histone. (Taverna et al., 2007) (A) Les différents modules de liaison au MPTh et leurs affinités respectives. (B) Structure du bromodomaine de Gcn5 et du chromodomaine de HP1. Les bromodomains reconnaissent des marques d'acétylation et les chromodomains des marques de méthylation. (C) Liaison intra- ou inter- nucléosomale de lecteurs du code histone. Par exemple, HP1 peut reconnaître les marques H3K9me3 sur deux nucléosomes voisins et permettre leur rapprochement pour compacter la chromatine.

Le bromodomaine est un motif très conservé, retrouvé dans de nombreuses protéines associées à la chromatine, facteurs de transcription et la majorité des acétyltransférases (Yang et al., 2004). Le premier bromodomaine caractérisé est celui du coactivateur transcriptionnel PCAF (P300/CBP-associated factor ; l'homologue de Gcn5p

chez *Saccharomyces cerevisiae*). Le bromodomaine est un module de 110 acides-aminés environ. Il est constitué par l'empilement de 4 hélices en un tonneau qui présente à une de ses extrémités les parties N et C terminales de la chaîne peptidique et à l'autre extrémité les boucles ZA et BC (Jeanmougin et al., 1997). Ce repliement fait du bromodomaine un module indépendant et permet l'existence de séries de bromodomains placés les uns à côté des autres. Ils sont capables de discriminer un site d'acétylation grâce aux résidus adjacents à l'acétyl-lysine. L'adaptation de chaque bromodomaine à son ligand se fait grâce aux boucles ZA et BC composées de séquences variables qui reconnaissent une séquence peptidique acétylée (voir figure n°14 ; Mujtaba et al., 2007 ; Zeng and Zhou, 2002). Les affinités mesurées jusqu'ici entre les bromodomains et les sites reconnus sont relativement faibles comparées à une affinité de type anticorps-antigène ou même enzyme-substrat.

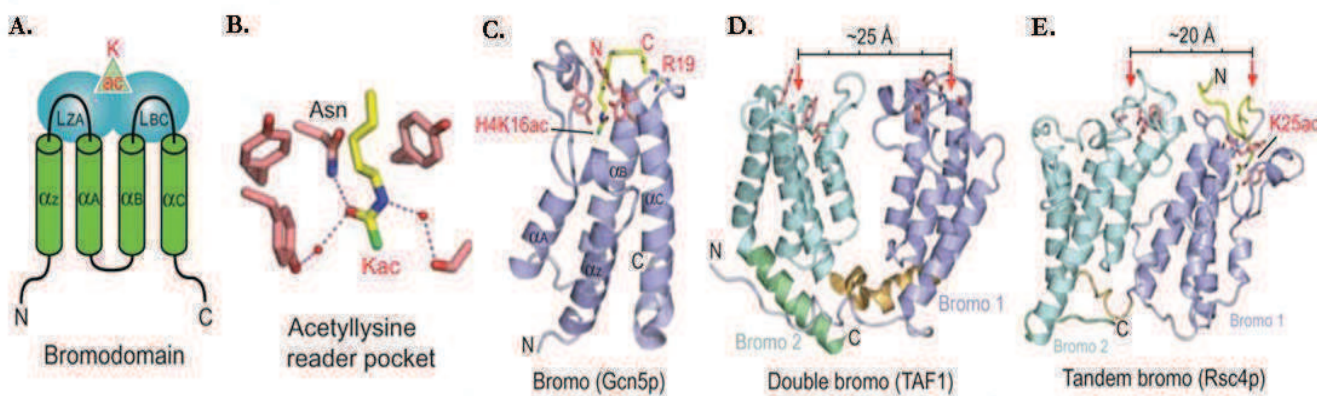


Figure n°14 : Structure des bromodomains. (Taverna et al., 2007) (A) Repliement des bromodomains. On distingue les hélices alpha (αZ , αA , αB , αC) et les boucles ZA et BC qui interagissent avec le motif acétylé. (B) Mode de reconnaissance conservé de la lysine acétylée. (C) Le bromodomaine de Gcn5 en complexe avec le peptide H4K16 acétylé. (D) et (E) Le double bromodomaine de TAF1 et les bromodomains en tandem de Rsc4, en complexe avec des peptides acétylés.

- Les régulateurs épigénétiques de la famille BET

La famille des protéines à double bromodomaine BET

Les protéines de la famille BET sont extrêmement bien conservées au cours de l'évolution. Ces protéines possèdent deux bromodomains (BD1 et BD2), un domaine extra-terminal (ET) et une séquence PEST riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T). Cette séquence est propre aux protéines avec une demi-vie courte. En effet, la séquence PEST pourrait donc diminuer la stabilité des protéines et conduire à la dégradation. Il existe deux membres de la famille BET chez la levure (Bdf1 et Bdf2), un chez la drosophile (Fsh) et

quatre chez les mammifères dont trois d'expression ubiquitaire, BRD2, BRD3, BRD4 et un spécifique du testicule, BRDT (voir figure n°15A ; Florence and Faller, 2001).

Les levures KO pour Bdf1 sont viables mais se bloquent en fin de méiose lors de la sporulation. Les doubles KO pour Bdf1 et Bdf2 ne sont pas viables, ce qui suggèrent une redondance de ces protéines au cours de la phase diploïde (Chua and Roeder, 1995). Chez la drosophile, la protéine FSH est essentielle au développement, elle contrôle l'expression spatiotemporelle des facteurs homéotiques. En effet, cette protéine interagit avec les promoteurs des gènes comme *ultrabithorax* et *tritorax* et régule leur activation (Digan et al., 1986). Les souris KO pour BRD2 sont létales à l'état embryonnaire et présentent de sévères défauts de formation du tube neural et un retard de croissance (Shang et al., 2009). Le KO de BRD4 est aussi léthal à l'état embryonnaire, et les souris hétérozygotes BRD4 meurent dans les 2 semaines après la naissance (Houzelstein et al., 2002). La délétion du premier bromodomaine de BRDT est associée à l'infertilité des souris mâles homozygotes mutantes, avec des altérations dans les stades tardifs de la spermatogenèse (Shang et al., 2007).

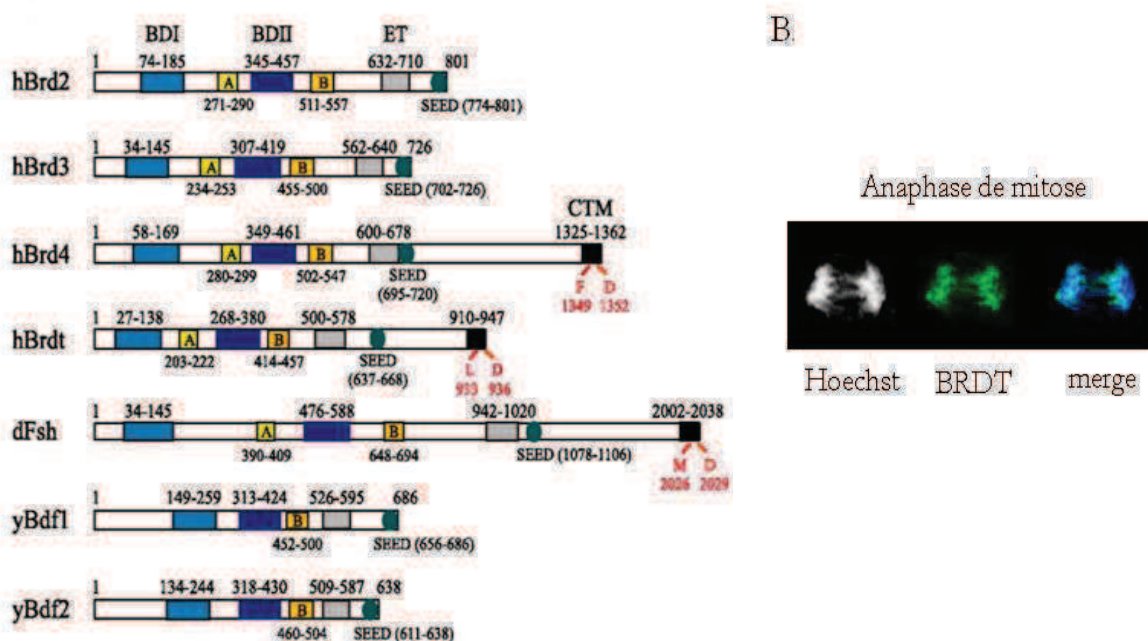


Figure n°15 : Les membres de la famille BET et leur association à la chromatine acétylée. (A) La famille BET est extrêmement bien conservée au cours de l'évolution. On retrouve ces protéines à double bromodomaine chez la drosophile (d), la levure (y) et les mammifères dont l'homme (h). Ces protéines possèdent 2 bromodomaines, BD1 et BD2, et un domaine extra-terminal, ET. (d'après Florence & Faller et al., 2001). (B) BRDT reste accrochée aux chromosomes mitotiques lorsque l'on induit une hyperacétylation des histones (d'après Pivot-Pajot et al., 2003 ; images personnelles).

Association spécifique à la chromatine acétylée des protéines BET

Les bromodomaines de la famille BET présentent des affinités différentes au sein d'un environnement chromatinien acétylé ce qui pourrait permettre leur recrutement sur des régions spécifiques du génome. Par exemple, les bromodomaines de BRD2 s'associe à l'histone H4 acétylée plutôt que H3 acétylée, le premier bromodomaine (BD1) se lie à H4K12ac, et le second bromodomaine (BD2) à H4K5ac ou H4K12ac (Umehara et al., 2010). BRD4 reconnaît les modifications H4K5ac et H4K12ac comme BRD2 mais également la modification H3K14ac (Dey et al., 2003). De plus, BRD4 est capable d'interagir avec la sous-unité acétylée du facteur NF-KappaB, ce qui laisse supposer que les histones ne sont pas les seuls partenaires acétylés reconnus par les bromodomaines (Huang et al., 2009).

Les protéines BET, actrices d'une mémoire épigénétique

Contrairement aux autres facteurs d'organisation de la chromatine, les protéines BET sont capables de rester fixées aux chromosomes durant la division mitotique (voir figure n°15B). Ceci laisse supposer qu'elles puissent jouer un rôle important au cours de la mitose et qu'elles participent au maintien d'une mémoire épigénétique à travers les divisions cellulaires. Par exemple, au cours de l'embryogenèse chez le zebrafish, BRD4 reste associée aux chromosomes mitotiques (Toyama et al., 2008). Chez *C.elegans*, la protéine BET-1 est indispensable pour la mise en place et le maintien de l'état différencié de plusieurs types cellulaires (Shibata et al., 2010).

Les protéines BET pourraient empêcher la perte de marques acétylées de la chromatine qui a lieu pendant la mitose et permettre la propagation de ces marques au fil des divisions cellulaires. Par exemple, BRD4 semble nécessaire pour la maintenance de l'acétylation de la lysine 14 de l'histone H3 et de la lysine 12 de l'histone H4 durant la mitose (Nishiyama et al., 2006). D'autre part, BRD4 reste sur les chromosomes mitotiques au niveau de gènes qui vont être réactivés juste après la division cellulaire (Dey et al., 2009). BRD4 participe à la transmission d'un programme transcriptionnel spécifique à travers les divisions cellulaires. Cependant, il est intéressant de noter que BRD4 ne semble pas associée aux chromosomes lors de la méiose des ovocytes de la souris (Nagashima et al., 2007). Cette capacité à rester associée aux chromosomes mitotiques est d'ailleurs utilisée par certains virus, qui grâce à leurs protéines virales interagissant avec les protéines BET, vont coupler leur génome à celui de la cellule hôte, permettant alors une ségrégation du virus au sein des deux cellules filles (McBride et al., 2004).

Régulateurs majeurs de la transcription

La protéine BRD4 est un coactivateur transcriptionnel puissant. Plusieurs études montrent que BRD4 interagit avec le complexe P-TEFb (composé de la Cdk9 et de la Cycline T1), au niveau d'une de ses deux sous-unités, la Cycline T1 (Jang et al., 2005 ; Yang et al., 2005). Au sein d'une cellule, le complexe P-TEFb est retrouvé sous deux formes, l'une inactive et

l'autre active. Quand il est couplé à la sous-unité inhibitrice 7SKsnRNA (7SK small nuclear RNA), P-TEFb est inactif. La forme active de ce complexe résulte de sa dissociation de 7SK snRNA et de son association avec BRD4. L'association de P-TEFb avec BRD4 permet la transition entre la phase d'initiation et la phase d'élongation de la transcription, en stimulant la processivité de l'ARN polymérase II par phosphorylation (voir figure n°16). BRD4 et P-TEFb semblent être au centre des mécanismes de régulation de la transcription. En effet, l'ARN polymérase II et CBP/p300 sont généralement constitutivement associées à la partie promotrice des gènes et, le recrutement de P-TEFb par association de BRD4 à la chromatine acétylée au niveau de ces promoteurs est le facteur déclenchant de la transcription (Byun et al., 2009). De plus, comme BRD2, BRD4 est associée au complexe médiateur TRAP. Ainsi, BRD4 pourrait activer la transcription en stimulant à la fois le recrutement de l'ARN polymérase II via le complexe médiateur et l'activation de la polymérase par phosphorylation grâce au complexe P-TEFb. Chez la levure, une des fonctions caractérisée de Bdf1 est sa capacité à fixer le facteur général de transcription TFIID, nécessaire à l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription (Matangkasombut and Buratowski, 2003). Les fonctions semblent donc relativement similaires à celles des protéines humaines BRD2 et BRD4. Il est intéressant de noter également que Bdf1 fixe la chromatine à proximité des télomères et empêche la fixation de SIR2, une HDAC responsable de la répression des régions télomériques. Une mutation de Bdf1 entraîne la propagation des protéines SIR en dehors des régions hétérochromatiques. Ainsi, Bdf1 délimite la frontière entre hétérochromatine et euchromatine et empêche la répression transcriptionnelle des régions d'euchromatine proche des télomères (Ladurner et al., 2003).

D'autres membres de la famille BET peuvent aussi fonctionner comme des régulateurs transcriptionnels. Par exemple, BRD2 est présent sur le promoteur de la Cycline A et sa surexpression active la transcription de la Cycline A et accélère le cycle cellulaire (Sinha et al., 2005 ; Denis et al., 2000). D'autre part, BRD2 et BRD3 sont également associés au niveau de la séquence codante du gène de la Cycline D1. Alors que l'inhibition par siRNA de BRD3 entraîne une mort cellulaire, l'inhibition de BRD2 entraîne une baisse spécifique de l'expression de la Cycline D1 (LeRoy et al., 2008). La protéine BRD2 pourrait ainsi participer à la transcription en recrutant des facteurs de transcription au niveau de promoteurs spécifiques, mais également le complexe médiateur TRAP, qui interagit directement avec l'ARN polymérase II (Crowley et al., 2004). De plus, BRD2 pourrait également faciliter le remodelage de la chromatine nécessaire à l'expression des gènes via une potentielle activité de chaperonne d'histone et, via son interaction avec des membres du complexe ATP-dépendant SWI/SNF possédant une activité HAT (Denis et al., 2006). Ce complexe pourrait en effet faciliter l'éviction des nucléosomes et permettre la transcription (Luebben WR et al., 2010).

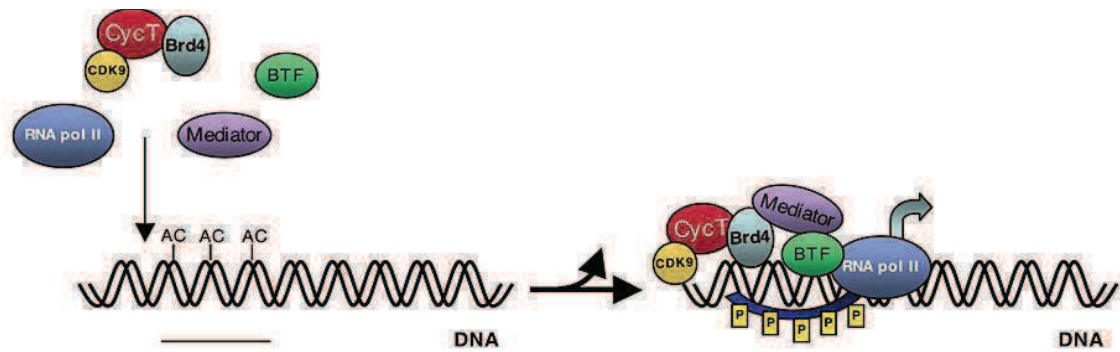


Figure n°16 : Rôle de BRD4 dans la transcription. BRD4 s'associe à la fois à la chromatine acétylée, au complexe P-TEFb (Cycline T1 + Cdk9) et au complexe médiateur / ARN pol II et régule ainsi l'initiation et l'élongation de la transcription (www.f1000.com).

2.5. Modification de l'ADN par méthylation

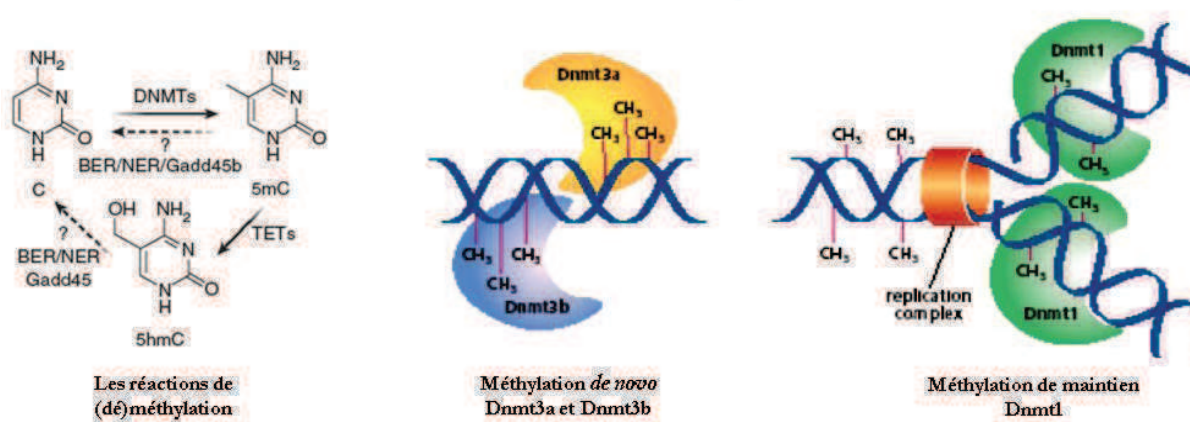
- Régulation de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN a un rôle différent chez les organismes procaryotes et eucaryotes. Par exemple, chez les bactéries, la méthylation de l'ADN permet de discriminer entre ADN endogène et ADN d'agent infectieux comme les phages. Chez les eucaryotes, la méthylation joue principalement un rôle régulateur de l'expression des gènes et stabilise le génome en limitant l'activation des éléments transposables (Goll and Bestor, 2005).

Bien que les quatre bases azotées de l'ADN puissent être méthylées, l'adénine est la plus fréquemment modifiée chez les procaryotes (sur un atome d'azote) et la cytosine chez les eucaryotes (sur le carbone 5 ; voir figures n°17). Les sites de méthylation sont presque toujours situés au niveau d'enchaînements 5' CG 3', appelés îlots CpG, localisés principalement dans des régions présentant de nombreuses séquences répétées mais aussi au niveau du promoteur des gènes. On notera que cette séquence permet une symétrie de méthylation sur les deux brins complémentaires de l'ADN.

Cette modification est ajoutée à l'ADN par une famille de protéines très conservées, appelées DNA cytosine-5 méthyltransférase (Dnmt) qui transfèrent le groupe méthyl du S-adénosyl-L-méthionine sur la cytosine de l'ADN. On connaît 5 Dnmt classées selon leur homologie de séquences dans leur partie catalytique carboxy-terminale. Dnmt1 est impliquée dans la maintenance de la méthylation au fil des divisions successives. En effet, au cours de la réplication, le brin d'ADN d'origine maintient les marques de méthylation, alors que le brin néo synthétisé ne possède aucune marque. Dnmt1, qui possède une grande affinité pour l'ADN hémiméthylé, va ainsi méthyler de manière symétrique ce nouveau brin. La fonction de Dnmt2 est très peu connue mais elle semble méthyler à la fois l'ARN et l'ADN (Schaefer

et al., 2009). Le rôle de la méthylation de l'ARN est en cours d'investigation (Motorin et al., 2010). Dnmt3a et Dnmt3b sont les *de novo* DNA méthyltransférases impliquées lors du développement des cellules germinales et lors de l'embryogenèse précoce (Goll and Bestor, 2005). Dnmt3L est structuralement proche de Dnmt3a et Dnmt3b mais ne possède pas de domaine catalytique conservé. Dnmt3L interagit physiquement avec Dnmt3a et Dnmt3b et module leur activité (Suetake et al., 2004). L'invalidation de Dnmt3L conduit notamment à un blocage en méiose, et à une réactivation de rétrotransposons chez le mâle (Bourc'his and Bestor, 2004). De même, l'inactivation de Dnmt3a dans les cellules germinales engendre des anomalies de synapsis, une réactivation des transposons, des défauts d'empreinte parentale et une perte progressive des cellules germinales qui conduit à une absence de spermatozoïdes (Kaneda et al., 2004).



- Rôles de la méthylation de l'ADN

La méthylation intervient dans un grand nombre de processus cellulaires fondamentaux. La méthylation d'un site peut réprimer directement la transcription en bloquant la fixation de facteurs de transcription sur les promoteurs (Watt and Molloy, 1988). De plus, de nombreux sites de méthylation sont également retrouvés à l'intérieur même des gènes, au niveau d'introns et d'exons (Klose and Bird, 2006). Cette méthylation pourrait perturber l'étape d'allongement de l'ARN par l'ARN polymérase II. Par exemple, l'introduction d'un site de méthylation ectopique dans une zone transcrite fait baisser le taux de transcription du gène (Lorincz et al., 2004).

Pendant le développement de la lignée de cellules érythrocytaires chez l'humain et le poulet, l'ADN du promoteur du gène de la globine est déméthylé alors que le même promoteur est hyperméthylé dans les cellules ne produisant pas de globine. Ces marques de méthylation changent également au cours du développement. Chez l'embryon humain, les cellules qui produisent l'hémoglobine ont leurs promoteurs déméthylés pour les gènes codants pour les ϵ -globines formant l'hémoglobine embryonnaire (Groudine and Weintraub, 1981; van der Ploeg and Flavell, 1980). Quand les globines embryonnaires sont remplacées par les globines adultes, les promoteurs des gènes codants pour les γ -globines sont déméthylés et ceux des ϵ -globines méthylés (voir figure n°18A ; Mavilio et al., 1983). Cette corrélation entre le niveau de méthylation des cytosines et la répression transcriptionnelle a été confirmée expérimentalement. En ajoutant dans des cellules des transgènes possédant différentes marques de méthylation, il a été montré que la méthylation au sein des promoteurs ou des séquences activatrices d'un gène corrèle extrêmement bien avec le niveau de transcription du gène (Busslinger et al., 1983). Au cours du développement des vertébrés, l'absence de méthylation de l'ADN corrèle avec l'expression de nombreux gènes spécifiques d'un tissu.

La méthylation de l'ADN, également impliquée dans les phénomènes d'empreinte parentale, est responsable d'une régulation différentielle de l'expression des deux allèles d'un petit nombre de gènes regroupés sur le génome (Morison et al., 2005). Ainsi, certaines zones sont dites soumises à empreinte maternelle, car seuls certains allèles maternels sont exprimés, et les allèles paternels correspondants sont réprimés (voir figure n°18B). De la même manière, on parle d'empreinte paternelle lorsque les allèles d'origine paternelle sont exprimés alors que les allèles maternels sont réprimés (Delaval and Feil, 2004). L'étude détaillée de certains loci fait ressortir que l'état de méthylation d'une région régulatrice, appelée ICR (Imprinting Control Region), est au sommet de la cascade de régulation. La méthylation de l'ICR d'un allèle empêcherait la fixation de facteurs de régulation capables de se lier sur un ICR non méthylé. D'autres facteurs comme les modifications post-traductionnelles des histones pourraient également jouer un rôle important dans la régulation de l'empreinte parentale. Par exemple, le niveau de méthylation de chaque ICR est intimement lié aux modifications des histones associées à ces régions (Delaval et al., 2007 ; Umlauf et al., 2004).

La méthylation de l'ADN peut aussi recruter des facteurs comme ceux des membres de la famille MBP (Methyl CpG Binding Protein), capable de reconnaître les îlots CpG méthylés grâce à un domaine spécifique appelé MBD (Methyl CpG Binding Domain). Généralement, ces protéines sont associées à la répression de la transcription. Par exemple, la protéine MeCP2 contrôle l'expression de gènes du cerveau, via le complexe répresseur Sin3A (Nuber et al, 2005 ; Tudor et al, 2002). Une mutation de cette protéine est à l'origine du syndrome de Rett, maladie neurologique se traduisant par un comportement proche de celle de l'autisme et par des problèmes psychomoteurs. Globalement ces protéines, véritables "lecteurs" de la méthylation de l'ADN, vont agir ou recruter des facteurs afin d'apporter de nouvelles marques épigénétiques et/ou une activité de remodelage de la chromatine.

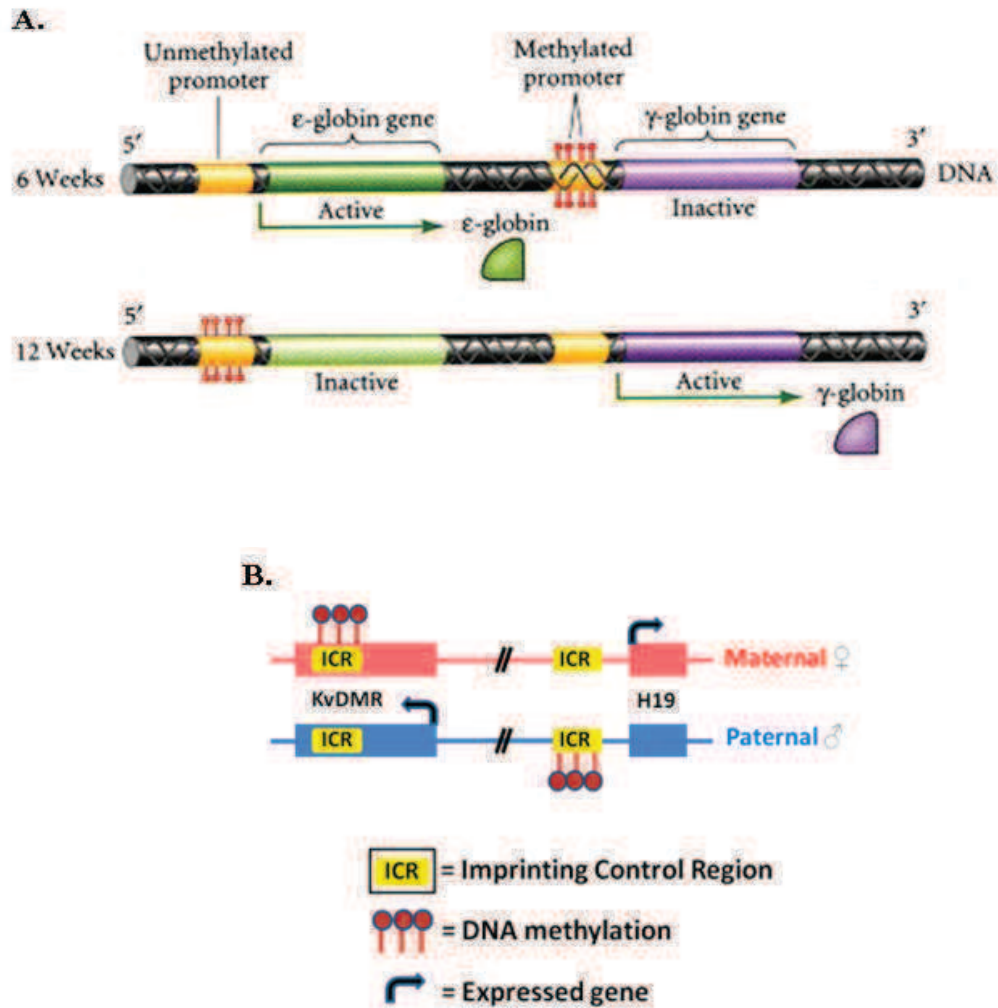


Figure n°18 : Rôle de la méthylation de l'ADN dans la transcription. (A) La méthylation des promoteurs des gènes des globines régule leur expression au cours du développement embryonnaire chez l'humain (tiré du livre Developmental Biology). (B) La méthylation des ICR régule l'expression mono-allélique des gènes soumis à l'empreinte parentale.

II. La spermatogenèse comme modèle d'étude de la réorganisation de la chromatine

1. Déroulement de la spermatogenèse

Les gamètes sont des cellules spécialisées dont la fonction est d'assurer la reproduction sexuée. Selon les groupes phylogénétiques auxquels les espèces appartiennent, les gamètes peuvent être mobiles ou non. Lorsque, pour une espèce, seul un des deux types est mobile, c'est toujours le gamète mâle, et celui-ci prend alors le nom de spermatozoïde. C'est ainsi le cas chez tous les animaux métazoaires, où le gamète femelle est, quant à lui, un ovocyte. L'espèce humaine en fait partie. Chez les plantes à fleurs, au contraire, il n'y a plus aucun gamète mobile, et le rapprochement des gamètes est assuré par une dissémination passive du pollen puis une germination dans les tissus de la fleur.

1.1. Anatomie du testicule et de l'épididyme

La spermatogenèse, version de la gamétogenèse mâle, est le processus qui, à partir des spermatogonies, cellules souches diploïdes ($2n$ chromosomes), aboutit à la production de spermatozoïdes, gamètes mâles haploïdes (n chromosomes). Chez les mammifères, elle a lieu au sein du testicule dans les tubes séminifères (du latin *semen-fère* : « qui porte la semence »). Le testicule est un organe pair de forme ovoïde. Il est entouré d'une gaine de tissus conjonctifs fibreux : l'albuginée. Le testicule est irrigué grâce à un important réseau vasculaire provenant de l'artère testiculaire et dont les branches cheminent dans l'albuginée, puis dans l'espace interstitiel. Des cloisons conjonctives divisent également le parenchyme testiculaire en plusieurs lobules, qui contiennent les tubes séminifères (voir figure n°19A). Chez l'homme, chaque testicule est composé d'environ 200 lobules testiculaires et chaque lobule comprend de 1 à 4 tubules séminifères, de longueur variant de 0,5 à 1,5 mètres pour un diamètre de 150 à 300 micromètres (voir figure n°19C). Le compartiment interstitiel, richement vascularisé, contient des cellules de Leydig, des cellules mésenchymateuses, des macrophages, des vaisseaux sanguins et lymphatiques (voir figure n°19D). Les cellules de Leydig produisent des hormones stéroïdes, et notamment les androgènes et la testostérone. Les tubules séminifères contiennent les cellules germinales, et des cellules somatiques dites "de Sertoli". Les cellules de Sertoli sont de grandes cellules de support des cellules germinales, reliées entre elles par des jonctions spécialisées, qui établissent la barrière hémato-testiculaire. La spermatogenèse se réalise dans ce compartiment privilégié, protégé de l'influence des cellules du système immunitaire.

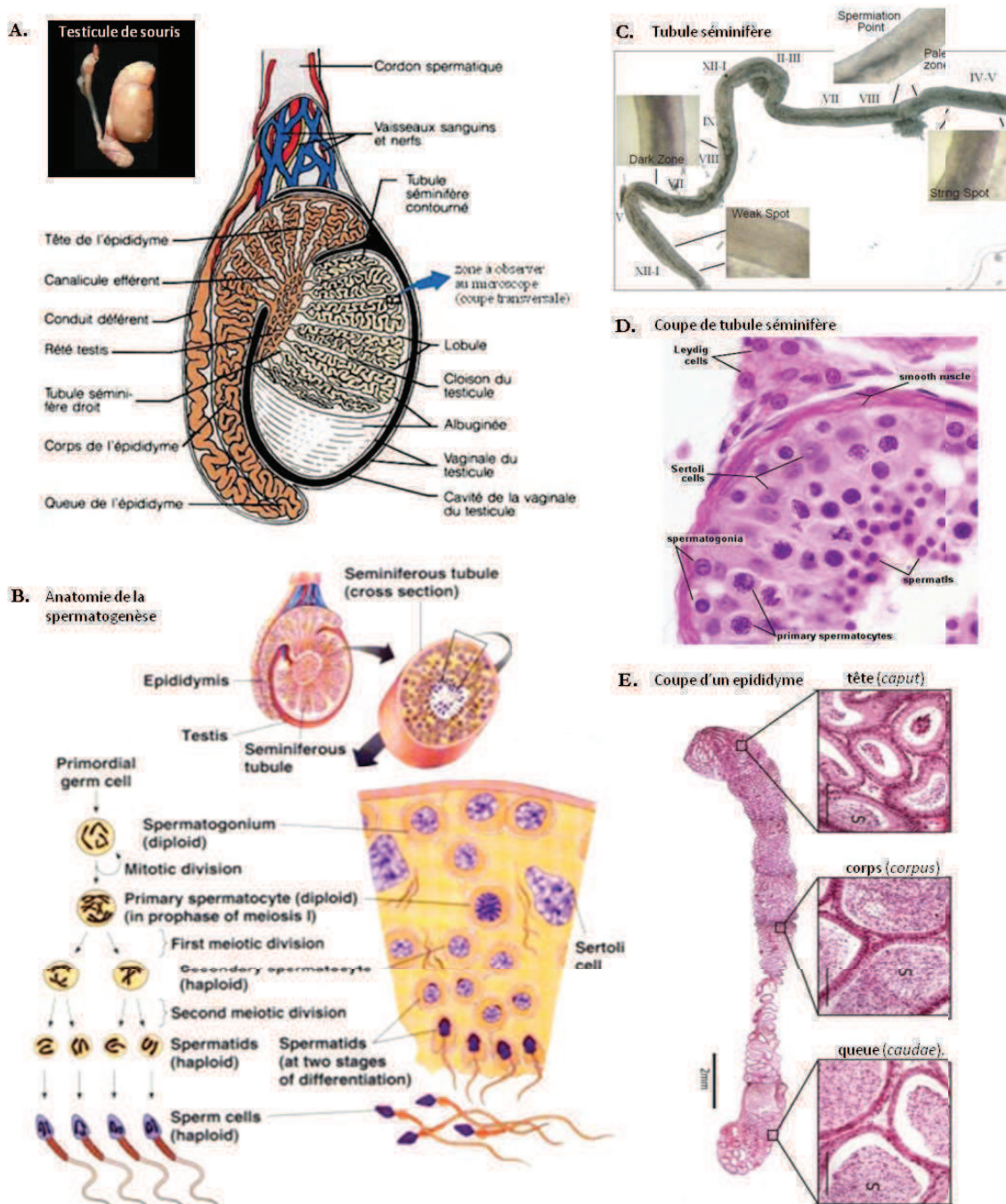


Figure n°19: Anatomie du testicule et de l'épididyme. (A) Anatomie du testicule et de l'épididyme d'une souris adulte. Au sein du testicule, on trouve les tubules séminifères protégés par l'albuginée (www.tcr.acor.org). (B) Coupe transversale schématique d'un tubule séminifère. On distingue les différents types cellulaires associés à la spermatogenèse (www.keywordpicture.com). (C) Tubule séminifère de souris où l'on peut reconnaître les différents stades de la spermatogenèse (Kotaja et al, 2004) (D) Coupe histologique transversale d'un tubule séminifère coloré à l'éosine/hématoxyline* (www.sciencephoto.com) (E) Coupe histologique d'un épидидyme et coloration éosine/hématoxyline*. Les différentes parties de l'épididyme : la tête, le corps et la queue dont agrandies (www.wikipédia.com).

*(L'hématoxyline colore le noyau en bleu et l'éosine le cytoplasme en rose)

Les cellules germinales sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère (voir figure n°19B). Les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal du tube séminifère (vers la lame basale) et les cellules les plus matures sont situées du côté apical du tube séminifère (vers la lumière). L'épithélium séminifère repose sur la lame basale du tube séminifère. Cette lame basale est constituée de tissus conjonctifs et d'une fine couche de cellules appelées cellules myoïdes pérutubulaires (Maekawa et al., 1996). Ces cellules musculaires lisses participent à la circulation des spermatozoïdes, n'ayant pas encore acquis leur mobilité dans les tubes séminifères grâce à des contractions péristaltiques.

Les spermatozoïdes formés dans les tubes séminifères, sont propulsés dans la lumière du tubule séminifère et sortent du testicule en passant par le *rete testis* (Dym, 1976). Le *rete testis* est un labyrinthe lacunaire où les tubules séminifères convergent. De celui-ci émergent 5 canaux efférents qui se fondent en un unique canal : le canal épидидymaire. Les spermatozoïdes continuent alors leurs processus de maturation le long de l'épididyme où ils acquièrent leur mobilité et deviennent fécondant (Soler et al., 1994). L'épididyme est formé d'un unique canal replié sur lui même et emballé dans une tunique conjonctive (voir figure n°19E). Il comporte trois parties identifiables sous loupe : la tête (*caput*), le corps (*corpus*) et la queue (*caudae*).

1.2. Cycle de l'épithélium séminal

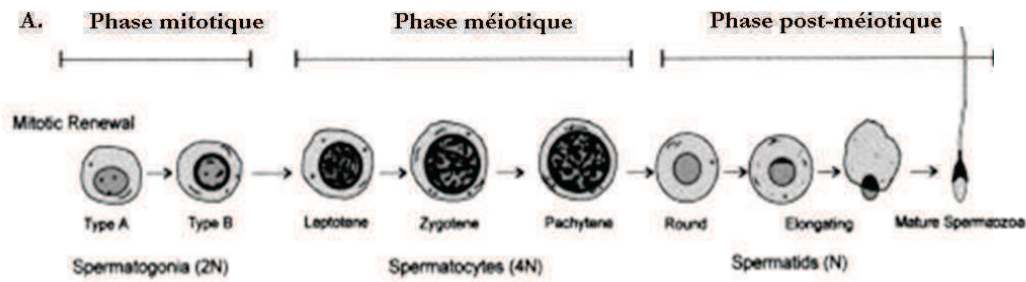
- Déroulement de la spermatogenèse

On peut subdiviser la spermatogenèse en trois phases successives : la phase proliférative, la phase méiotique et la phase post-méiotique ou spermiogenèse (voir figure n°20A). La durée de la spermatogénèse est constante pour une espèce donnée. Elle est de l'ordre de 35j chez la souris (74j chez l'homme) et, les étapes mitotiques, méiotiques et post méiotiques, ont une durée fixe et constante de respectivement 11, 10 et 14 jours (Eddy et al., 2002). Au cours de ce processus de différenciation on assiste à des événements de recombinaison génétiques importants, des changements morphologiques et fonctionnels complexes ainsi qu'un remodelage de la chromatine unique menant à la production de cellules hautement spécialisées, les spermatozoïdes.

Au cours de la première phase, la **phase proliférative**, les spermatogonies se divisent par des mitoses classiques et se différencient en spermatocytes primaires. Durant la **phase méiotique** on assiste à une recombinaison du matériel génétique chez les spermatocytes primaires puis aux ségrégations chromosomiques menant successivement aux spermatocytes secondaires et aux spermatides rondes haploïdes. Ces spermatides rondes entrent dans la dernière phase de maturation appelée **spermiogenèse** où se déroule une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe qui mène à l'allongement et la condensation des spermatides haploïdes. Cette différenciation permet alors la formation des cellules germinales les plus matures : les spermatozoïdes.

A la naissance, les tubes séminifères contiennent principalement des cellules de Sertoli (environ 86%) et des spermatogonies de type A primitif (Bellve et al., 1993 ; Bellve et al., 1977). Les cellules de Sertoli à la naissance sont morphologiquement différentes de celles des souris adulte. En effet, elles ont des formes irrégulières et leur noyau contient un à deux nucléoles. Au cours des 12 premiers jours après la naissance chez la souris, les cellules de Sertoli se divisent par mitose (Vergouwen et al., 1993) puis acquièrent leur structure définitive et deviennent alors incapables de proliférer (Clermont and Perey, 1957a). Au cours de la première vague de spermatogenèse et aux alentours de 12 jours, une proportion de cellules germinales meurt par apoptose car le nombre de cellules germinales est fonction du nombre de cellules de Sertoli. Cette apoptose est indispensable pour le bon déroulement de la spermatogenèse chez l'adulte. En effet, la proportion respective entre les cellules germinales et cellules de Sertoli reflète le fait que les cellules de Sertoli ne peuvent "soutenir" qu'un nombre limité de cellules de la lignée germinale (Hayashi et al., 2002). Le principal argument en faveur de cette hypothèse est que la réduction expérimentale du nombre de cellules de Sertoli dans les testicules de rat pré-pubères entraîne une diminution proportionnelle du nombre de spermatides rondes chez l'adulte sans affecter pour autant la spermatogenèse (Orth et al., 1988).

Les spermatogonies de type A et B sont présentes 8 jours après la naissance (voir figure n°20B). Dès 10 jours, la prophase méiotique est initiée et les spermatocytes pachytène précoces et tardifs sont respectivement observés à 14 et 18 jours. Les spermatocytes secondaires et les spermatides rondes apparaissent en nombre croissant entre 18 et 20 jours. Les premières spermatides allongées et condensées arrivent entre 25 et 30 jours. Dans le tube séminifère adulte, les cellules de Sertoli post-mitotiques représentent approximativement 3% des cellules du tube séminifère et sont les seules cellules somatiques en contact direct avec les cellules germinales (Bellve et al., 1993).



B.

Type de cellules	Jours après la naissance (dpp)							
	6	8	10	12	14	16	18	20
Spermatogonies type A primitives	16	-	-	-	-	-	-	-
Spermatogonies type A	-	17	7	7	6	9	3	4
Spermatogonies type B	-	10	11	8	6	8	7	6
Spermatocytes préleptotène	-	-	15	11	9	5	10	7
Spermatocytes leptotène	-	-	15	12	13	5	5	9
Spermatocytes zygotènes	-	-	-	23	14	7	8	8
Spermatocytes pachytènes	-	-	-	-	15	27	36	33
Spermatocytes diplotènes/secondaires	-	-	-	-	-	-	1	1
Spermatides rondes	-	-	-	-	-	-	1	4
Sertoli	84	73	52	39	37	39	29	28

Pourcentage de cellules dans les tubes séminifères

Figure n°20 : Chronologie de la spermatogenèse. (A) Les trois phases de la spermatogenèse chez la souris adulte (www.wikipedia.com). (B) Apparition des différents types de cellules germinales au cours du temps dans le testicule des souris pré-pubère (d'après Bellvé et al., 1977).

- Stades du cycle spermatogénique

Les cellules souches de renouvellement entrent en spermatogenèse périodiquement et à intervalles réguliers, d'une durée de 8 jours chez la souris (16 jours chez l'homme). La spermatogenèse est un processus continu dans le temps à partir de la puberté. Les spermatogonies sont reliées par des ponts cytoplasmiques et entrent en spermatogenèse en groupe. Ces ponts cytoplasmiques persistent entre les spermatocytes de la même génération et également chez leur cellules filles (les spermatides rondes), jusqu'à la fin de la spermiogenèse. Ainsi, des groupes isogéniques de cellules germinales qui appartiennent à la même génération effectuent leur spermatogenèse d'une manière synchrone.

Au sein de l'épithélium séminal 4 à 5 générations de cellules sont disposées en couches superposées. Les cellules les moins différenciées comme les spermatogonies sont situées du côté basal du tube séminifère (vers la lame basale) et les cellules les plus matures comme les spermatides condensées sont situées du côté apical du tube séminifère (vers la lumière). Au cours de la spermatogenèse, les cellules germinales mûrissent dans l'épithélium séminal de la périphérie du tube vers la lumière et dans le sens longitudinal, en décrivant une trajectoire hélicoïdale au sein de l'épithélium séminal. De ce fait, les cellules germinales observées sur une coupe d'un tube séminifère forment des associations cellulaires (douze chez la souris), correspondant à des différentes générations de cellules. La composition de chaque type d'association est constante et correspond à un stade spécifique du cycle spermatogénétique (voir figure n°21). Les cellules progressent de stade en stade chronologiquement.

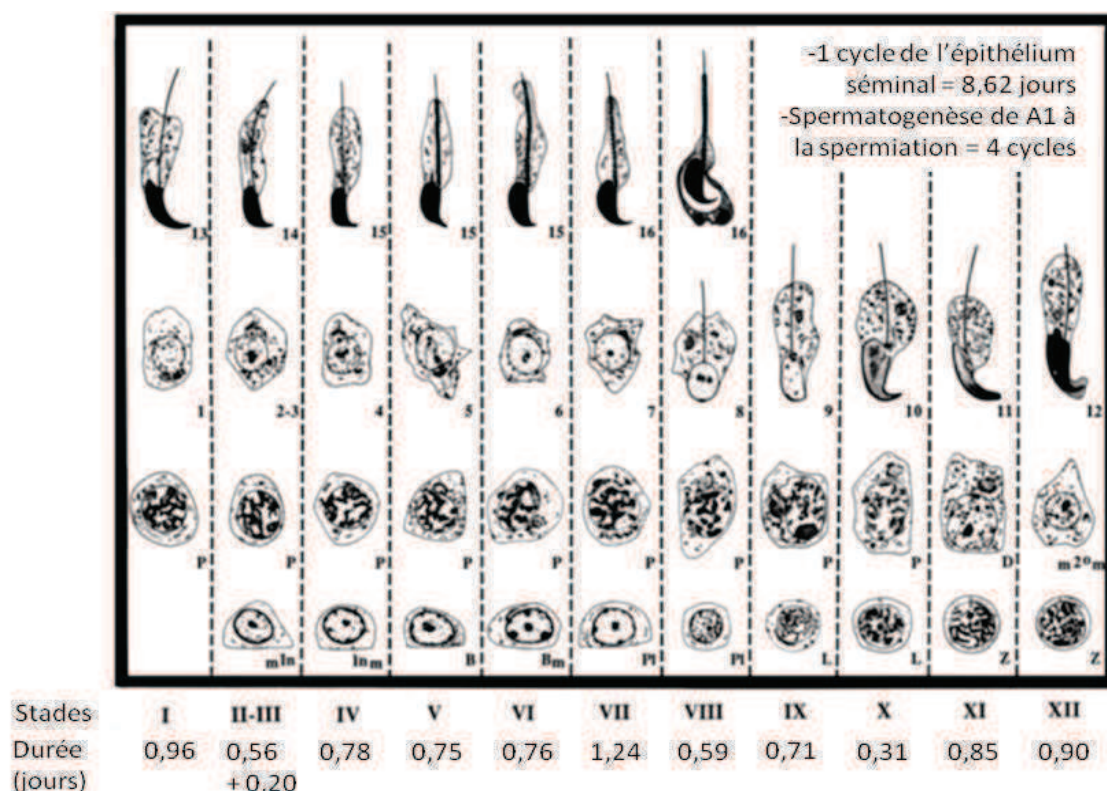


Figure n°21 : Stades du cycle spermatogénétique chez la souris. Représentation schématique des stades de la spermatogenèse au sein des tubules séminifères (Bellvé et al., 1977). A un stade donné correspond une association cellulaire particulière. Par exemple au stade IX, on trouve des spermatocytes leptotènes (L), des pachytènes (P) et spermatides allongées.

Les cellules germinales associées à la phase proliférative sont en contact étroit avec la lame basale du tube séminifère. Les spermatogonies indifférenciées (de type A) ne sont pas représentées sur la figure n° 21 car elles sont peu nombreuses et réparties dans la totalité des stades. Les spermatogonies de type intermédiaires (In), présentes dans les stades II à IV, se

différencient d'abord en spermatogonies de type B (stades V à VI), puis en spermatocytes pré-Leptotène (PL) dans les stades VII et VIII.

On peut observer les spermatocytes leptotène (L) aux stades IX-X, zygotène (Z) aux stades XI-XII et pachytène (P) aux stades I à X. Enfin, les spermatocytes diplotène (D) sont présents uniquement au stade XI. Les spermatocytes secondaires (m2om) présents au stade XII, sont facilement reconnaissables car ils enchaînent les deux divisions méiotiques qui donnent naissance aux spermatides rondes.

La spermiogenèse est divisée en 16 étapes. Chaque étape est associée au développement caractéristique de l'acrosome des spermatides. L'acrosome est une structure qui recouvre l'extrémité antérieure du spermatozoïde et qui contient des enzymes facilitant la pénétration dans l'ovocyte lors de la fécondation. L'acrosome peut être visualisé grâce à la coloration de Schiff qui utilise l'acide périodique (Clermont and Perey, 1957b). Le noyau des spermatides est rond aux stades 1 à 7, s'allonge progressivement pendant les stades 8 à 11 puis se compacte dans les stades 12 à 16. A la fin de leur différenciation, les spermatides condensées matures sont relarguées dans la lumière du tube séminifère: c'est la **spermiation**. Les spermatozoïdes terminent ensuite leur maturation au sein de l'épididyme.

1.3. Les différentes phases de la spermatogenèse adulte

- La phase mitotique : auto-renouvellement et prolifération

Les cellules souches spermatogoniales (ou spermatogonies *As*) se divisent par mitose soit en deux nouvelles cellules souches stock (auto-renouvellement des spermatogonies *As*), soit en une paire de spermatogonies *Apr* (voir figure n°22). Les spermatogonies *Apr* ne terminent pas leur cytokinèse et restent reliées par des ponts intercellulaires (de Rooij and Russell, 2000 ; de Rooij et al., 2001). Les spermatogonies *Apr* se divisent ensuite par mitoses pour former des structures interconnectées de 4, 8, 16 et occasionnellement 32 spermatogonies alignées *Aal*. Les spermatogonies *As*, *Apr*, et *Aal* sont morphologiquement indifférenciables par microscopie photonique sur une coupe histologique de testicule et, sont collectivement appelées spermatogonie de type A indifférenciée (*Aundiff*). Les spermatogonies *Aal* se différencient, changent de morphologie et deviennent des spermatogonies A1. Chez la souris, les spermatogonies A1 se divisent 5 fois et forment successivement les spermatogonies A2, A3 A4, Intermediaire (In) et B. Les spermatogonies de type B se divisent ensuite en spermatocytes pré-leptotène. Chaque étape de différenciation des spermatogonies est associée à une division mitotique, excepté la transition des spermatogonies *Aal* à A1. Les spermatogonies *As* sont considérées comme les seules vraies cellules souches spermatogoniales même si les spermatogonies *As*, *Apr* et *Aal* sont désignées comme *Aundiff* (de Rooij and Grootegoed, 1998). Des études récentes suggèrent qu'*Apr* et

Aal pourraient avoir les mêmes caractéristiques des cellules souches sous certaines conditions (Nakagawa et al., 2007).

Les cellules souches spermatogoniales constituent seulement une faible fraction des cellules germinales totales. On dénombre environ 30 000 cellules souches spermatogoniales dans chaque testicule localisées en périphérie des tubes séminifères. Ces cellules peuvent être isolées grâce aux marqueurs de surfaces caractéristiques des cellules souches tels que INTEGRIN- $\alpha 6+$, INTEGRIN- $\beta 1+$, THY-1+, CD24+, CD9+, KIT-, INTEGRIN- $\alpha v-$, MHC-Ia/ $\beta 2M-$, SCA-1- and CD34-, (Shinohara et al., 1999 ; Kanatsu-Shinohara et al., 2004). Une fois ces cellules triées, elles peuvent être transplantées (dans des testicules de souris receveuses) afin d'étudier leur caractéristiques et leur capacité à coloniser un nouvel environnement (Brinster and Zimmermann, 1994).

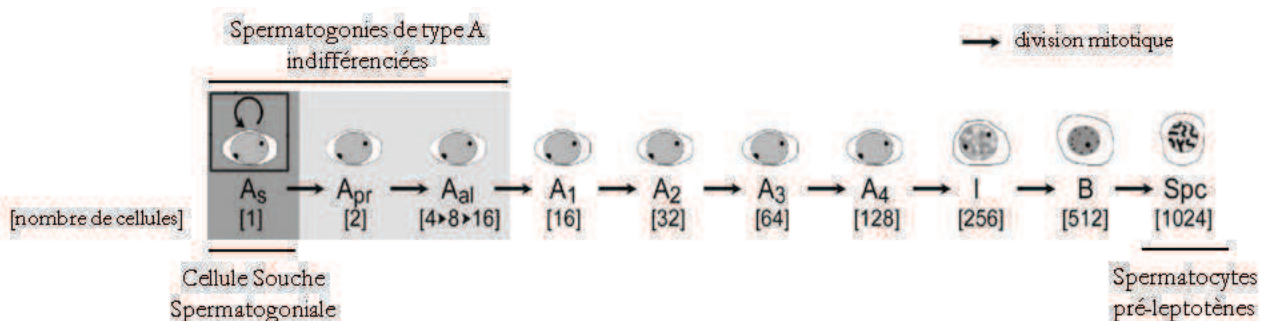


Figure n°22 : La phase mitotique de la spermatogenèse. Les différentes étapes de différenciation des spermatogonies. Une spermatogonie A_s génère 1024 spermatocytes au cours de sa prolifération (www.stembook.org).

L'auto-renouvellement et la différenciation des spermatogonies peuvent être régulés par des facteurs extrinsèques provenant de l'environnement somatique et par des programmes génétiques spécifiques des cellules germinales. Par exemple, le facteur extrinsèque KITL (KIT Ligand) est produit et délivré par les cellules de Sertoli et contrôle la différenciation des cellules germinales qui possède le récepteur KIT à leur surface (Loveland and Schlatt, 1997). Parmi les facteurs intrinsèques connus on retrouve des régulateurs transcriptionnels comme PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger), Oct 3/4 (Octamer-binding Transcription factor 3/4) et la protéine kinase ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated).

Les facteurs impliqués dans l'autorenouvellement des cellules souches spermatogoniales

ATM régule l'apoptose et les points de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux cassures double brin de l'ADN, au raccourcissement des télomères et au stress oxydatif (Shiloh et al., 2003). Le Knock-Out (KO) de ATM engendre infertilité male et femelle chez la souris

(Barlow et al 1996). La perte de ATM dans les testicules conduit à la perte progressive des spermatogonies indifférenciées par l'arrêt de leur cycle cellulaire en phase répliative et une accumulation des dommages à l'ADN (Takubo et al., 2008). De plus, la culture de ces cellules montre leur incapacité à s'auto-renouveler et, l'expérience de transplantation, leur incompétence à coloniser un épithélium séminal.

Le facteur de transcription Oct3/4 est requis pour la maintenance et l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (Pesce and Scholer, 2001). Chez la souris, au cours de la gastrulation, l'expression d'Oct4 est progressivement réprimée dans l'épiblaste et, à 7,5 jours post-coït (7,5jpc), l'expression d'Oct4 est restreinte aux cellules germinales primordiales (PGCs)(Scholer et al., 1990). Après la naissance l'expression de Oct3/4 est maintenue dans les spermatogonies indifférenciées des testicules (Pesce et al., 1998). Le KO de Oct3/4 est létal au moment de l'implantation de l'embryon (Nichols et al., 1998). Le KO conditionnel dans les PGC entraîne l'apoptose massive de ces cellules (Kehler et al., 2004).

Plzf est un facteur de transcription exprimée exclusivement dans les spermatogonies indifférenciées. Le KO de Plzf engendre une perte progressive des spermatogonies par apoptose sans affecter clairement les cellules somatiques (Costoya et al., 2004). La souris mutante *luxoid*, possède une mutation non sens dans le gène Plzf, montre un défaut d'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales (Buaas et al., 2004). La transplantation des cellules germinales du mutant *luxoid* prouve que les défauts sont intrinsèques aux cellules souches spermatogoniales car ces cellules sont incapables de coloniser le testicule receveur.

Les facteurs impliquées dans la différenciation des spermatogonies

L'étude de plusieurs mutants ponctuels des gènes codant pour KITL et KIT montre que, selon le site de mutation, la dérégulation de cette voie de signalisation entraîne une variété de défauts spermatogéniques. Par exemple, chez un mutant KITL, les spermatogonies indifférenciées prolifèrent mais ne se différencient jamais et les spermatogonies *Aal* ne sont pas observé à cause de l'apoptose de ces spermatogonies (de Rooij et al., 1999)

Des microdélétions dans le bras long du chromosome Y sont la cause de certains cas d'infertilité chez l'homme et certains primates. Chez d'autres mammifères, un gène unique autosomal nommé Dazl (*Deleted in Azoospermia*) code pour une protéine de liaison à l'ARN essentielle pour la fertilité mâle et femelle (Ruggiu et al., 1997). Les tubes séminifères de souris KO pour Dazl contiennent uniquement des spermatogonies indifférenciées qui, bien qu'elles prolifèrent, sont soumises à une apoptose active.

Les hormones jouent aussi un rôle clef dans la capacité reproductive. Une diminution de la production de la testostérone ou un blocage des récepteurs aux androgènes induit un arrêt de la spermatogenèse en méiose. La testostérone n'a pas d'impact direct sur le développement des cellules germinales males mais peut indirectement réguler la spermatogenèse via les cellules de Sertoli (Holdcraft and Braun, 2004b). De nombreuses études montrent également que la testostérone est requise pour la spermiogenèse et la spermiation (Holdcraft and Braun,

2004a). Cependant aucune preuve ne suggère que la testostérone est nécessaire à la différenciation et l'auto-renouvellement des spermatogonies.

Le mécanisme moléculaire impliqué dans l'entrée en méiose (une transition G2-M) n'est pas élucidé. Plusieurs membres de la famille de Cyclines et des CDKs (Cyclin Dependant Kinase) sont exprimés dans les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides suggérant leur intervention à la fois dans les divisions cellulaires et la différenciation (Ravnik and Wolgemuth, 1999).

- La méiose : recombinaison génétique et divisions méiotiques

La méiose est un programme spécialisé comportant deux divisions cellulaires couplées qui chez les eucaryotes constitue la base de la reproduction sexuée. La méiose, à partir d'une cellule diploïde contenant deux copies de chaque chromosome – un maternel et un paternel – produit quatre cellules haploïdes contenant une copie de chaque chromosome avec un mélange unique de l'ADN maternel et paternel (voir figure n°23). La méiose est un processus ancien qui se produit chez quasiment tous les eucaryotes appartenant notamment au règne animal, fongique et végétal. Les événements uniques de la méiose ont lieu au cours de la première division appelée méiose I. La seconde division, la méiose II, est, par de nombreux aspects, très similaire à la mitose.

La plupart de nos connaissances sur la méiose nous viennent d'études menées chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*. Chez la levure il est possible d'induire une vague synchrone de méiose dans les cultures, en effet la sporulation des levures est induite par une détérioration des conditions de vie des levures, comme par exemple une privation des nutriments. Cette voie de différenciation passe par un brassage du génome des levures diploïdes au cours de la méiose, puis une différenciation des cellules haploïdes en spores. Les spores s'entourent d'une paroi très résistante, pendant que leur noyau se compacte. Elles entrent alors dans un état inactif (état végétatif), attendant que les conditions environnementales redeviennent propices. Ces spores peuvent alors s'accoupler (se conjuguer) et régénérer des levures diploïde.

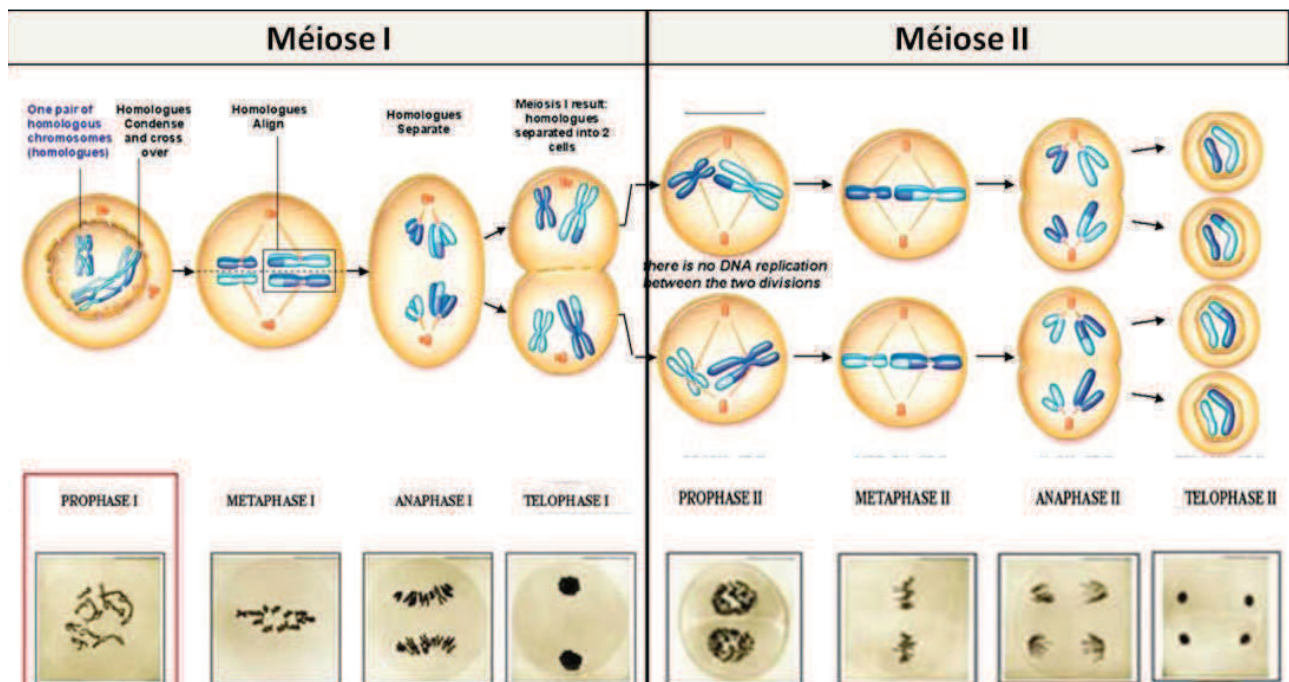


Figure n°23 : La méiose et ses deux divisions méiotiques. Les spermatocytes diploïdes, issus de la phase mitotique, subissent les deux divisions méiotiques successives, sans réplication intermédiaire, générant les spermatides haploïdes. Cellules méiotiques observées en microscopie photonique (d'après Thomson Learning).

Mouvement des chromosomes méiotiques

Au cours de la prophase I de la méiose, les chromosomes homologues s'apparient, grâce à un processus de recombinaison homologue, déclenché par la formation de cassures double-brin, qui crée des liens physiques entre les chromosomes homologues, et leur permet d'être ségrégués correctement vers chaque cellule fille à la première division. En plus de ce rôle "mécanique", ces événements de recombinaison s'accompagnent d'échanges de bras chromosomiques entre chromosomes homologues, ou "crossing-over". Cet échange de matériel génétique est une source de diversité et peut s'avérer bénéfique dans le contexte de l'évolution et de la sélection naturelle. La prophase I, très longue, est subdivisée en cinq stades successifs appelés leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse (voir figure n°24).

Avant d'entrer en prophase I, les spermatocytes pré-leptotènes, dupliquent leur ADN. Ensuite, les chromosomes homologues commencent à s'aligner au stade pré/leptotène. La formation des cassures double-brin participe étroitement à cet alignement. Le début du stade leptotène est marqué par une condensation de la chromatine et l'apparition des chromosomes individualisés, dont les télomères s'attachent à la membrane nucléaire interne. Au début du stade zygotène les télomères sont regroupés au niveau d'un point sur

l'enveloppe nucléaire faisant apparaître l'arrangement en bouquet des chromosomes ("stade du bouquet" ; Siderakis and Tarsounas, 2007).

Au cours du stade zygotène, grâce à la recombinaison engagée par les cassures double-brin, les homologues se rapprochent pour aboutir à la synapsis. La synapsis est l'association intime des chromosomes homologues par l'intermédiaire du complexe synaptonémal. Cette structure, en protégeant les intermédiaires de recombinaison, favorise l'échange de matériel génétique par recombinaison homologue entre deux chromatides d'une paire de chromosomes homologues. La décondensation de la chromatine nécessaire à cette étape induit la formation de grandes boucles de chromatine associée à une forte activité transcriptionnelle. Au cours du stade pachytène, le bouquet s'ouvre et les télomères se dispersent progressivement. Chez le male, c'est aussi à ce stade que les chromosomes sexuels se détachent des homologues autosomiques et s'incluent dans une masse dense, la vésicule sexuelle. L'inactivation des chromosomes sexuels est alors presque complète. Au début du stade diplotène, le complexe synaptonémal se désintègre tandis que les chromosomes homologues tendent à se séparer et ne sont plus retenus ensemble que par l'intermédiaire des entrecroisements (ou chiasmas). Ces chiasmas sont à l'origine d'échange de bras chromosomiques entre les chromosomes paternels et maternels et servent à créer la tension transmise au fuseau et nécessaire pour la ségrégation des homologues vers les pôles opposés. Le stade diplotène peut durer des jours ou des années selon l'organisme. L'enveloppe nucléaire disparaît pendant la diacinèse.

Après s'être alignés sur la plaque métaphasique, les deux chromosomes homologues de chaque paire sont séparés et migrent vers un pôle différent durant l'anaphase I. La télophase sépare complètement les chromosomes et produit les spermatocytes secondaires. Cette première division est dite réductionnelle car elle divise le stock chromosomique par deux en produisant des cellules haploïdes. Les spermatocytes secondaires traversent une interphase très courte, sans répliquer leur ADN. La deuxième division, dite équationnelle car le stock génétique est conservé. En effet la méiose II sépare des chromatides sœurs de chaque chromosome et donne naissance aux spermatides haploïdes.

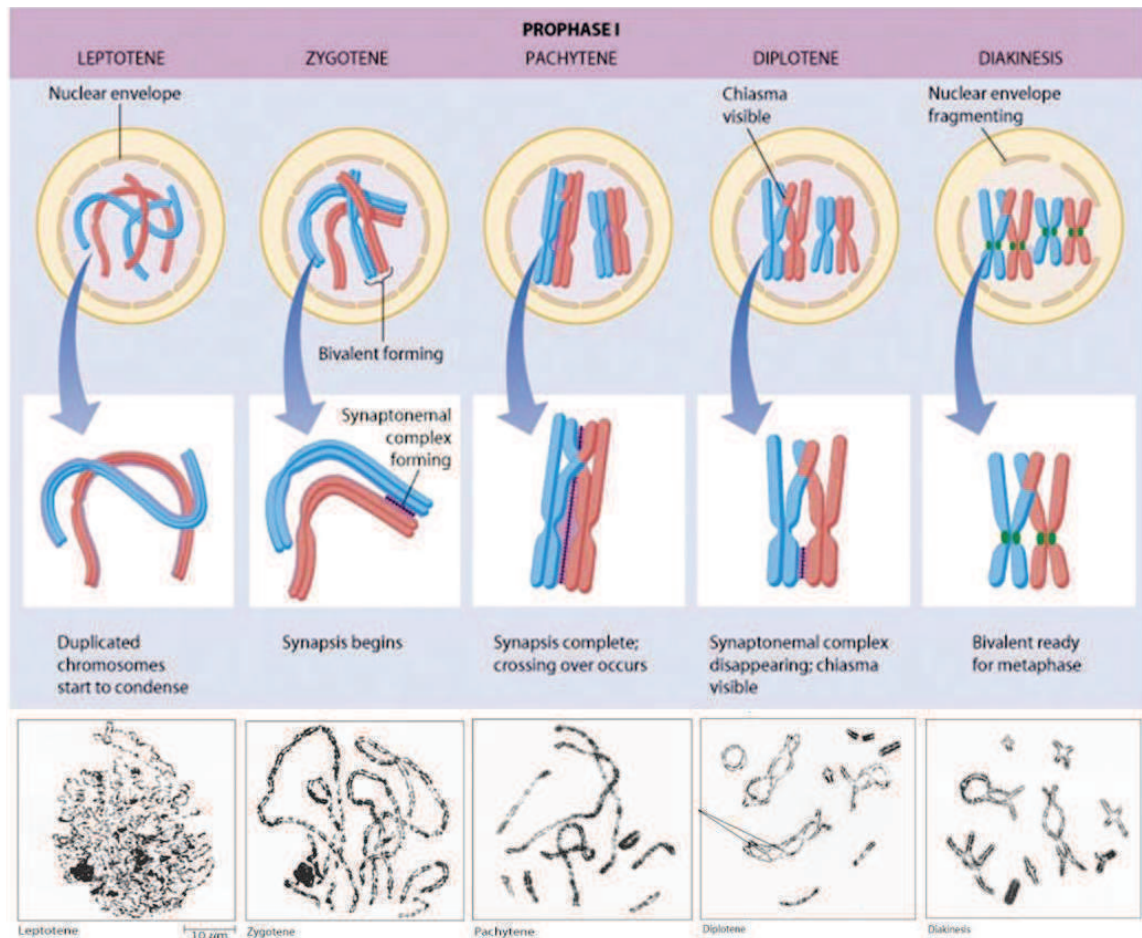


Figure n°24 : Synapsis et crossing-over au cours de la prophase I. La prophase I est subdivisée en 5 stades successifs (leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diakinèse). Au cours de la prophase I, on assiste à la synapsis et à l'échange de matériel génétique entre les chromosomes homologues. Chromosomes méiotiques au cours de la prophase I observés en microscopie électronique (d'après Pearson Education).

La synapsis et l'assemblage du complexe synaptonémal

L'architecture globale du complexe synaptonémal est hautement conservée dans les espèces à reproduction sexuée. Lorsqu'elle est mature cette structure ressemble en quelque sorte à une voie ferrée au milieu de laquelle court un troisième rail. Les deux rails extérieurs sont appelés éléments latéraux tandis que le rail central est appelé élément central. L'ADN s'étend en grande partie vers l'extérieur à partir du complexe synaptonémal sous forme de boucles (voir figure n°25A).

L'assemblage du complexe synaptonémal commence au cours du stade leptotène par l'apparition des éléments latéraux sur toute la longueur de chaque chromosome homologue. Au cours du zygotène, les éléments latéraux s'alignent en parallèle, laissant entre eux un espace d'environ 0,1 μm au milieu duquel se forme l'élément central. Les protéines Scp2 et

Syp3 des mammifères sont composantes des éléments axiaux et latéraux. Scp1 est retrouvé dans le complexe synaptonémal mature. La délétion de Scp1 chez la souris empêche la synapsis des chromosomes homologues, leur appariement est lâche et la recombinaison déclenchée ne s'achève pas. Bien que les éléments axiaux soient bien formés (de Vries et al., 2005), les cellules s'arrêtent au cours de la méiose, au stade Pachytène (voir figure n°25B). Pendant la disparition du complexe synaptonémal au cours du stade diplotène, Scp2 et Scp3 persistent sur les chromosomes. Scp3 reste localisé au niveau des centromères et pourrait jouer un rôle dans le comportement particulier des kinetochores au cours de la méiose (Kouznetsova et al., 2005). Les souris KO pour Scp3 ne forment pas de complexe synaptonémaux et les chromosomes ne forment pas de synapsis. Elles sont stériles à cause d'une apoptose massive des spermatocytes (Yuan et al., 2000).

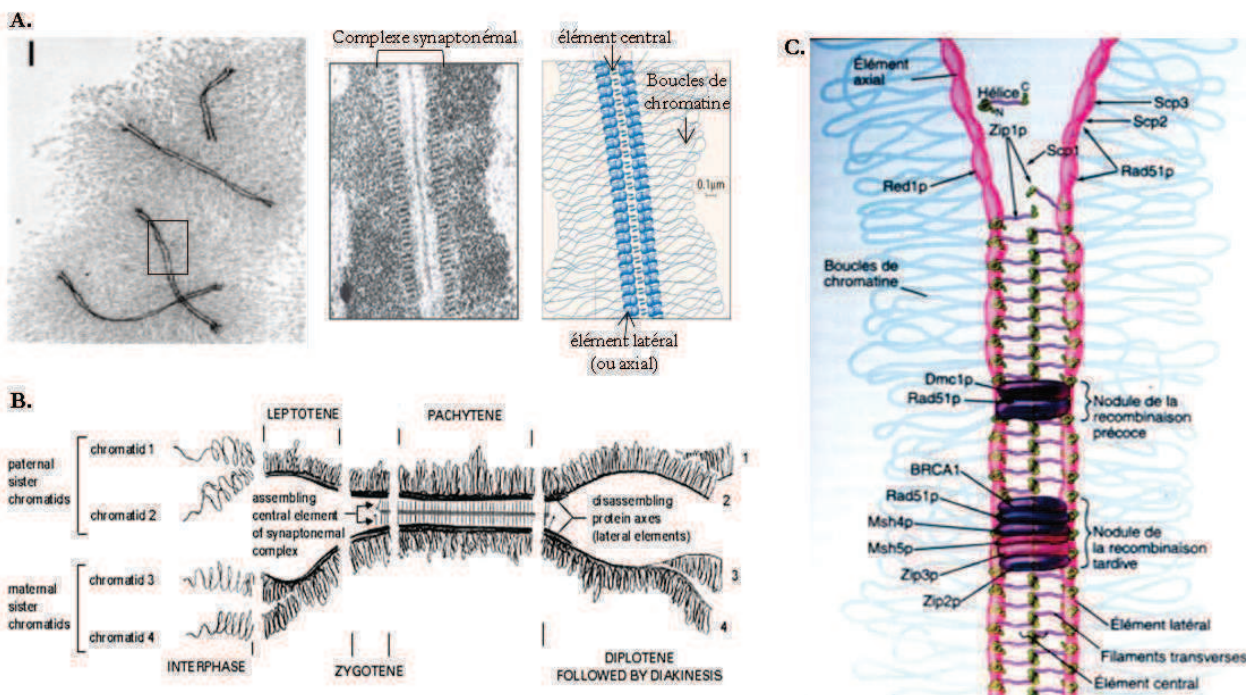


Figure n°25 : Assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I. (A) Complexe synaptonémal observé en microscopie électronique (d'après livre Biologie Cellulaire). (B) Assemblage du complexe synaptonémal au cours de la prophase I. (C) Composants du complexe synaptonémal mature (d'après livre Biologie Cellulaire).

La recombinaison méiotique

La recombinaison méiotique chez la souris, comme chez la levure et le ver, est déclenchée par le clivage des deux brins d'ADN par une enzyme spécialisée appelée Spo11. Cette enzyme appartient à la classe des ADN topoisomérases. Ces cassures doubles brins de l'ADN ne se produisent pas de façon aléatoire chez la levure, mais plutôt au niveau de certains sites privilégiés. Bien que le mécanisme de sélection des sites ne soit pas totalement élucidé, il a été établi que l'apparition de coupures, dépend à la fois de la séquence d'ADN et

de la structure de la chromatine. La production des cassures double brins est nécessaire à l'appariement normal des chromosomes homologues et à la formation de synapsis. Chez les souris KO pour Spo11, la recombinaison ne se déclenche pas et la synapsis, si elle a lieu, est aberrante car elle fait intervenir des chromosomes non homologues. De ce fait, les spermatocytes meurent par apoptose (Romanienko and Camerini-Otero, 2000).

Après la maturation des extrémités d'ADN issues des cassures doubles brins, les queues d'ADN simple brin envahissent le chromosome homologue par un processus appelé invasion de brin. Il nécessite l'intervention de Rad51 et Dmc1, homologues de la protéine RecA d'E.coli, qui catalyse l'appariement des homologues et les réactions d'échange de brin. Rad51 et Dmc1 sont retrouvées dans des structures appelées nodules de recombinaison précoce qui apparaissent au cours du leptotène ou en début de zygotène (voir figure n°25C). A cette invasion de brin succède deux systèmes alternatifs de réparation des cassures doubles brins :

- le brin d'ADN envahissant est déplacé et la réparation des cassures doubles brins engendre une conversion génétique mais sans crossing-over (voir figure n°26).
- le brin d'ADN envahissant est prolongé pour donner une double jonction de Holiday suivi d'un crossing-over et d'une recombinaison génétique. Ce processus nécessite beaucoup de protéines dont Mlh1 nécessaire à la recombinaison méiotique chez les mammifères. Les produits du crossing-over obtenus par le clivage des jonctions de Holiday au cours du pachytène, forment des structures qui peuvent être observées en microscopie électronique sur le complexe synaptonémal. Ces structures sont appelés nodules de recombinaison tardifs et sont convertis en chiasmata durant le stade diplotène.

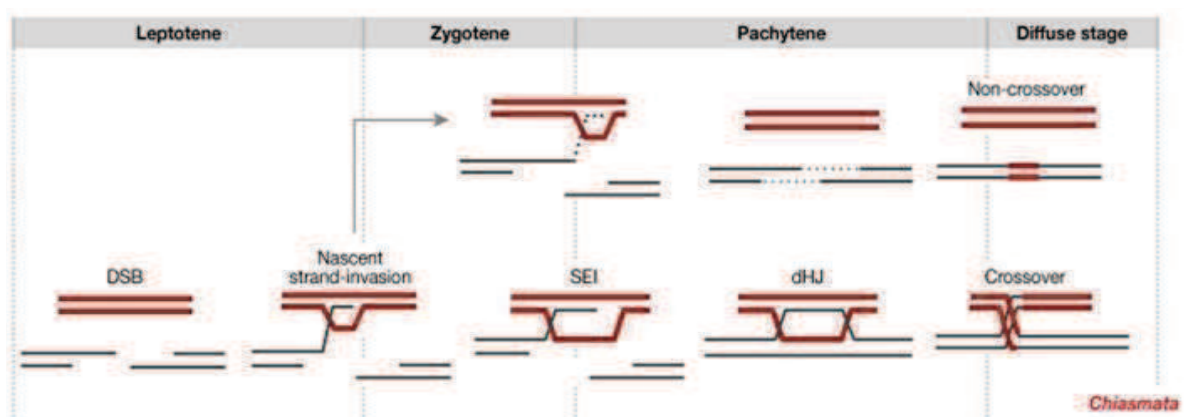


Figure n°26 : La recombinaison méiotique au cours de la prophase I. (tiré du livre Epigenetics and Human Reproduction, 2010)

- La spermiogenèse : empaquetage du génome

La métamorphose des spermatides en spermatozoïdes constitue la spermiogenèse. Elle prépare le gamète mâle à affronter un environnement hostile afin de parvenir à féconder l'ovocyte. La séquence des modifications morphologiques associées à la spermiogenèse est subdivisée en stades successifs dont le nombre varie selon les espèces (16 chez la souris et 8 chez l'homme). On définit morphologiquement les différentes spermatides au cours de la spermiogenèse : la spermatide ronde issue de la méiose, la spermatide allongée, qui entame le remodelage de la chromatine, et la spermatide condensée, en fin de spermiogenèse, qui, après maturation donnera le spermatozoïde (voir figure n°27).

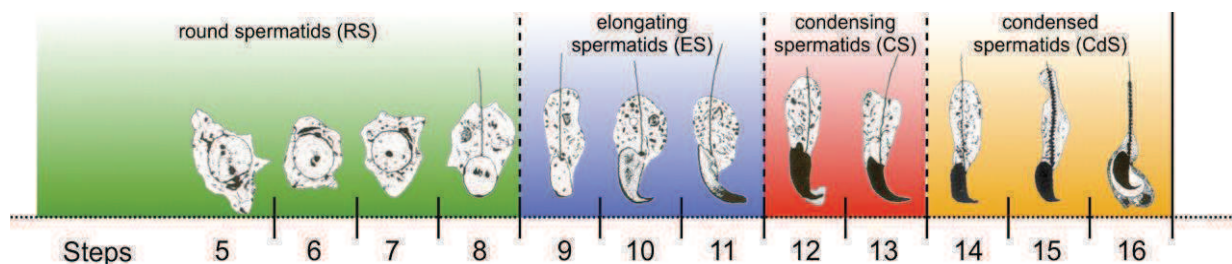


Figure n°27 : Les stades de la spermiogenèse chez la souris. La spermiogenèse est subdivisée en 16 stades successifs (spermatides de 1 à 16). Les spermatides rondes s'allongent puis se condensent progressivement au cours des phases post-méiotiques (schémas de Guylain Boissonneault).

La spermiogenèse est caractérisée par trois transformations majeures (voir figure n°28):

Le développement du système acrosomial.

La vésicule pro-acrosomiale se forme à partir de la fusion de vésicules issues de l'appareil de Golgi et s'étend sur le pôle antérieur du noyau. Puis l'acrosome se densifie et s'étend vers le pôle postérieur du noyau des spermatides allongées. L'acrosome contient des enzymes hydrolytiques telles que la hyaluronidase, neuraminidase, phosphatase, acrosine, qui interviendront lors de la fécondation de l'ovocyte.

L'assemblage des structures du flagelle.

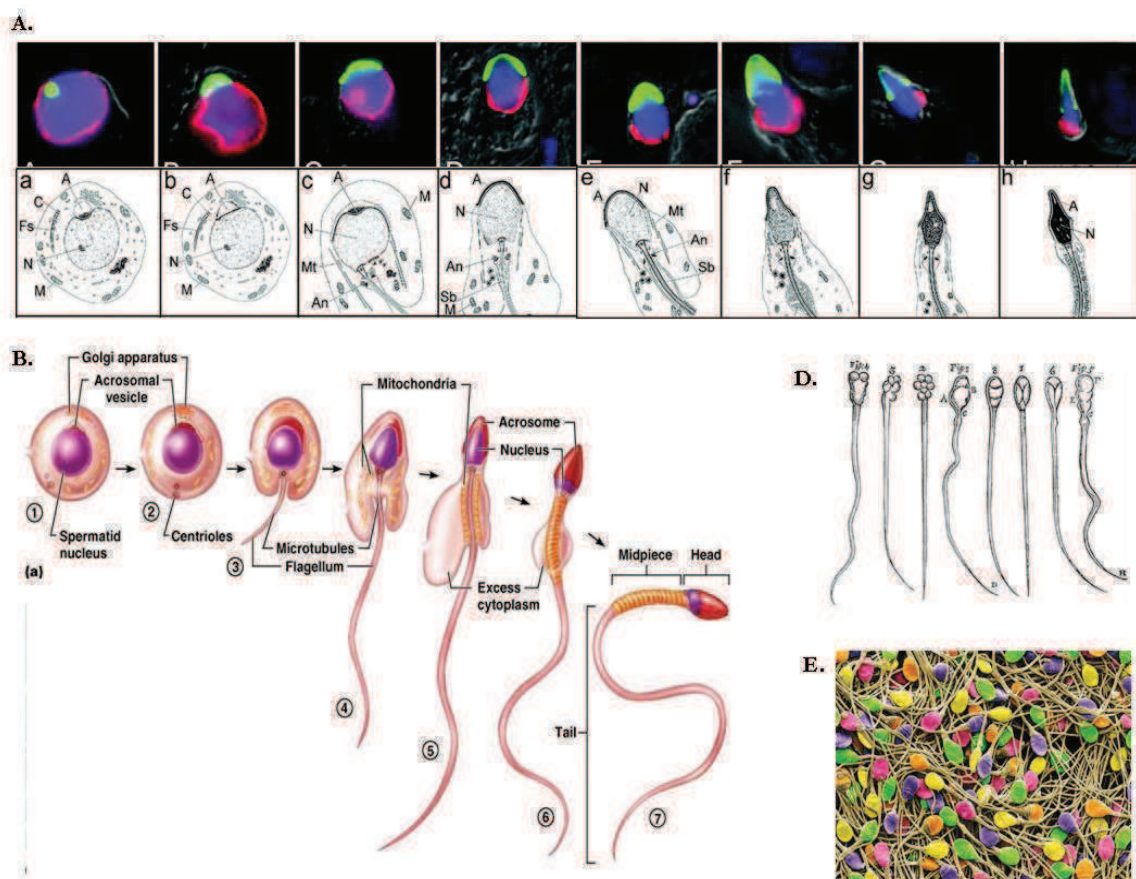
Les centrioles se positionnent au pôle postérieur du noyau et donnent rapidement naissance aux microtubules du complexe axonémal formant le flagelle. Sa région proximale, appelée pièce intermédiaire, contient un grand nombre de mitochondries qui produiront l'énergie nécessaire à la mobilisation du flagelle et au déplacement des spermatozoïdes. La maturation du flagelle est accompagnée d'une élimination de l'excès de cytoplasme, évacué sous forme de corps résiduels.

La réorganisation du noyau et de la chromatine.

Les cellules germinales subissent une réorganisation de l'intégralité de leur chromatine durant la spermiogenèse, aboutissant à un noyau extrêmement compact dont le volume représente 5% du volume moyen d'un noyau somatique (Wyrobek et al., 1976). Dans les spermatides rondes la chromatine est dispersée. Au début de l'allongement, le noyau distinctement polarisé, s'aplatit latéralement. Les remaniements structuraux de la chromatine sont associés au remplacement progressif des histones par des petites nucléoprotéines basiques spermatiques en suivant un axe antéropostérieur. Il a été proposé que des structures comme l'acrosome, la thèque périnucléaire et le réseau de microtubules de la manchette pourrait aussi intervenir dans le remodelage nucléaire (Lalli and Clermont, 1981). La manchette, formée de 200 à 1000 microtubules fixés à la membrane nucléaire et liés à la chromatine en cours de condensation, apparaît transitoirement autour de la région équatoriale du noyau des spermatides allongées/condensées et disparaît en fin de spermiogenèse (Courtens and Loir, 1981).

Cette compaction de la chromatine au cours de la spermiogenèse permet :

- de réduire la taille et la forme du noyau spermatique pour créer une structure hydrodynamique (Ostermeier et al., 2001 ; Malo et al., 2006),
- de rendre résistant le génome aux agressions par les nucléases, les rayonnements ionisants et les forces de cisaillement grâce à l'organisation autour des protamines (Rathke et al., 2010),
- de retenir une proportion d'histones au sein du spermatozoïde, qui pourrait transmettre un message épigénétique au zygote (Hammoud et al., 2009).



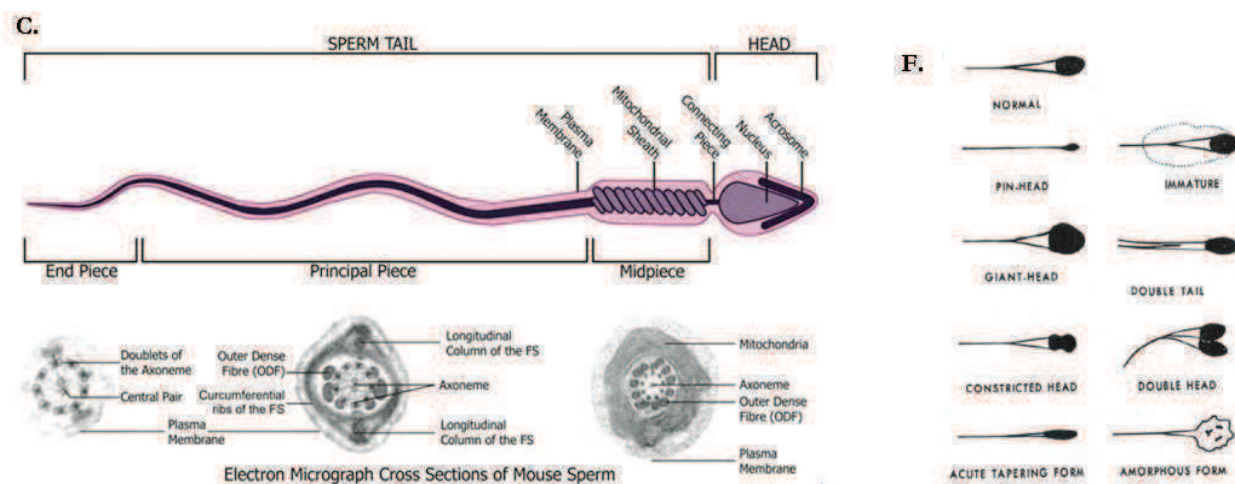


Figure n°28 : La spermiogenèse chez l'homme. (A) Compaction du noyau des spermatides, marquées en bleu (DAPI), au cours de la spermiogenèse associée à la formation de l'acrosome, marqué en vert (Westbrook et al., 2006). (B) Les différentes étapes de la spermiogenèse chez l'homme. (C) Structure du spermatozoïde et de du flagelle (www.wikipédia.com). (D) Les spermatozoïdes décrits pour la première fois par Antoni van Leeuwenhoek, en 1677 (d'après Cobb et al., 2006). (E) Spermatozoïdes humains observées en microscopie électronique à balayage, colorés par Photoshop (www.sciencephoto.com). (F) Les diverses malformations des spermatozoïdes qui peuvent conduire à l'infertilité (www.pregnancyivf.com).

- La maturation et la capacitation des spermatozoïdes

A la sortie du testicule, les spermatozoïdes ne sont pas totalement matures : ils ne sont ni mobiles, ni féconds. Ils ont besoin de plusieurs étapes de maturation. Les premières étapes s'effectuent dans l'épididyme et sont essentielles pour l'acquisition de la mobilité et du pouvoir fécondant. Du fait de la condensation extrême de son génome, le spermatozoïde ne peut plus synthétiser de protéines : ses modifications sont donc entièrement contrôlées par les cellules de l'épithélium séminal. Durant le passage dans l'épididyme, le génome continue à se condenser en une structure semi-cristalline grâce à la formation de ponts disulfures entre les protamines (Golan et al., 1996). On assiste également à un changement de structure de la membrane plasmique et les spermatozoïdes deviennent mobiles. En plus de son rôle de maturation, l'épididyme a un rôle de stockage des spermatozoïdes matures. Ainsi, un éjaculat peut contenir un nombre de spermatozoïdes plus élevé que la production journalière. Les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ne sont toujours pas féconds. En effet, lors de leurs trajets dans les voies femelles, ils vont acquérir un ensemble d'aptitudes (modification de sa mobilité, capacité à effectuer la réaction acrosomiale) au cours du processus appelé capacitation qui est nécessaire à la fécondation.

1.4. La régulation transcriptionnelle au cours de la spermatogenèse

- Le métabolisme des ARN au cours de la spermatogenèse

Chaque étape de différenciation des cellules germinales mâles est dirigée par un programme transcriptionnel précis qui contrôle l'expression de gènes spécifiques. Au cours de la spermatogenèse on assiste à plusieurs vagues de transcription, dans les spermatogonies, les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes, avant un arrêt complet de la transcription dans les spermatides allongées (Eddy et al., 1998). De nombreux mécanismes sont à l'origine de cette régulation spécifique. La perturbation de ces programmes d'expression peut avoir des effets dramatiques sur la fertilité mâle (Sassone-Corsi et al., 2005).

Le "chromatoid body"

Le contrôle transcriptionnel est intimement lié aux régulations post-transcriptionnelles des ARN. Par exemple, les ARNm des protamines sont réprimés traductionnellement dans les spermatides rondes et sont séquestrés dans le cytoplasme sous forme de particules ribonucléoprotéiques (pendant 1 semaine chez la souris), en attendant d'être traduits dans les spermatides condensées (Lee et al., 1995). Ces granules d'ARN cytoplasmique existent dans de nombreux types cellulaires et leur rôle est essentiel dans les cellules germinales, les neurones et d'autres types de cellules somatiques (Kedersha et al., 2009). Ces particules ribonucléoprotéiques contiennent de nombreuses sous-unités ribosomales, des facteurs de traduction, des hélicases, des protéines de structure et de liaison à l'ARN qui sont impliquées dans le contrôle de la localisation, la stabilité et la traduction de leur cible ARN (Sassone-Corsi et al., 2002).

Le "chromatoid body" occupe une position stratégique dans le contrôle des processus spermatogéniques via la régulation post-transcriptionnelle des transcrits (Kotaja and Sassone-Corsi et al., 2007). Cet organel particulier, qui apparaît dans le cytoplasme des spermatocytes pachytènes et des spermatides, semble impliqué dans le stockage et le métabolisme des ARN (Fujiwara et al., 1994). De nombreuses études rapportent, qu'au cours du programme de différenciation, cet organel est dynamique et, varie en taille, densité et localisation (Parvinen et al., 2005). Dans les cellules post-méiotiques, le "chromatoid body" pourrait être transféré aux spermatides voisines grâce aux ponts cytoplasmiques entre ces cellules (Ventela et al., 2003).

Dans les cellules somatiques, les petits ARNs non codants contribuent à la structure de la chromatine et à la régulation de l'expression des gènes mais aussi à l'inhibition des éléments transposables. Ces transcrits ont une taille entre 18 et 30 nucléotides, et sont classés en plusieurs familles selon leur mode de biogenèse (Moazed et al., 2009). Les principaux petits ARNs produits dans les cellules somatiques eucaryotes sont les ARN interférents (siRNA) et les micros ARN (miARN). Ces molécules d'une taille de 20-24 nucléotides sont processées par DICER, une "endoribonucléase de type III" (famille RNase III). Des grandes quantités de ces petits ARNs sont présents dans les cellules germinales mais leurs fonctions restent encore méconnues (Papaioannou and Nef, 2010).

En plus des siARNs et des miARNs, le testis exprime des piARNs (PIWI interacting ARN) (Ghildiyal and Zamore, 2009). Ces transcrits de 26-34 nucléotides sont produits indépendamment de DICER (Klattenhoff and Theurkauf, 2008). Les piARNs protègent le génome de l'expression des éléments transposables et leur fonction est essentielle à la spermatogenèse. Les piARNs sont exclusivement exprimés au cours de la spermatogenèse chez les mammifères et interagissent avec les protéines de la famille PIWI (de "P-element induced wimpy testis" chez la drosophile) : MIWI, MIWI2 et MILI (voir figure n°29). La fonction de piARN n'est pas éclaircie mais elle pourrait être reliée à celle des protéines de la famille PIWI. Les membres de cette famille sont fortement exprimés au sein du testicule et sont retrouvés au sein du "chromatoid body" où ils jouent un rôle crucial dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes au cours de la spermatogenèse (Khalil and Wahlestedt, 2008). Les fonctions des protéines PIWI ne sont pas redondantes et l'inactivation de chaque gène conduit à l'arrêt de la spermatogenèse à différents stades. Les souris KO pour MIWI ont un arrêt de la spermatogenèse au début de spermatides rondes (Deng and Lin, 2002). Les souris KO pour MIWI2 ont un blocage de la progression méiotique en prophase I, des défauts d'assemblage du complexe synaptonémal et une perte progressive des cellules germinales avec l'âge. Les souris KO pour MILI ont une spermatogenèse bloquée complètement lors de la transition zygotène / pachytène et les spermatocytes sont incapables d'assembler un complexe synaptonémal fonctionnel. Les phénotypes des souris KO pour MILI et MIWI2 peuvent être reliés à la réactivation de l'expression d'éléments transposables particuliers tels que les LINE (Long Interspersed Element) et les IAP (Intracisternal A Particle) (Kuramochi-Miyagawa et al., 2004).

La famille des protéines Tudors (TDRDs), très conservées, semble aussi impliquée dans le métabolisme des piARN. Les souris mâles délétées pour TDRD5, un composant du "chromatoid body", sont stériles avec un blocage de la spermatogenèse au stade des spermatides rondes, avec parfois un arrêt en prophase méiotique (Yabuta et al., 2011). En l'absence de Tdrd5, le "chromatoid body" est désorganisé et la localisation de ses composants, comme Tdrd1/6/7/9 et MIWI/MILI/MIWI2, est perturbée. De façon étonnante, l'injection dans des ovocytes de spermatides rondes déficientes en Tdrd5 engendre une descendance fertile, ce qui démontre que l'acquisition d'un génome haploïde fonctionnel n'est pas reliée à la fonction de TDRD5 (voir figure n°29).

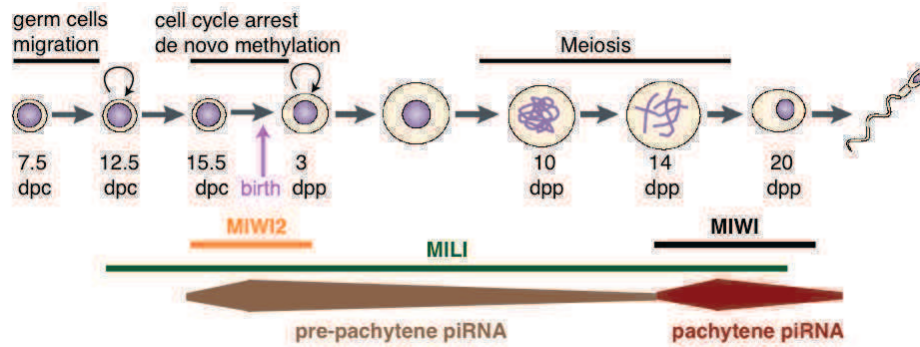


Figure n°29 : Expression des piARN au cours de la spermatogenèse. Les piARN sont exprimés tout au long de la spermatogenèse à partir des cellules souches spermatogoniales embryonnaires jusqu'aux spermatozoïdes condensés adultes (d'après Aravin et al., 2006).

- L'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels

Au cours du stade zygotène, la synapsis entre les chromosomes X et Y est initiée au niveau des régions d'homologie des chromosomes sexuels nommées régions pseudoautosomales. Pendant le stade pachytène, les chromosomes X et Y se condensent progressivement (phénomène d'hétérochromatinisation) pour former la vésicule sexuelle, transcriptionnellement inactive, et localisée en périphérie du noyau. Chez les mammifères, ce processus d'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels est connu sous le nom de MSCI (Meiotic Sex Chromosome Inactivation). On sait que des événements chromatiniens remarquables accompagnent cette inactivation transcriptionnelle comme l'incorporation de variants d'histones et les modifications post-transcriptionnelles des histones.

La MSCI est initiée par la phosphorylation de H2AX, médiée par ATR (voir figure n°30). Il s'agit de la première modification connue de la vésicule sexuelle (Turner et al., 2007). La délétion de H2AX chez la souris est caractérisée, entre autre, par une infertilité mâle liée à un défaut de formation de la vésicule sexuelle (Fernandez-Capetillo et al., 2003). Pourtant chez ces mutants les cassures doubles brins sont bien réparées et les femelles sont fertiles. Chez les souris KO pour Spo11, la phosphorylation de H2AX dans la vésicule sexuelle a bien lieu et n'est donc pas dépendante de la formation des cassures doubles brins. Chez ces souris, l'appariement des chromosomes est affecté, et l'inactivation des chromosomes sexuels est défectueuse. Cependant, certaines régions des chromosomes sexuels sont bien inactivées et forment une "pseudo vésicule sexuelle" (Mahadevaiah et al., 2008).

L'accumulation de H2AX phosphorylé (H2AXph) au niveau de la vésicule sexuelle est suivie par l'ubiquitination de H2A (H2Aub), l'arrivée de macroH2A et l'expulsion de H3.1 et H3.2 au profit de H3.3 (Reynard and Turner, 2009). Dans les cellules post-méiotiques, H2AXph, macroH2A et H2Aub disparaissent et sont remplacés par H2AZ (Greaves et al., 2006 ;

Khalil et al., 2004). Les chromosomes sexuels montrent également un profil spécifique des modifications post-traductionnelles des histones avec des marques à la fois active et répressive dont les fonctions sont encore mal comprises (Lu et al., 2010).

Il est maintenant clairement établi que l'inactivation se poursuit dans les spermatides jusqu'à l'arrêt de toute activité transcriptionnelle, au moment du remplacement des histones (Turner et al., 2006). Dans les spermatides rondes, le chromosome sexuel est à proximité du chromocentre constitué par l'agrégation de toutes les régions centromériques et péricentriques, et des séquences riches en A-T marquées intensément par le DAPI (Namekawa et al., 2006). Cette proximité des chromosomes sexuels et du chromocentre pourrait constituer en soi un mécanisme de répression à travers un effet "position", connu dans les processus d'hétérochromatinisation dans les cellules somatiques. En effet, les répresseurs transcriptionnels présents sur le chromocentre pourraient fuir sur les chromosomes sexuels adjacents et contribuer à l'inactivation des gènes, comme cela a été montré pour les régions proche de l'hétérochromatine dans les cellules somatiques (Francastel et al, 2001 ; Fournier et al., 2010). Cette situation a été observée dans les souris KO pour l'ubiquitine ligase HR6B (Baarends et al., 2007). Le KO de HR6B engendre une infertilité mâle avec des défauts méiotiques sans que la gamétogenèse femelle ne soit affectée (Roest et al., 1996). Dans ces souris la perte de la marque répressive H3K9me2 sur les chromocentres des spermatides rondes entraîne une augmentation de la marque activatrice H3K4me2 sur les chromosomes sexuels et une augmentation de la transcription des gènes concernés.

Un autre mécanisme pour réprimer les chromosomes sexuels dans les spermatides rondes pourrait impliquer des gènes spécifiques des cellules germinales mâles car situés sur le chromosome Y (Reynard and Turner, 2009). Un des meilleurs candidats parmi ces gènes est Sly (Sycp-like liée à l'Y). Ce gène multi-copie est situé sur le bras long du chromosome Y et sa baisse d'expression est associée à une activation significative des gènes portés par les chromosomes sexuels dans les spermatides (Cocquet et al., 2009). De plus, la diminution de Sly provoque une altération des marques d'hétérochromatine sur les chromosomes sexuels, notamment une diminution de la méthylation de H3K9me3 et du facteur associé HP1 (Cocquet et al., 2009). Cependant, le mécanisme moléculaire de cette répression des chromosomes sexuels demeure mystérieux.

L'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels pourrait cependant représenter un problème potentiel puisque les deux chromosomes X et Y sont connus pour porter des gènes importants requis pour le déroulement de la spermatogenèse. Par exemple, une partie des gènes portés par le chromosome X échappent à cette répression et, environ 18% sont réactivés après la méiose (Mueller et al., 2008). Par conséquent, soit ces gènes sont exprimés avant l'inactivation (Khalil et al., 2004), soit ils doivent échapper à la répression et devenir actifs dans les cellules haploïdes (Namekawa et al., 2006; Mueller et al., 2008). Une étude a d'ailleurs proposé que la crotonylation des histones, une des nouvelles modifications activatrice, pourrait jouer ce rôle (Tan et al., 2011).

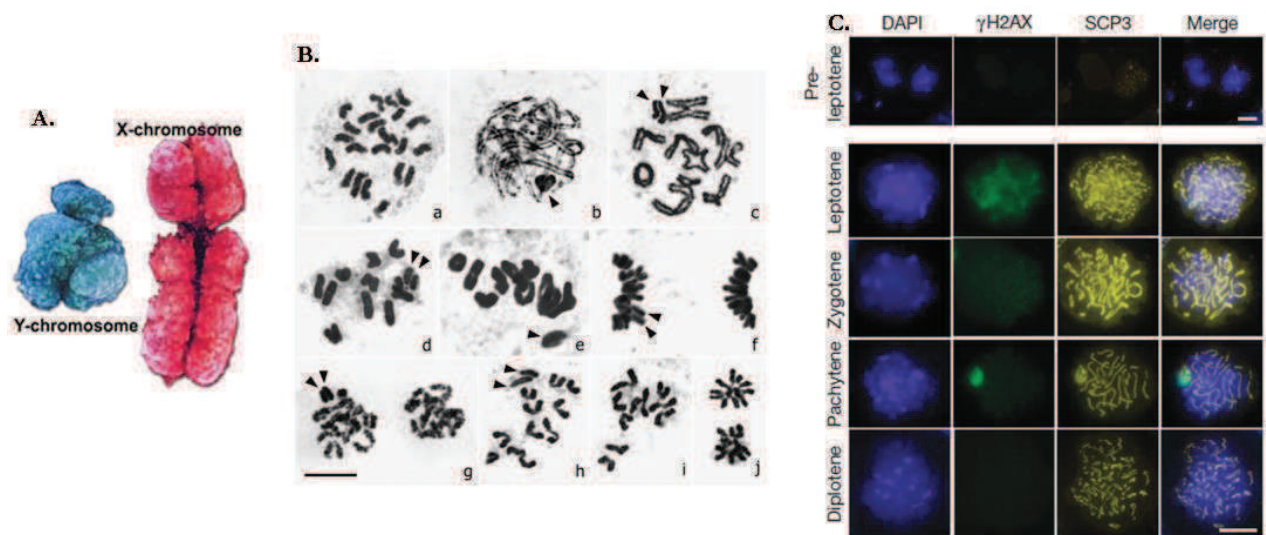


Figure n°30 : Comportement des chromosomes sexuels au cours de la méiose. (A) Chromosomes sexuels visualisés en microscopie électronique à balayage (d'après www.sciencephoto.com). (B) Comportement des chromosomes méiotiques chez l'araignée (Chemisquy et al., 2008). Les chromosomes sexuels sont indiqués avec une flèche. (C) Cellules de la prophase de méiose I (d'après Getun et al., 2010). L'apparition de la vésicule sexuelle au stade pachytène est associée à la phosphorylation de H2AX, marquée en vert. La formation des complexes synaptonémaux est indiquée grâce à la protéine des composants latéraux SCP3, en jaune. La chromatine des spermatocytes I est marquée en bleu (DAPI).

2. Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse

2.1. Méthylation de l'ADN et empreinte parentale

- L'empreinte parentale

Dans la nature, certaines espèces, animales comme végétales, se reproduisent par parthénogenèse, c'est-à-dire uniquement à partir du gamète femelle, sans participation du gamète mâle. Chez les mammifères, la parthénogenèse naturelle n'a jamais été observée, ce qui suggère que le développement naturel d'un embryon de mammifère requiert la présence des deux génomes maternel et paternel.

La technique de transfert nucléaire permet d'échanger, dans des œufs de souris fécondés, les pronoyaux mâles et femelles (ces pronoyaux correspondent aux noyaux issus du spermatozoïde et ceux issus de l'ovocyte). Cette méthode permet la production d'embryons

gynogénètes (issus de deux noyaux femelles) ou androgénètes (issus de deux noyaux mâles). Cependant, ces embryons ne se développent jamais à terme, malgré leur composition diploïde.

Cette expérience permet d'évaluer le rôle respectif des deux génomes : les gynogénètes présentent un développement presque normal de l'embryon, tandis que les annexes embryonnaires sont anormales ; la situation inverse est observée pour les androgénètes (embryon anormal, annexes normales). Les génomes mâle et femelle jouent donc un rôle symétrique et complémentaire qui rend la présence de chacun d'entre eux indispensable au développement de l'embryon (voir figure n°31A).

Ces observations révèlent également l'existence d'un phénomène de marquage des génomes parentaux, appelé empreinte génomique parentale (voir figure n°31B). Ainsi, les génomes maternel et paternel, malgré leur constitution génique identique, ne fonctionnent pas de façon équivalente, car ils sont marqués par cette empreinte épigénétique, apposée au cours de la gamétogenèse. (Barton et al., 1984 ; McGrath and Solter, 1984).

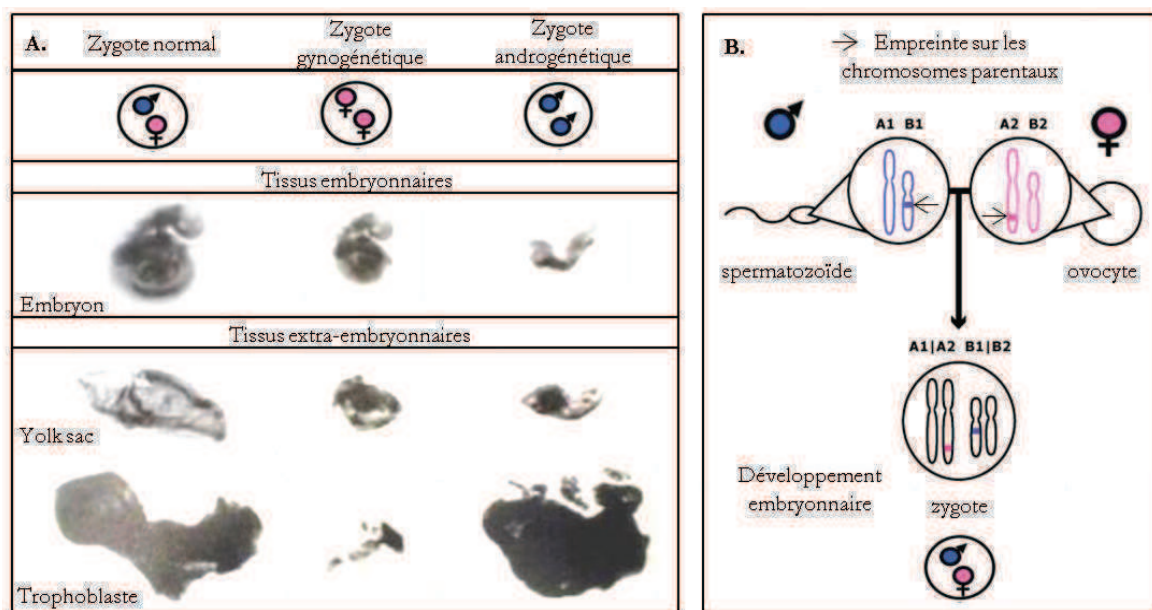


Figure n°31 : Découverte de l'empreinte parentale. Les séries de transfert de pronoyaux ont montré la contribution différente des génomes parentaux dans les programmes de développement de l'embryon. Dans ces expériences, les pronoyaux de l'ovocyte fécondé sont enlevés puis l'œuf vide est reconstitué soit avec les pronoyaux du sperme et de l'ovocyte (zygote normal), soit les deux pronoyaux male (zygote androgenetique), soit les pronoyaux femelles (zygote gynogenetique). Après transplantation intra-utérine de ces embryons, ceux ci se développent différemment en fonction de leur origine parentale (d'après Barton et al., 1984 ; McGrath and Solter, 1984).

- Mise en place de l'empreinte

L'établissement des différences épigénétiques entre les deux génomes parentaux a lieu au cours de la gamétogenèse mâle et femelle. Avant cet établissement dans la lignée germinale, les empreintes des parents sont effacées et les nouvelles empreintes sont établies en fonction du sexe du nouvel embryon. Cet effacement a lieu dans les cellules germinales primordiales (PGC, primordial germ cells) et s'effectue par la perte de méthylation de l'ADN. Les PGC sont les cellules précurseurs des cellules germinales. Elles apparaissent dans l'allantoïde de l'embryon de souris à 7,5 jours post-coït (E7.5), pour migrer ensuite vers les gonades qu'elles colonisent à partir de E10.5. L'analyse de l'état de méthylation de certains gènes soumis à l'empreinte montre une perte de méthylation des ICR ("Imprinting Control Region") à partir de E13.5. Ce processus d'effacement de l'empreinte dans les PGC est suivi d'une méthylation de novo (phase d'établissement) dans les cellules germinales mâles et femelles.

Le moment précis de la mise en place de la méthylation a été déterminé dans chaque lignée germinale. Elle intervient chez le mâle dans les gonocytes quiescents (période prénatale), pour être complète dans les spermatocytes pachytènes après la naissance (voir figure n°32). De plus, les spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotènes sont capables d'établir et de maintenir ces marques de méthylation, dans un contexte de réplication de l'ADN. Chez la femelle, la méthylation n'est complète qu'après la naissance, dans les ovocytes matures. L'importance fonctionnelle de la méthylation différentielle des génomes parentaux a également été démontrée par des expériences de transfert nucléaire, dans lesquelles des embryons parthénogénètes contenant le noyau d'un ovocyte quiescent immature et le noyau d'un ovocyte mature sont capables de survivre trois jours de plus (E13,5) qu'un même embryon contenant deux noyaux provenant de deux ovocytes matures : cela est dû à la différence d'empreinte parentale dans ces deux noyaux, l'empreinte étant complètement établie dans le noyau mature, mais pas encore dans le noyau immature.

Après la fécondation, les premières phases du développement de l'embryon sont caractérisées par une vague de déméthylation complète du génome, suivie, avant l'implantation, d'une reméthylation des gènes zygotiques au stade blastocyste. Il est frappant de constater que les méthylations spécifiques des gènes soumis à empreinte, établies pendant la gamétogenèse, sont complètement protégées de cette déméthylation, sans que l'on comprenne encore le mécanisme de cette maintenance.

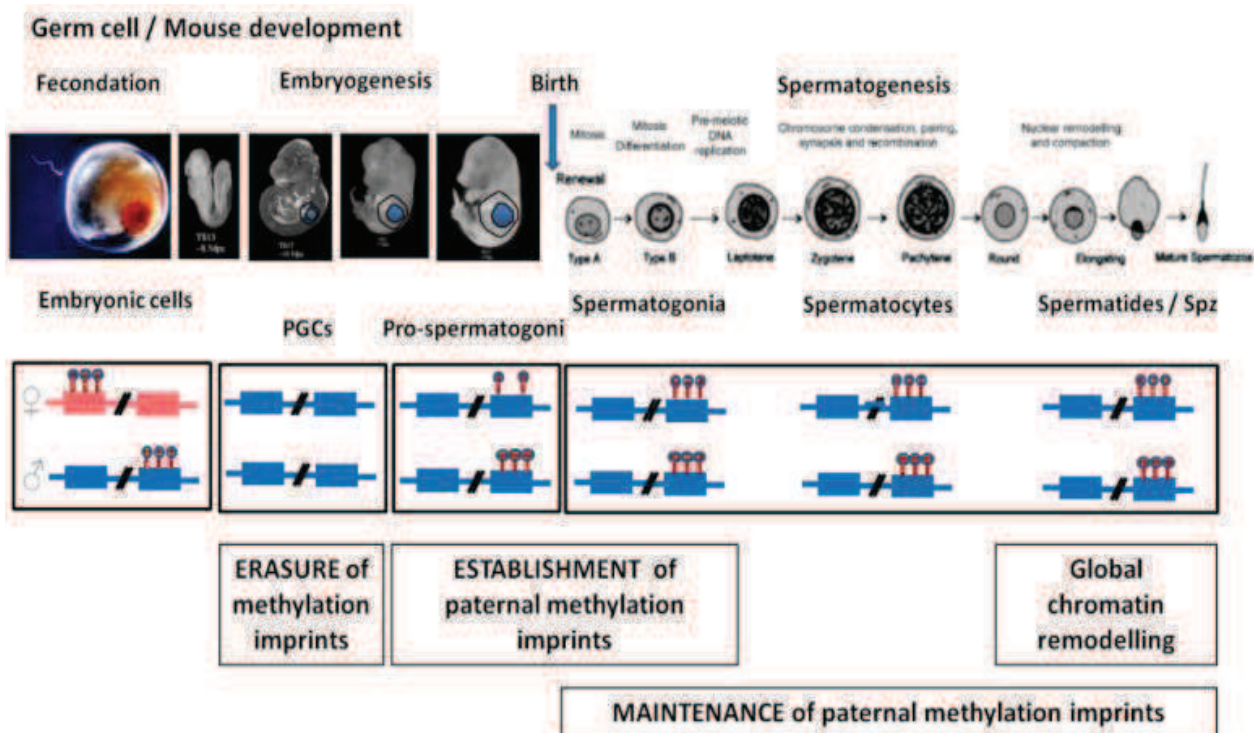


Figure n°32 : Mise en place de l’empreinte paternelle au cours de la spermatogénèse. La méthylation des locus soumis à l’empreinte a lieu après effacement des marques existantes dans les PGC. La mise en place de l’empreinte parentale débute dans les prospermatogonies embryonnaires et se poursuit à la naissance dans les spermatogonies. Enfin les marques de méthylation sont maintenues tout au long de la spermatogénèse.

2.2. Incorporation de variants d’histones au cours de la spermatogénèse

Les cellules germinales possèdent un grand nombre de variants d’histones spécifiques comparativement aux cellules somatiques (voir figure n°33). Les analyses structurales et fonctionnelles *in vitro* montrent que la majorité des nucléosomes contenant ces variants sont moins stables que ceux composés de leurs homologues canoniques.

- Les variants spécifiques des cellules germinales

Le groupe de Meistrich est le premier à isoler un variant d’histone de liaison testis-spécifique abondant, représentant 50% de la population de H1 au sein de spermatocytes pachytènes. C’est le seul variant de H1 exprimé dans les spermatocytes (au milieu du stade

pachytène) et dans les spermatides rondes (Brock et al., 1980). Les autres variants de H1 apparaissent plus tardivement dans les spermatides. H1t possède la structure classique des histones de liaison mais ne possède pas le consensus S/TPKK, un motif connu pour avoir des propriétés de condensation de l'ADN (Bharath et al., 2003). D'ailleurs, la protéine H1t isolée à partir de testicule de rat condense très peu l'ADN comparativement au H1 canonique (Khadake and Rao, 1995). La présence de H1t au stade pachytène pourrait rendre la chromatine plus lâche afin de faciliter les crossing-over et/ou la transcription en permettant l'accès de certains facteurs à la chromatine. Cependant le KO de H1t chez la souris n'engendre aucun problème de fertilité (Sirotkin et al., 1995). La perte de H1t dans ces souris est compensée par la présence d'autres variants de H1 comme H1a. Le double KO pour H1t et H1a (qui remplace H1t en son absence) est lui aussi fertile malgré quelques changements dans la stœchiométrie des histones H1 et dans l'expression des gènes (Lin et al., 2004). On peut noter qu'aucune investigation n'a été entreprise sur les mécanismes moléculaires régissant cette compensation.

Un autre variant de H1, HILS, spécifiquement exprimé dans les spermatides allongées / condensées pourrait aussi intervenir dans le remodelage de la chromatine post-méiotique (Yan et al., 2003). Chez la drosophile la délétion de son homologue entraîne une stérilité chez les mâles en empêchant l'élongation du noyau dans les spermatides (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005).

L'histone variant H1T2, exclusivement exprimée dans les cellules post-méiotiques, possède une localisation polaire, subacrosomale, au niveau de la chromatine (Martianov et al., 2005). Cette asymétrie est également observée au cours du développement des spermatides rondes au niveau de la formation de l'acrosome et du flagelle rapidement visible à des pôles opposés du noyau. La localisation antérieure (Catena et al., 2006) de H1T2 est indépendante de la formation de l'acrosome mais est perdue lorsque certains facteurs de remodelage de la chromatine sont absents (tels que les facteurs de transcription TRF2 et HMGB2 ; Catena et al., 2006). Le rôle exact de H1T2 et de sa localisation particulière n'est pas encore connu. La délétion de H1T2 chez la souris engendre des défauts de compaction de la chromatine dans les spermatides allongées et condensées qui conduit à une hypofertilité. Les rares spermatozoïdes obtenus de ces mutants sont capables de féconder un ovule après injection intra-cytoplasmique (Tanaka et al., 2005).

On peut noter que les seuls variants de H2B connus sont exprimés exclusivement dans le testicule. Par exemple, TH2B, chez l'homme, est exprimée durant la totalité de la spermatogenèse, des spermatogonies aux spermatozoïdes. TH2B est très conservé entre la souris, le rat et l'homme (Zalensky et al., 2002). TH2B et H2B ne diffèrent principalement dans leur partie N-terminale par l'addition de sites de phosphorylation (S12, T23, T34) et le repositionnement d'autres sites (S5, S6). Dans les spermatocytes pachytènes 80% de H2B est remplacé par TH2B au sein des nucléosomes et son incorporation pourrait conférer une instabilité aux nucléosomes. De plus, il a été montré chez la souris que l'association de TH2B avec les variants post-méiotiques, spécifiques du testicule, H2AL1 et H2AL2 semble particulièrement propice à augmenter cette instabilité (Govin et al., 2007). Cette instabilité pourrait s'avérer essentielle dans les étapes d'échanges des histones au cours de la spermiogenèse.

Les variants H2AL1/L2 ont été identifiés via une approche protéomique sur les spermatides de souris en cours de remplacement des histones canoniques. Ces études montrent que ces variants histones s'expriment tardivement dans les spermatides allongées et condensées, ciblent les régions centromériques et péricentromériques, et persistent au sein des spermatozoïdes matures. L'incorporation de TH2B et H2AL1/L2 au sein de ces régions structure l'ADN autour d'une particule nucléosomale plus petite (Govin et al., 2007). Ce petit fragment d'ADN peut être expliqué par la faible stabilité du dimère variant qui permet à la nucléase de digérer l'ADN au sein du nucléosome. Ainsi, cette petite structure chromatinienne pourrait refléter un état intermédiaire de la chromatine dans les spermatides élonguées condensées. L'incorporation de H2AL2 peut aussi réguler l'interaction avec les machineries de remodelage de la chromatine (Syed et al., 2009).

H2ABbd (Barr body deficient) est un variant de l'histone H2A présent exclusivement chez les mammifères (Eirin-Lopez et al., 2007). Contrairement aux autres histones qui sont phylogéniquement très conservées (Malik and Henikoff, 2003), H2A.Bbd présente des variations de séquences importantes entre les espèces (Eirin-Lopez et al., 2007). Lorsque le variant H2ABbd est surexprimé dans des cellules en cultures il est exclu du corpuscule de Barr où se localise le chromosome X inactif chez les femelles (Chadwick and Willard, 2001a). Plusieurs approches *in vitro* montrent que l'incorporation de H2ABbd déstabilise le nucléosome (Angelov et al., 2004). H2ABbd est fortement exprimé dans le testicule, comparé aux autres tissus où sa présence est à peine détectable. Ce variant est particulièrement abondant dans les phases tardives de la spermiogenèse et pourrait intervenir lors du remodelage de la chromatine (Ishibashi et al., 2010).

Enfin une fonction non chromatinienne des histones a été proposée. Des histones de cœur ont été localisées sur la thèque périnucléaire des spermatozoïdes, membrane entourant le noyau spermatique (Tovich and Oko, 2003). Un variant d'H2B, nommé SubH2Bv, serait associé à cette thèque chez les bovins, mais le rôle fonctionnel de cette association n'est pas connu (Aul and Oko, 2001). Chez la souris, son homologue serait H2BL1 mais aucune information sur une telle localisation n'a été décrite (communication personnelle Jérôme Govin).

H3 possèdent quatre variants somatiques, H3.1, H3.2, H3., CENP A et un spécifique du testicule H3t. Chez le rat, H3t est présent dans les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides rondes. H3t ne diffère de H3.1 que de 4 acides aminés qui semblent impliqué dans la déstabilisation du nucléosome formé par H3t (Tachiwana et al., 2010).

- Les variants ubiquitaires exprimés au sein du testicule

Le variant H2AZ, très conservé au cours de l'évolution, est présent chez les mammifères, le ver, les oiseaux (H2AF), la drosophile (H2Av), les oursins (H2AZ/F), différents champignons dont *Tetrahymena* (H2Ahv1) et la levure (Htz1) (Raisner et al., 2005). Chez la drosophile, le variant d'histone H2Av regroupe les fonctions attribuées à

H2AZ et H2AX. H2AZ est impliqué dans une série de fonctions différentes, voire contradictoires (Zlatanova and Thakar, 2008).

Des travaux sur colonne hydroxyapatite montrent que H2AZ est élué beaucoup plus tardivement que H2A, suggérant une stabilité plus élevée du dimère H2AZ/H2B. Ces résultats sont réversibles si H2AZ est acétylé (Thambirajah et al., 2006). L'acétylation de H2AZ est retrouvée au niveau des gènes actifs chez la levure (Santisteban et al., 2000) et chez l'homme (Bruce et al., 2005). Cette acétylation pourrait faciliter les mouvements du nucléosome au niveau des régions de transcription. De plus, H2AZ est souvent incorporé aux nucléosomes localisés au niveau des régions promotrices des gènes (Schones et al., 2008) en association avec H4K16Ac (Shia et al., 2006). D'autres travaux ont montrés que H2AZ était localisé au niveau des gènes inactifs chez la levure (Guillemette et al., 2005) et qu'il s'associait avec la protéine spécifique de l'hétérochromatine HP1 (Fan et al., 2004). Ainsi, le rôle de H2AZ semble dépendant de son contexte et, il peut avoir différentes fonctions comme la régulation de la transcription des gènes ou la formation d'hétérochromatine (Zllathanova et al., 2008).

Le complexe d'assemblage d'Htz1 a été purifié chez la levure, et sa sous unité catalytique est Swr1 (Mizuguchi et al, 2004). Le dépôt d'H2AZ est dirigé par un signal codé par l'ADN et l'acétylation de la queue amino-terminale des histones (Zhang et al., 2005). En effet, chez la levure, la protéine à double bromodomaine Bdf1, présente au sein du complexe d'assemblage, pourrait cibler l'insertion d'H2AZ en reconnaissant des marques d'acétylation spécifiques sur les histones H3 et/ou H4. Très peu d'études ont été réalisées sur le variant H2A.Z au cours de la spermatogenèse. On sait seulement qu'il est exprimé dans les spermatides rondes, où il pourrait remplacer macroH2A au niveau des chromosomes sexuels (Greaves et al., 2006).

Le variant H2AX est conservé dans l'ensemble du règne animal (Malik and Henikoff, 2003). Ce variant est phosphorylé sur la sérine 139 lors d'une cassure double brins de l'ADN. Le variant H2AX phosphorylé, appelé γ H2AX, pourrait avoir un rôle direct dans l'ouverture de la chromatine. La sérine 139 est située au niveau du site de fixation des histones de liaison et sa phosphorylation pourrait entraîner l'ouverture de la fibre de 30 nm, en chassant les histones de liaison (Li et al., 2005). γ H2AX n'est pas impliqué dans le recrutement initial des facteurs essentiels à la réparation des cassures doubles brins, mais dans leur accumulation (Celeste et al., 2003). Il est reconnu par Arp4, sous unité commune des complexes de remodelage NuA4, Ino80 et Swr1 (Downs et al., 2004). Ces complexes permettraient alors de modifier la structure de la chromatine, de telle sorte que la réparation de l'ADN puisse avoir lieu.

MacroH2A est un variant d'H2A de 42kDa, spécifique des vertébrés, contenant une région carboxy-terminale de 20 kDa appelée domaine macro (Pehrson and Fried, 1992). Le domaine macro est un motif d'environ 135 acides aminés conservé chez de nombreux organismes, y compris les procaryotes (Allen et al., 2003). Par exemple, certains membres de la famille des PARP (polyADPribose polymérase) portent un domaine macro (Aravind et al., 2001). On retrouve deux isoformes alléliques, macroH2A1 et macroH2A2, identiques à 80% (Costanzi and Pehrson, 2001). L'ARN transcrit du gène macroH2A1 subit un épissage différentiel

conduisant aux formes macroH2A1.1 et macroH2A1.2, exprimées spécifiquement dans certains tissus (Pehrson et al.). Dans les cellules somatiques de mammifères femelles, macroH2A est retrouvé au niveau du chromosome X inactif, le maintenant dans un état transcriptionnellement inactif grâce à la formation d'hétérochromatine. Généralement, macroH2A est associé dans les cellules somatiques à une répression forte de la transcription. MacroH2A1.2 est particulièrement abondant au sein des testicules murins (Nesterova et al., 2002). Au cours de la spermatogenèse, macroH2A est présent au niveau de la vésicule sexuelle et de l'hétérochromatine centromérique des spermatocytes (Hoyer-Fender et al., 2000). Cependant, aucun rôle de macroH2A dans l'inactivation de la transcription au sein de la vésicule sexuelle n'a encore été décrit.

Le variant CENP-A est impliqué dans la formation du nucléosome au niveau des centromères (Sullivan et al., 1994). Sa synthèse semble être couplée avec la réplication des centromères durant les phases S/G2 (Shelby et al., 1997). La présence de ce variant au niveau des centromères est capitale pour le recrutement des composants du kinétochore, nécessaire au bon déroulement de la mitose et donc du cycle cellulaire (Amor et al., 2004). Ce variant est indispensable à la survie cellulaire et son invalidation chez la souris entraîne des problèmes de développement embryonnaire précoce (Howman et al., 2000). Inversement, une surexpression de ce variant dans des cellules conduit à la formation de sites ectopiques de recrutement des kinétochores et d'assemblage de faisceaux de microtubules, donnant lieu à une instabilité génomique (Heun et al., 2006). Ce phénomène est fréquemment observé dans des cellules cancéreuses. Bien qu'il ne soit pas clairement établi que CENP-A soit présent au cours de la spermatogenèse, plusieurs études suggèrent sa présence. Par exemple, l'utilisation d'un anticorps reconnaissant plusieurs protéines centromériques (CREST), dont le variant CENP-A, a permis de détecter sa présence par microscopie électronique, un signal au cours de la spermatogenèse (Biggiogera et al., 1992). CENP-A pourrait structurer les centromères lors de la spermatogenèse et veiller à la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la méiose. CENP-A a également été détectée dans les spermatozoïdes bovins (Palmer et al., 1990), suggérant un rôle plus tardif au cours de la spermatogenèse.

Les histones canoniques H3.1 et H3.2 ne diffèrent que d'un seul acide aminé. H3.3 ne diffère que de 4 acides aminés. H3.3 est encodé par deux gènes, H3.3A et H3.3B, qui donnent la même protéine. H3.3B est uniquement exprimée au cours de la prophase I alors que H3.3A est exprimé durant toute la spermatogenèse des spermatogonies aux spermatides. Chez la souris, le KO de H3.3A cause des déficiences neuromusculaires sévères et une survie néonatale réduite ce qui empêche la caractérisation du rôle de ce variant au cours de la spermatogenèse murine (Couldrey et al., 1999). Chez la drosophile, le KO de H3.3 engendre une stérilité mâle avec des anomalies méiotiques et post-méiotiques. Chez la souris, H3.3 est incorporé au niveau des chromosomes sexuels lors de leur inactivation transcriptionnelle dans les spermatocytes pachytènes. Ce processus est également associé au recrutement du variant macroH2A. Après la méiose, les chromosomes sexuels conservent le variant H3.3, mais macroH2A est remplacé par H2AZ. Il est très probable que la combinaison de H3.3 et de H2AZ au sein de la chromatine sexuelle des spermatides pourrait déstabiliser le nucléosome (Jin and Felsenfeld, 2007).

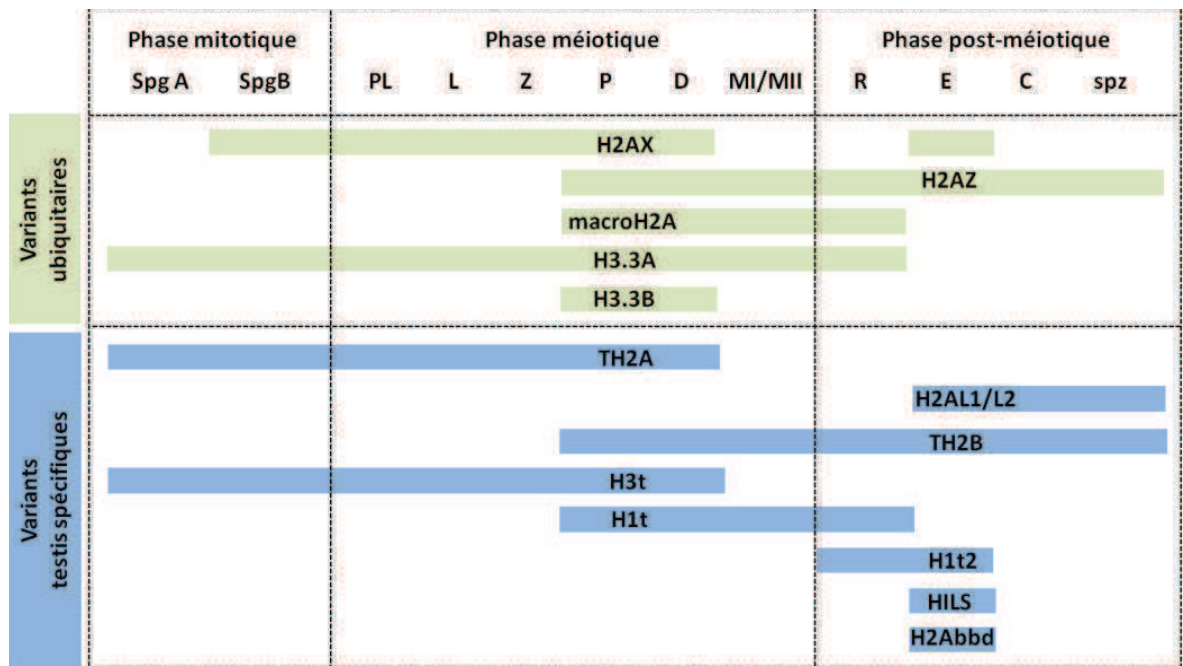


Figure n°33 : Incorporation de variants d'histones au cours de la spermatogenèse. On distingue les variants d'expression ubiquitaires exprimés au cours de la spermatogenèse et les variants spécifiquement exprimés dans les cellules germinales. Phase mitotique : spermatogonies de type A (spgA) et B (spgB). Phase méiotique : spermatocytes I pré-leptotène (PL), leptotène (L), zygotène (Z), pachytène (P) et en division (MI/MII). Spermiogenèse : spermatide ronde (R), allongée (E), condensée (C) et spermatozoïde (spz).

2.3. Dynamique des MPTh au cours de la spermatogenèse

- L'acétylation

Au cours de la spermatogenèse, les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont acétylées dans les spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotène (Meistrich et al., 1992 ; Hazzouri et al., 2000). Le rôle de cette acétylation n'est pas éclairci mais l'acétylation des histones au sein des spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotène peut être liée à leur incorporation à la chromatine dans un contexte réplcatif et/ou lié a une importante activité transcriptionnelle (Verreault et al., 1996).

Au cours de la spermiogenèse, on assiste à une acétylation massive des histones de cœur dans les spermatides élonguées de nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux (Govin et al., 2004 ; voir figure n°34). La dégradation générale des HDAC de classe I serait responsable de cette vague d'acétylation, déséquilibrant la dynamique d'acétylation des histones et renforçant

l'action des HAT (Caron et al., 2003). Chez la souris, l'acétylation d'H4 est détectée dans l'intégralité du noyau des spermatides au début de leur allongement puis disparaît au cours de la condensation des spermatides, excepté au niveau des zones d'hétérochromatine (Hazzouri et al., 2000). On retrouve d'ailleurs les marques H4K8ac et H4K12ac au sein des zones d'hétérochromatine dans les spermatides allongées et condensées mais aussi dans les spermatozoïdes matures (van der Heijden et al., 2006).

Les protéines de transition apparaissent et remplacent les histones ce qui élimine progressivement le signal d'acétylation, selon un axe antéro-postérieur. Cette acétylation massive des histones n'est reliée à aucune activité transcriptionnelle ou répllicative. Ces données suggèrent que l'acétylation des histones lors de la spermiogenèse est probablement liée à leur remplacement. Cependant, aucune donnée n'existe sur l'enlèvement des histones hyperacétylées. Chez l'homme et la souris, cette hyperacétylation semble essentielle et sa perturbation est associée à des défauts de la spermatogenèse (Sonnack et al., 2002 ; Fenic et al., 2004).

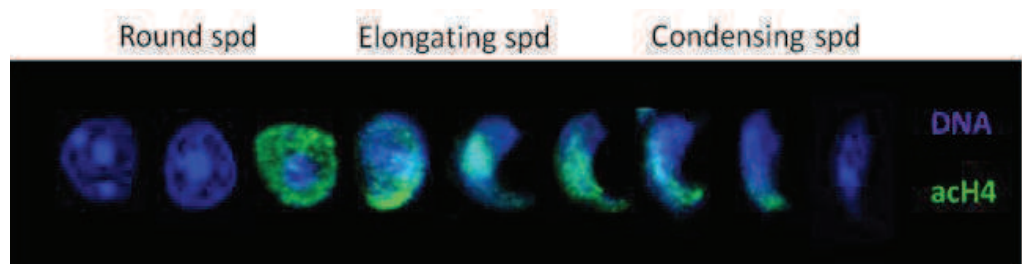


Figure n°34 : La vague d'acétylation au cours de la spermiogenèse. L'acétylation des histones envahit le noyau des spermatides allongés puis persiste au sein de la zone d'hétérochromatine au cours de la condensation des spermatides.

- La méthylation

L'étude de souris KO pour des gènes codant pour ces enzymes de modification des histones a permis de mieux comprendre le rôle essentiel de ces modifications épigénétiques. Par exemple, plusieurs KMT ont un rôle crucial au cours de la méiose : KMT 1a/1b, KMT 1c et prdm9. KMT1a (suv39h1) et KMT1b (suv39h2) sont des H3K9me1/2 triméthyltransférases (voir figure n°35).

KMT1a est exprimée ubiquitairement dans tous les tissus adultes alors que KMT1b est très abondante au sein du testicule, où elle localise dans le noyau des cellules de Sertoli et dans l'hétérochromatine des spermatocytes et des cellules rondes. Alors que les souris simple KO pour l'une de ces KMT sont toujours fertiles, les souris double KO pour KMT1a/b présentent de sévères défauts de spermatogenèse. En effet, l'entrée en prophase I est

retardée, la synapsis est affectée et les spermatocytes pachytènes partent en apoptose. KMT1a/b pourrait définir les structures chromatinienne requises pour l'appariement et la séparation des chromosomes méiotiques (Peters et al., 2001).

KMT1c (G9a) est une H3K9 mono- et di- méthyltransférase. Kmt1c localise au niveau de l'euchromatine des spermatogonies et des spermatocytes. Le KO de KMT1c dans les cellules germinales engendre l'infertilité des souris mâles. La spermatogenèse est arrêtée dans les pachytènes précoces qui présentent un défaut de synapsis. La perte de Kmt1c pourrait altérer les modifications de la chromatine et déréguler la transcription de facteurs importants.

Prdm9 (Meisetz) est une H3K4 tri-méthyltransférase cruciale pour la gamétogenèse des deux sexes (Mihola et al., 2009) et les souris KO pour Prdm9 sont stériles. Les spermatocytes et les ovocytes sont incapables de réparer les cassures double brins de l'ADN au stade pachytène et partent en apoptose avant la fin de la méiose. Prdm9 pourrait être impliquée dans la définition des sites d'initiation de la recombinaison (Baudat et al., 2010) via différents domaines de cette protéine.

Chez la souris, les sites d'initiation actifs de la recombinaison méiotique (ou hots-spots) sont enrichis des modifications H3K4me3, H3K4me2 et H3K9ac1 et dépourvus des marques H3K9me3 et H3K27me3. Généralement on retrouve ces marques au niveau des promoteurs de gènes activement transcrits. Cependant les promoteurs ne semblent pas être des sites d'initiation de la recombinaison, et ces sites ne semblent pas forcément être activement transcrits chez la souris. Ainsi une régulation encore inconnue semble différencier ces régions. Ces données suggèrent une implication directe du code histone dans la définition des sites d'initiation de la recombinaison, comme cela a été démontré chez la levure (Borde et al., 2009).

L'enlèvement de groupements méthyles sur les histones par les KDM est essentiel pour la spermatogenèse. KDM1 (Lsd1) enlève les méthyles des marques activatrices H3K4me2/3 et répressive H3K9me2/3. Son expression est élevée dans les spermatogonies et les spermatocytes pré-leptotènes et décroît rapidement dans les spermatocytes pachytènes (Godmann et al., 2007). Le KO est létal au stade embryonnaire.

KDM3a (Jmjd1a) déméthyle spécifiquement H3K9me1/2. Chez le rat, Kdm3a apparait exclusivement exprimé au sein du testicule. Le KO chez la souris engendre des défauts de condensation de la chromatine post-méiotique. En effet, Kdm3 réduit la transcription de TP1 et Prm1, essentielles pour le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse (Okada et al., 2007).

- La phosphorylation

Les sérines 10 et 28 de l'histone H3, très conservées au sein de la famille H3, sont phosphorylées par les kinases Aurora lors de la condensation des chromosomes mitotiques. Aurora B est particulièrement abondante au sein du testicule et son expression est finement

régulée au cours de la spermatogenèse. L'expression d'une forme inactive de Aurora B dans les spermatocytes provoque leur apoptose et un blocage de la spermatogenèse. Aurora C est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales mâles. Le KO de Aurora C engendre la stérilité des souris mâles liée à des défauts de réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse.

La sérine 139 d'H2A.X est une cible des PI3 kinases, comprenant DNA-PK (Park et al., 2003), ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Burma et al., 2001) et ATR (Shroff et al., 2004) au sein des cellules somatiques. L'invalidation d'H2AX (Celeste et al., 2002), tout comme l'invalidation d'ATM (Barlow et al., 1998), entraîne, entre autre, un arrêt de la spermatogenèse. ATM serait la kinase d'H2A.X au sein de la chromatine autosomale, alors qu'ATR phosphoryle spécifiquement H2A.X au niveau de la vésicule sexuelle des spermatocytes (Bellani et al., 2005).

D'autres résidus des histones peuvent être phosphorylés comme la sérine 1 de H4 (H4S1Ph), lors de la sporulation chez la levure et, au cours de la spermatogénèse chez la drosophile et la souris. La distribution de H4S1 phosphorylée est différente de celle de H3S10 phosphorylée. En effet, chez la levure et la drosophile, la phosphorylation de H4S1 apparaît dans les stades tardifs de la différenciation et chez la souris, on la retrouve spécifiquement dans les spermatides rondes. A l'inverse, la phosphorylation de H3S10 est indétectable dans ces cellules et apparaît exclusivement dans les cellules en division. Cette modification pourrait avoir une influence sur la compaction de la chromatine au cours de la sporulation. (Krishnamoorthy et al., 2006).

- L'ubiquitination

Au cours de la spermatogenèse, la mono-ubiquitination de H2A ou H2B est importante pour le remodelage de la chromatine. Le KO de l'ubiquitine ligase mHR6B chez la souris engendre spécifiquement une infertilité mâle à cause de défauts méiotiques et post-méiotiques (Roest et al., 1996). Au cours de la méiose Hr6b pourrait être requis pour la dynamique de la recombinaison méiotique (Baarends et al., 2003). Le KO de l'ubiquitine ligase Rnf8 chez la souris entraîne également une infertilité mâle liée à des défauts d'acétylation et d'enlèvement des histones (Lu et al., 2010).

- La polyADPriboseylation

La régulation de la poly-(ADPribose)ylation est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. Le KO de l'enzyme PARP2 engendre la stérilité chez la souris mâles qui présente des défauts méiotiques et post méiotiques (Dantzer et al., 2006). Ces souris ont des défauts d'inactivation des chromosomes sexuels et des problèmes lors du remodelage post-méiotique de la chromatine. PARP1 et PARP2 pourraient intervenir dans l'échange des

histones en régulant la réorganisation de la chromatine en coopération avec l'ADN topoisomérase II (Meyer-Ficca et al., 2011).

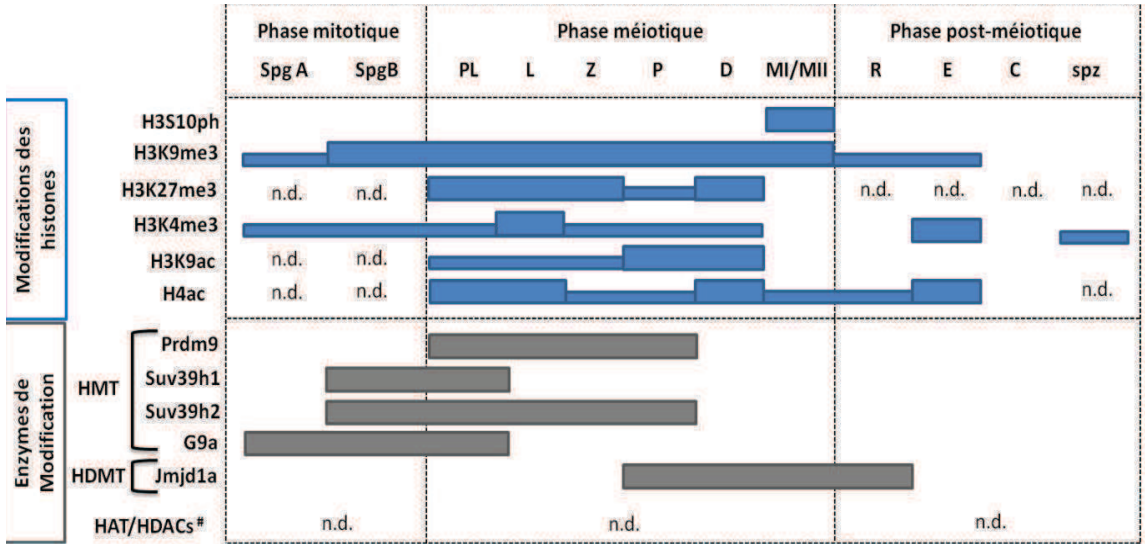


Figure n°35 : Les MPTh et leurs enzymes de modification au cours de la spermatogenèse.

2.4. Remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines

Dans de nombreuses espèces les histones sont remplacées par des petites nucléoprotéines basiques spermatiques au cours de la spermatogenèse. Chez les mammifères, l'enlèvement des histones se produit au moment de l'allongement des spermatides et coïncide avec l'incorporation des protéines de transition (TPs). Ces protéines seront à terme remplacées par les protamines (Prms ; voir figure n°36). Chez certaines espèces d'oiseaux, de reptiles et de poissons, les histones sont directement remplacées par les protamines.

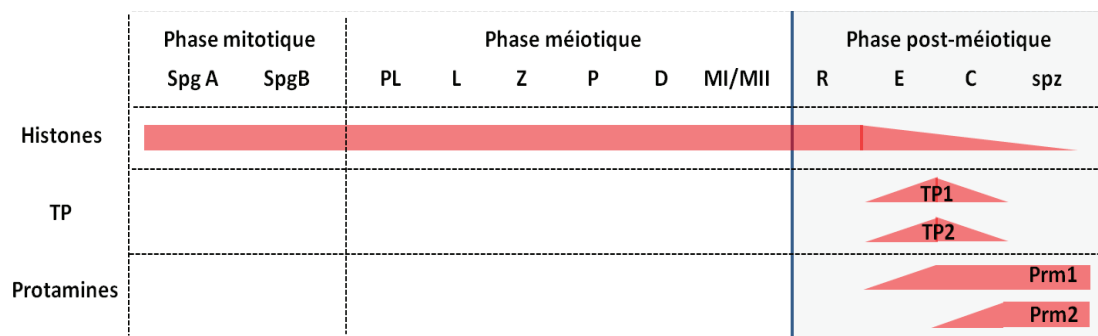


Figure n°36 : Remplacement des histones par les protéines de transition (TP) et les protamines au cours de la spermiogenèse.

- Les protéines de transition (TP)

Quatre protéines de transition sont décrites chez les mammifères, appelées TP1, TP2, TP3 et TP4. TP1 et TP2 représentent à elles seules respectivement 50% et 40% des protéines nucléaires des spermatides (Meistrich et al., 2003). TP1 est une protéine de 6,2 kDa et TP2 de 13 kDa. Chez la souris, les gènes codant pour TP1 et TP2 sont transcrits dans les spermatides rondes (au stade 6-7), les ARN messagers correspondant sont stockés dans le cytoplasme sous la forme de ribonucléoprotéines avant d'être traduits dans les spermatides en condensation (aux stades 11-13 ; Mali et al., 1989 ; Yelick et al., 1989 ; Platz et al., 1977).

Les TPs sont des protéines extrêmement basiques qui possèdent de nombreuses lysines et arginines (voir figure n°37). De nombreux groupes ont montré que les TPs (TP1 et TP2) sont capables de condenser l'ADN *in vitro*. Par exemple, TP2 condense l'ADN plus efficacement que TP1 et se lie préférentiellement aux séquences d'ADN riches en GC grâce à des domaines en doigts de zinc (Kundu and Rao, 1995). Les évolutions technologiques ont permis de montrer *in vitro* que TP1 et TP2 condensent en fait l'ADN aussi efficacement que Prm1 et Prm2 (Balhorn et al., 2000 ; Brewer et al., 2002 ; Brewer et al., 2003). Il a aussi été montré que la partie carboxy-terminale de TP2 est responsable de son activité de condensation de l'ADN indépendamment de la présence de zinc. Les modifications post traductionnelles de TP2, par phosphorylation et/ou acétylation, pourraient modifier sa capacité à condenser l'ADN. Par exemple, chez le rat, l'acétylation de TP2 par p300 altère sa propriété de condensation de l'ADN et son interaction avec la chaperonne d'histone NPM3 (Pradeepa et al., 2009).

Les souris homozygotes invalidées pour TP1 ou TP2 sont fertiles, les testicules sont normaux et le processus de remplacement des histones par les protamines ne semble pas affecté (Adham et al., 2001 ; Yu et al., 2000 ; Zhao et al., 2001). La fertilité des souris KO pour TP1 est réduite de moitié, et les portées des souris KO pour TP2 sont plus petites et la

maturation par protéolyse de la protamine 2 est affectée en absence de TP1 ou TP2. L'obtention de lignées de souris double KO pour TP1 et TP2 a permis de compenser un effet redondant des deux protéines (Shirley et al., 2004 ; Zhao et al., 2004). Les souris mâles doubles KO pour TP1 et TP2 sont stériles. Les spermatides matures sont retenues dans le testicule et peu de spermatozoïdes sont retrouvés au sein des épидидymes. Un tiers de spermatides condensées ont des malformations (tête, implantation et structuration du flagelle) et les spermatozoïdes ne sont pas féconds *in vitro*.

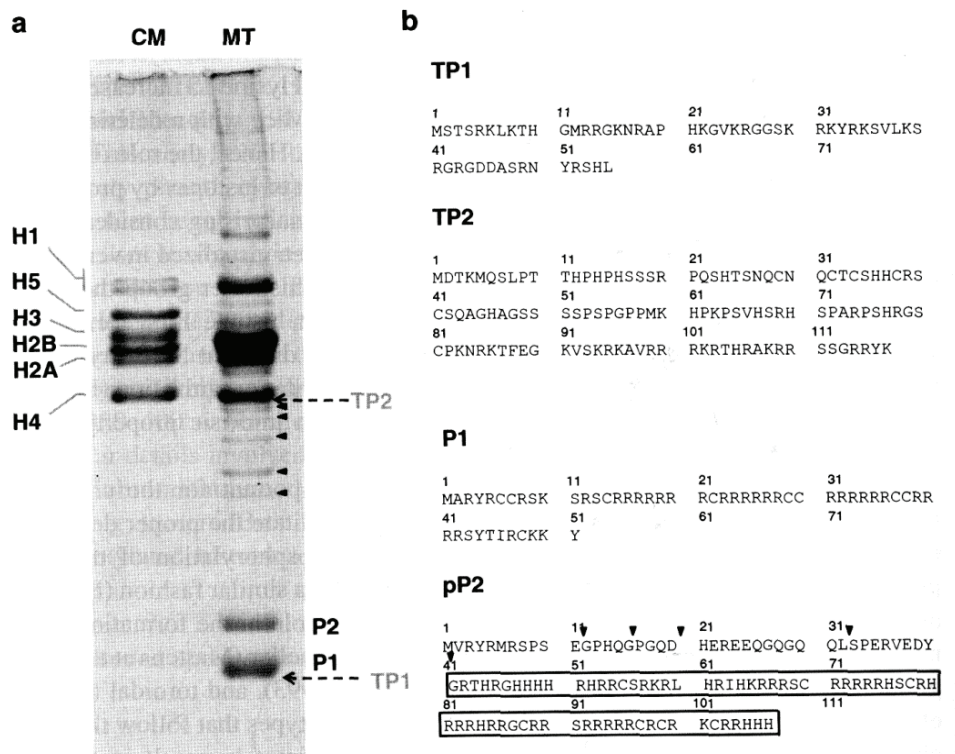


Figure n°37 : Les protéines de transition et les protamines chez la souris. (d'après le livre Epigenetics and Human Reproduction, 2010) (a) Comparaison des profils électrophorétiques d'extraits acides de protéines de testicule de souris (MT) en comparaison avec des histones d'érythrocytes de poulet (CM). Les flèches indiquent les différentes formes clivées du précurseur de protamine 2 (b) Structure primaire des protéines de transition et des protamines de souris. Les flèches indiquent les différents sites de clivages du précurseur de protamine 2 (Debarle et al., 1995).

- Les protamines

Le terme de protamine a été utilisé en premier par Miescher en 1874 en référence à une base organique extraite à partir de noyaux de sperme de saumon. Des études phylogénétiques suggèrent que les protamines dérivent des histones de liaison (Lewis et al.,

2004 ; Oliva and Dixon, 1991). Les histones de liaison sont enrichies en résidus lysines alors que les protamines sont très riches en résidus arginines. Les arginines des protamines pourraient faciliter leur liaison à l'ADN. En effet, les liaisons hydrogènes entre l'ADN et les protéines basiques seraient plus favorables avec les deux groupements amines des arginines qu'avec celui des lysines (Pogany et al., 1981).

La plupart des mammifères possède une seule protamine de 50 acides aminés, appelée Prm1. Cette protéine est constituée de trois domaines structuraux : un domaine central, riche en arginine, capable de se lier à l'ADN, et deux extrémités terminales composées d'une petite séquence peptidique contenant des résidus cystéines. Après liaison de Prm1 sur l'ADN, les groupes thiol des cystéines sont oxydés pour former des ponts disulfures entre les protamines. Ces liaisons covalentes permettent de relier les protamines voisines entre elles et stabilisent la chromatine au cours de la maturation des spermatozoïdes. Les ponts disulfures se forment progressivement au cours de la maturation des spermatozoïdes. Il commence du côté antérieur des spermatides condensées du testicule puis envahissent comme une vague la face postérieure au cours du transit épидидymaire des spermatozoïdes. Certains mammifères, dont la souris et l'homme, possèdent une deuxième protamine, Prm2. La protamine 2 est synthétisée sous forme de précurseur de 106 acides aminés. Après son incorporation à l'ADN, Prm2 subit six clivages protéolytiques successifs qui vont générer la forme mature de Prm2 de 63 acides aminés (voir figure n°37). Au cours de cette maturation, des ponts disulfures s'établissent entre les protamines et empêchent leur dissociation de l'ADN jusqu'au moment où ces liaisons seront réduites après l'entrée du spermatozoïde dans l'œuf.

Les protamines sont cruciales pour la spermiogenèse, l'invalidation d'une copie du gène de Prm1 ou de Prm2 empêche la production normale de spermatozoïdes (Cho et al., 2001). La diminution du niveau d'expression de l'une ou l'autre des protamines induit des défauts de formation du noyau spermatique et perturbe la maturation de Prm2. Bien que la proportion relative entre Prm1 et Prm2 soit très variable entre les différentes espèces (1:2 chez la souris, 1:1 chez l'homme, et 2:1 chez le hamster), le rapport entre la masse totale de protamines et la masse totale d'ADN est presque identique entre les différents mammifères (Balhorn et al, 1988 ; Bench et al, 1996).

Chez la souris, la transcription des gènes codants pour Prm1 et Prm2 débute dans les spermatides rondes (au stade 7) de façon concomitante à celle des gènes des protéines de transition (Mali et al., 1989). Puis, Prm1 et Prm2 sont ensuite traduites dans les spermatides condensées (respectivement aux stades 12-14 et 14-16) (Balhorn et al., 1984 ; Biggiogera et al., 1992). L'expression de ces gènes est régulée de manière temporelle très précise. Par exemple, la sur-expression de Prm1 au moment où celle-ci doit normalement être synthétisée n'a pas d'incidence sur la spermiogenèse (Peschon et al, 1987 ; Zambrowicz et al, 1993). A l'inverse, la traduction prématurée de l'ARNm de Prm1 entraîne une condensation précoce de la chromatine et une stérilité des souris mâles (Lee et al., 1995). La mise en place stade-spécifique, de programmes d'expression et de régulation post-transcriptionnelle, est d'une importance capitale pour l'échange correcte des histones et la différenciation complète des spermatides rondes en spermatozoïdes matures.

La phosphorylation des protamines semble essentielle à leur fonctionnement. En effet, une mutation de la protéine kinase Camk4, qui phosphoryle Prm2, induit un défaut de spermatogénèse et une stérilité mâle (Wu et al., 2000). Le remplacement des protéines de transition par les protamines induit d'importants changements de conformation de la chromatine. Prm1 et Prm2 s'attachent respectivement à une séquence d'ADN d'environ 10 et 15 paires de bases. Ces protamines s'enroulent sur l'hélice d'ADN au niveau du sillon mineur, avec une protamine par tour d'hélice (Ward et al., 1993). L'interaction électrostatique entre les groupes guanidium des résidus arginine et des groupes phosphates de chaque brin d'ADN contribue à la grande stabilité de ce complexe protamine / ADN.

- Mécanisme d'échange des histones

L'échange des histones par les protamines permet l'organisation compacte de la chromatine au sein des spermatozoïdes. La chromatine, d'abord sous forme nucléosomale, se réorganise progressivement autour des protamines pour former une nouvelle structure nucléoprotéique, arrangée en "toroïdes". Bien que la spermiogénèse soit un processus commun à plusieurs espèces, on ne connaît pas encore les bases moléculaires qui régissent cette réorganisation de la chromatine. Ce remplacement des histones pourrait être le résultat de plusieurs mécanismes conjoints (voir figure n°38). Par exemple, au cours de la spermiogénèse, on assiste à une acétylation massive des histones et à l'incorporation de nombreux variants d'histones. Ces événements pourraient contribuer à déstabiliser le nucléosome et faciliter l'échange des histones par des protéines extrêmement basiques comme les protamines. D'autre part, en considérant le code histone et les facteurs de lecture correspondant, il est possible que l'acétylation fonctionne comme un signal permettant le recrutement de machineries de remodelage de la chromatine. En effet, les modifications post-traductionnelles des histones permettent à des facteurs protéiques de les reconnaître, grâce à leurs domaines spécifiques, comme le "bromodomaine" qui interagit avec les histones acétylées. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la protéine double bromodomaine de la famille BET, BRDT, spécifiquement exprimée dans la lignée germinale mâle et capable d'induire une réorganisation spectaculaire de la chromatine hyperacétylée (Pivot-Pajot et al., 2003).

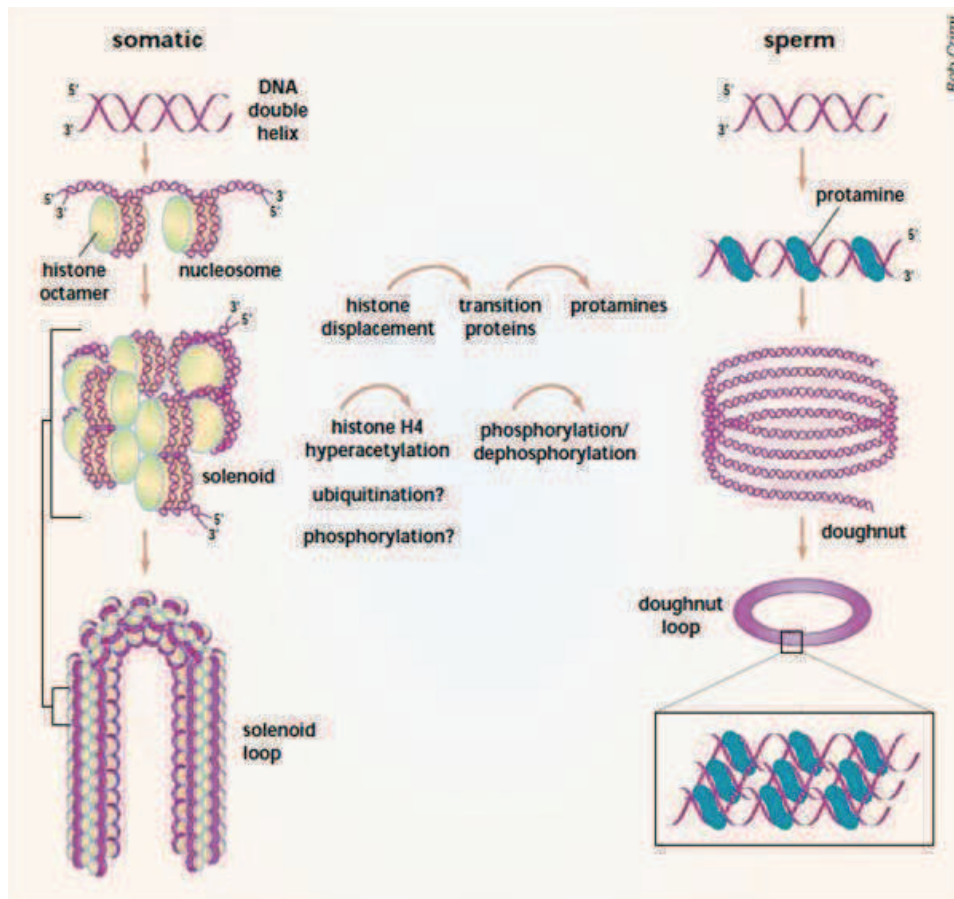


Figure n°38 : Réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse. (d'après Ward et al., 1994) Comparaison de l'organisation de la chromatine dans les cellules somatiques et dans les spermatozoïdes. Dans les cellules somatiques, l'ADN s'enroule 1,7 fois autour de l'octamère d'histones pour former le nucléosome. Les nucléosomes forment ensuite la fibre de 30nm qui s'organise en boucles attachées à la matrice nucléaire. Dans les spermatozoïdes, les protamines s'attachent au sillon mineur le long de la molécule d'ADN. Cette liaison provoque le regroupement des fibres de chromatine pour former une structure "toroïdale". De nombreuses études suggèrent une coopération de plusieurs éléments dans ces étapes d'échange.

2.5. Organisation de la chromatine au sein du spermatozoïde

- Structure finale du noyau spermatique

Dans la plupart des cellules, la chromatine est organisée par une structure protéique appelée matrice nucléaire (Ward et al., 2010). Dans le spermatozoïde, la matrice nucléaire est

composée de différentes protéines de structures comme l'actine, la myosine et la lamine B, ainsi que de facteurs de transcription et de facteurs chromatinien comme les topoisomérases (Martelli et al., 1999). Ce réseau de protéines structure le génome en s'accrochant sur des régions d'ADN nommés S/MAR pour "Scaffold/Matrix Attachment Regions". Les S/MAR partitionnent le génome sous forme de boucles de taille variant de 30 000 à 110 000 paires de bases d'ADN dans les cellules somatiques, (Drennan et al., 2010) et de 20 000 à 50 000 paires de bases dans le spermatozoïde (Ward et al., 1989). Durant la spermiogenèse ces boucles d'ADN pourraient se condenser pour former une structure "toroïdale" organisée autour des protamines (voir figure n°38). Chaque "toroïde" serait ensuite rattaché à la matrice nucléaire par l'ADN organisé sous forme nucléosomale dans le spermatozoïde (voir figure n°39 ; Ward et al., 2010).

Cette organisation sous forme de structures toroïdales accroît de 6 à 20 fois la compaction de la chromatine au sein du spermatozoïde comparativement aux cellules somatiques. Malgré cette compaction extrême, le génome s'organise en territoire (Zalenskaya and Zalensky, 2004). Par exemple, dans le spermatozoïde humain, les centromères sont positionnés à l'intérieur du noyau alors que les télomères sont ancrés à la périphérie (Mudrak et al., 2005). Cette organisation nucléaire semble très conservée au cours de l'évolution chez les mammifères. En effet, des localisations similaires des télomères et centromères ont été observées chez le rat, la souris, le taureau (Zalensky et al., 1997). La cartographie des chromosomes au sein du spermatozoïde a également été établie après décompaction préalable de la chromatine (Mudrak et al., 2005). Le traitement des spermatozoïdes à la soude ou par des tampons à forte concentration en sel (en présence d'agents réducteurs comme le DTT) permet de déplacer les protamines et les histones restantes. Cependant, l'utilisation de tels agents peut aussi déstructurer la conformation originelle de la chromatine.

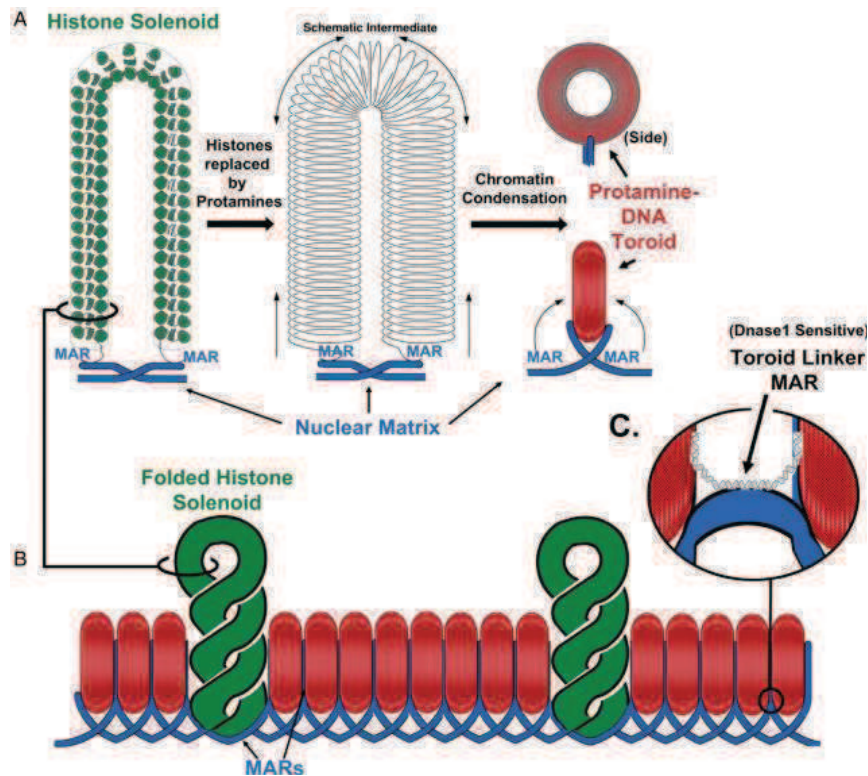


Figure n°39 : Organisation de la chromatine au sein du spermatozoïde (d'après Ward et al., 2009). Durant la spermiogenèse, les histones sont remplacées par des protamines, qui permettent la condensation de la chromatine sous forme de toroïdes. Les toroïdes s'alignent les uns à côté des autres (colorés en rouge). Certaines parties de l'ADN conservent des histones qui s'organisent en solénoïde (colorés en vert). (C) Les brins d'ADN qui relient les tores de protamine sont sensibles à l'action de la nucléase, et sont appelés MAR (région d'attachement à la matrice).

- L'épigénome transmet par le spermatozoïde

La présence d'histones dans les spermatozoïdes est connue depuis longtemps. Les spermatozoïdes de souris conservent 1 à 2% de nucléosomes au sein de leur génome (Balhorn et al., 1977 ; Brykczynska et al., 2010). Chez l'homme ce taux est de 15% (Tanphaichitr et al., 1978 ; Gatewood et al., 1990). Chez la souris, l'analyse en spectrométrie de masse des extraits acides de spermatozoïdes a permis de montrer la présence d'histones comme H2A, H2AX, H2AZ, H2AL1/L2, H2B, TH2B, H3.1, H3.3, CENPA, H4 (Govin et al., 2007).

La localisation des nucléosomes au sein du spermatozoïde n'est pas uniforme et les premières démonstrations font état d'un enrichissement des histones au niveau de régions géniques spécifiques. Par exemple, les gènes codants pour la globuline ϵ et γ , exprimés au début du développement embryonnaire, sont organisés sous forme nucléosomale au sein du spermatozoïde. En revanche, les gènes codants pour les formes β et δ de la globuline, non

exprimés durant le développement, sont structurés avec des protamines au sein des spermatozoïdes (Gardiner-Garden et al., 1998). La présence d'histones dans les gènes des globines pourrait permettre leur expression dans les phases précoces du développement embryonnaire. Les gènes codants pour Prm1, Prm2 et TP2, regroupés dans un cluster, sont également enrichis en histones (Wykes and Krawetz, 2003). Les histones présentes au sein de ce cluster dans les spermatozoïdes pourraient être des reliquats d'un état chromatinien de la spermiogenèse permettant l'expression tardive de ces gènes. Dans les spermatozoïdes, les histones persistent également dans les régions chromosomiques avec des fonctions spécialisées comme les régions soumises à l'empreinte (Banerjee and Smallwood, 1998), les télomères (Gineitis et al., 2000) et les rétrotransposons ADN (Pittoggi et al., 1999). A l'inverse, le gène de l'acrosine et les régions centromériques contiennent principalement des protamines (Wykes and Krawetz, 2003).

Des analyses *in situ* on également permis de montrer que les régions d'hétérochromatine retiennent des histones modifiées comme H3K9me, H4K8ac et H4K12ac et des variants d'histone comme CENPA, H2A.Z, H2AL1/L2 (van der Heijden et al., 2006 ; Zalensky et al., 1993). Cependant la localisation *in situ* de nucléosomes associés à des régions génomiques particulière dans les spermatozoïdes doit être analysée avec prudence. En effet, la structure compacte de la chromatine au sein du spermatozoïde ne peut pas être visualisée en immunofluorescence sans perméabilisation des membranes et décondensation préalable de la chromatine. Le traitement avec des agents comme le DTT (un puissant réducteur) ou l'héparine, peut altérer l'organisation et la localisation d'élément chromatinien (van Roijen et al., 1998).

Les avancées récentes dans les analyses à l'échelle du génome entier permettent la détection des séquences génomiques associées aux histones au sein des spermatozoïdes. Il a été montré que les histones sont associées à une forte densité génique et enrichies sur les promoteurs de gènes importants pour le développement embryonnaire comme des facteurs de transcription et des voies de signalisation spécifiques, mais aussi sur des clusters de miARN et de gènes soumis à l'empreinte. (Arpanahi et al., 2009 ; Hammoud et al., 2009). En dehors des promoteurs, les histones sont distribuées, à un faible taux, tout au long du génome (Brykczynska et al., 2010). L'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) associée au séquençage nouvelle génération (ChIP-seq.) révèle que les promoteurs des gènes régulés au cours du développement possèdent les marques activatrices de la transcription telles que H3K4me2/3 et/ou répressive comme H3K27me3. Dans les spermatozoïdes humains, H3K4me2 est présente sur les promoteurs des gènes de ménage ou associées aux promoteurs de gènes impliqués dans la spermatogenèse alors que H3K27me3 est enrichie sur les promoteurs des gènes exprimés dans les cellules différenciées. En ce qui concerne les variants d'histones, seul TH2B se trouve enrichi au niveau de gènes important pour la physiologie du spermatozoïde, la capacitation et la fertilisation. Les marques associées aux nucléosomes dans les spermatozoïdes humains et murins sont conservées au sein de régions similaires chez le zebrafish, bien que les histones ne soient pas remplacées au cours de la spermiogenèse dans cette espèce (Wu et al., 2011).

On peut alors se demander si les modifications des histones et les variants d'histones présents au cours de la spermiogenèse participent exclusivement au remodelage de la

chromatine ou si la maintenance de ces marques épigénétiques au sein du gamète mature peut influencer l'expression des gènes après fécondation (voir figure n°40A). Cependant, la preuve absolue de la contribution des histones au développement embryonnaire précoce n'a pas été obtenue (voir figure n°40B).

Les modifications post-traductionnelles et les variants d'histones retrouvées dans les spermatozoïdes sont difficilement repérable après fécondation. D'abord parce que la chromatine nucléosomale est peu abondante dans les spermatozoïdes, respectivement entre 1 et 15% chez la souris et chez l'homme. De plus, la détection des épitopes est limitée avant la décondensation du pronoyau mâle. Enfin, le dépôt des histones maternelles, indifférenciables de leurs homologues paternels, coïncide avec la décondensation de la chromatine paternelle (van der Heijden et al., 2008). Par exemple, le variant d'histone H3.3 présent dans le sperme mature (Gatewood et al. 1990), n'est pas détectable par immunofluorescence au sein de la chromatine paternelle jusqu'à ce que le stock d'histones maternelles soit déposé au début de la décondensation du pronoyau mâle (van der Heijden et al., 2005 ; Torres-Padilla et al., 2006). Chez la drosophile, une mutation de la chaperonne HIRA bloque l'incorporation des H3.3 dans le pronoyau mâle et empêche sa décondensation (Loppin et al., 2005 ; Ooi and Henikoff, 2007). Les variants paternels H2A1/L2 sont d'abord détectés dans les chromocentres des spermatides allongées et restent enrichis au niveau des zones d'hétérochromatine dans le spermatozoïde mature mais ne sont plus détectés dans le pronoyau mâle après fusion des gamètes (Wu et al., 2008). Cette observation, peut être liée au déplacement de H2A1/L2 ou encore à une mauvaise sensibilité de l'anticorps ne permettant plus la détection d'un épitope trop dilué. Inversement, les histones H3.1 et H3.2 sont détectées après la fertilisation dans le pronoyau mâle décondensé au moment où les premières phases réplcatives sont initiées. Les modifications H4K8ac et H4K12ac sont présentes dans les zones d'hétérochromatine des spermatides et sont observées dans les spermatozoïdes matures et après fécondation. Cependant, il n'y a aucun moyen de faire la différence avec les modifications portées par les histones maternelles incorporées au cours de cette phase (van der Heijden et al., 2008).

Ainsi, les nombreux sites d'enrichissement en nucléosome au sein du spermatozoïde ne semblent avoir aucun effet sur le développement du zygote et reflète simplement l'histoire transcriptionnelle de la différenciation des cellules germinales mâles. Une comparaison des régions géniques qui restent associées aux nucléosomes au cours de la spermiogenèse et dans le spermatozoïde mature couplé à l'analyse ontologique permettrait de mieux comprendre les différents rôles de ces marques épigénétiques transmises à l'embryon.

L'idée que les spermatozoïdes puissent contenir des ARN a longtemps été refusée, car ces cellules n'ont presque plus de cytoplasme et sont transcriptionnellement inactives. Cependant, dès les années 1970, plusieurs études ont montré que des ARN sont présents dans les spermatozoïdes de taureau et dans le pollen des plantes (Krawetz et al., 2005). La présence d'ARN au sein de spermatozoïdes humains a été confirmée en 1993 grâce à plusieurs travaux réalisés dans des conditions excluant toute contamination par des mitochondries ou des ARN somatiques (Kumar et al., 1993 ; Dadoune et al., 2005). Il a été confirmé que les ARN des spermatozoïdes sont transmis lors de la fécondation (Ostermeier et al., 2004). Néanmoins leur fonction reste incertaine. La présence d'ARN codant pour les

protamines suggère que certains ARN seraient des reliquats de la transcription très active qui a lieu lors de la spermiogenèse (Ostermeier et al., 2004). Cependant, la présence d'ARN codant pour des facteurs impliqués dans le développement embryonnaire précoce, tel FOXG1B et WNT5A, soutient l'hypothèse d'une transmission d'information portée par les ARN (Ostermeier et al., 2004). Le travail du groupe de Mino Rassoulzadegan confirme de manière spectaculaire le potentiel épigénétique porté par les ARN transmis par les spermatozoïdes (Rassoulzadegan et al., 2006). Les souris homozygotes mutées sur le gène *Kit* décèdent peu après leur naissance suite à des problèmes de développement, de différenciation des cellules germinales, d'hématopoïèse et de mélanogenèse. Par contre, les souris hétérozygotes survivent mais leurs pattes et l'extrémité de leur queue sont blanches, alors que leur pelage est noir. De manière surprenante, les souris homozygotes sauvages nées d'un accouplement entre deux souris hétérozygotes ont encore ce phénotype. Ceci reflète la transmission d'une information épigénétique non codée par le génome, dénommée "paramutation". Les auteurs ont montré que ce phénomène est lié à une dérégulation des miARN présents dans les spermatozoïdes. Ces miRNA peuvent donc transmettre au zygote une information épigénétique essentielle pour contrôler l'expression des gènes lors du développement embryonnaire (Carthew et al., 2006 ; Valencia-Sanchez et al., 2006). Une étude plus générale a identifié 68 petits ARN transmis par les spermatozoïdes lors de la fécondation (Ostermeier et al., 2005).

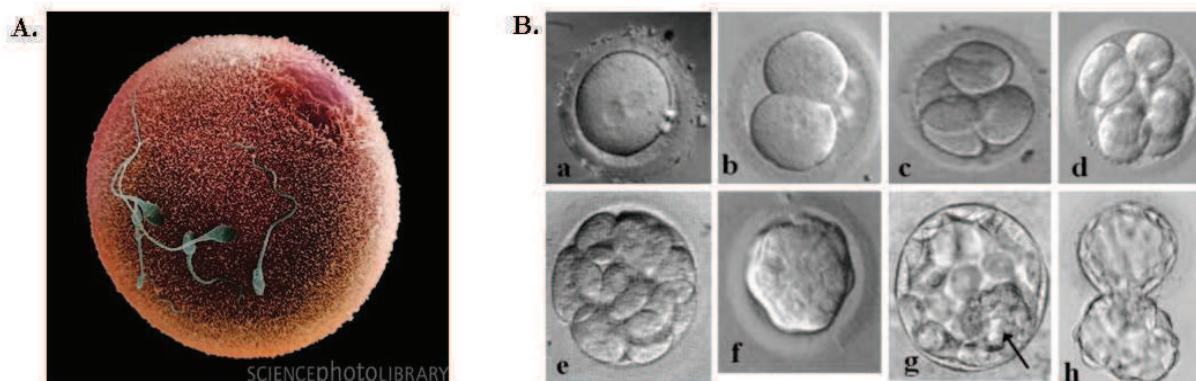


Figure n°40 : De la fécondation au développement embryonnaire précoce. (A) Après un long périple, le spermatozoïde apporte son matériel génétique et épigénétique à l'ovocyte lors de la fécondation (www.sciencephoto.com) (B) Développement de l'embryon humain. (a) ovocyte fécondé avec deux pronoyaux visibles (jour 0), (b) stade 2 cellules (jour 1), (c) stade 4 cellules (jour 2), (d) stade 8 cellules (jour 3 tôt) ; (e) stade 16 cellules (jour 3 tard), (f) stade morula (jour 4), (g) et (h) stade blastocyste (5 jours) avec la masse cellulaire interne indiquée par la flèche (Mackie and Ogilvie, 2005).

III. Etudes bibliographiques

1. Les secrets de la disparition des histones au cours de la spermiogenèse

- Présentation de la revue publiée

Cette revue discute des mécanismes potentiellement impliqués dans le remplacement des histones lors de la spermiogenèse. De nombreux acteurs complémentaires semblent impliqués pendant les phases d'échange des histones. Parmi eux, des modifications post-traductionnelles des histones, des variants d'histones ou encore des protéines basiques peuvent participer à la réorganisation post méiotique de la chromatine.

2. Les modèles de souris pour l'étude du remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse

- Présentation de la revue publiée

De nombreux gènes contrôlent la fertilité des souris et sont conservés chez l'homme. L'étude de modèles murins transgéniques peut permettre une meilleure compréhension des fonctions testiculaires et des processus spermatogéniques encore méconnus. Par exemple, l'étude d'acteurs du remodelage post-méiotique de la chromatine, grâce aux modèles de souris transgéniques, permet de commencer la description des bases moléculaires de la réorganisation du génome mâle au cours de la spermiogenèse.

MINIREVIEW

From meiosis to postmeiotic events: The secrets of histone disappearance

Jonathan Gaucher, Nicolas Reynoird, Emilie Montellier, Fayçal Boussouar, Sophie Rousseaux and Saadi Khochbin

INSERM, U823; Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

Keywords

acetylation; chromatin; epigenetics; histone variants; nucleosomes; protamines; protease; sperm; transition proteins

Correspondence

S. Khochbin, INSERM, U823, Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France
Fax: +33 4 76 54 95 95
Tel: +33 4 76 54 95 83
E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr

(Received 20 July 2009, accepted 20 October 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x

One of the most obscure phenomena in modern biology is the near genome-wide displacement of histones that occurs during the postmeiotic phases of spermatogenesis in many species. Here we review the literature to show that, during spermatogenic differentiation, three major molecular mechanisms come together to 'prepare' the nucleosomes for facilitated disassembly and histone removal.

Introduction

One of the last completely unknown biological processes is the molecular basis of postmeiotic haploid genome reprogramming. Our lack of knowledge of this phenomenon includes sporulation in lower eukaryotes and pollen formation in plants, as well as spermatogenesis, all directing a large-scale genome compaction. Simple and fundamental questions regarding the molecular basis of genome compaction and reorganization are completely unanswered. Additional questions concern the assembly of new DNA-packaging proteins, including specific histone variants and nonhistone small basic proteins such as transition proteins (TPs) and protamines (Prms) [1–4].

For about 30 years, these questions have inspired various types of investigation, without providing any insights into the molecular mechanisms involved. These studies have, however, suggested that an essen-

tial element in histone replacement could be the very nature of the testis-specific genome-packaging proteins themselves. Indeed, in various species, histones are replaced by small basic structural DNA-packaging proteins [5]. In mammals, TPs are the first nonhistone DNA-packaging proteins to appear in large amounts and replace histones, which are in turn replaced by Prms [1,6]. This is, however, not a general rule, because, in some species of fish, birds and invertebrates, histones may be replaced directly by Prms and Prm-like proteins [7,8]. Another important aspect of the genome organization that occurs during male germ cell differentiation is the replacement of canonical histones by a variety of histone variants, which takes place extensively in meiotic and postmeiotic cells before the replacement of almost all of the histones.

Abbreviations

Prm, protamine; TP, transition protein.

Although no clear mechanisms have been proposed for histone replacement, analysis of the literature suggests that three general mechanisms act in combination to destabilize the nucleosomes and replace the histones. These are: (a) large-scale incorporation of histone variants, creating less stable nucleosomes; (b) genome-wide histone hyperacetylation; and (c) competition for DNA binding with very basic DNA-interacting nonhistone proteins such as TPs and Prms (Fig. 1). Here, we review the literature on these three aspects, to highlight our lack of knowledge about the mechanisms controlling the shift from a nucleosome-based genome organization to a genome packed via nucleoprotamines.

Destabilization of the nucleosomes by histone variants

In different species, many of the core or linker histone variant genes are exclusively expressed in male germ cells. In mice and humans, almost all of the H2A, H2B, H3 and H1 variants are expressed in testis. Among them, some are highly and/or exclusively expressed in spermatogenic cells, and, interestingly, the only known H2B variants are testis-specific (Table 1). Some of these H2A and H2B variants have been subjected to structural and functional analyses, and all of these studies point to the nucleosomes containing these variants as being significantly less stable than those composed of canonical histones.

Table 1. The list of testis-specific histone variants in the mouse and human. Homologous proteins in the mouse and human [1,11,15] are indicated by an asterisk. +, H2ABbd is an ortholog of mouse H2AL1/L2 [12] and, accordingly, is almost exclusively expressed in testis (our unpublished data).

Histone variants	Mouse	Human
H2A	H2AI 1*	H2A.Bbd*+
	H2AI 2*	
	H2AI 3	
H2B	H2BI 1	hTSH2B* H2BFWT
	H2BI 2	
	TH2B*	
H3	H3t	H3T
H1	H1t	H1T
	H1t2	H1T2
	Hils1	HILS1

The only testis-specific H2B variants, hTSH2B/TH2B and H2BFWT, that have been studied in a nucleosome showed a marked ability to induce nucleosome instability when associated with somatic-type histones [9,10]. Moreover, recently, five new testis-specific H2A and H2B variants have been identified in the mouse, and named H2AL1, H2AL2, H2AL3, H2BL1, and H2BL2 [11]. Here again, investigation of nucleosomes composed of some of these variants showed that H2AL2/TH2B-containing nucleosomes are less stable than those containing H2A/H2B. These particular studies also supported the idea that TH2B-containing nucleosomes could be preferential sites for H2AL1-L2

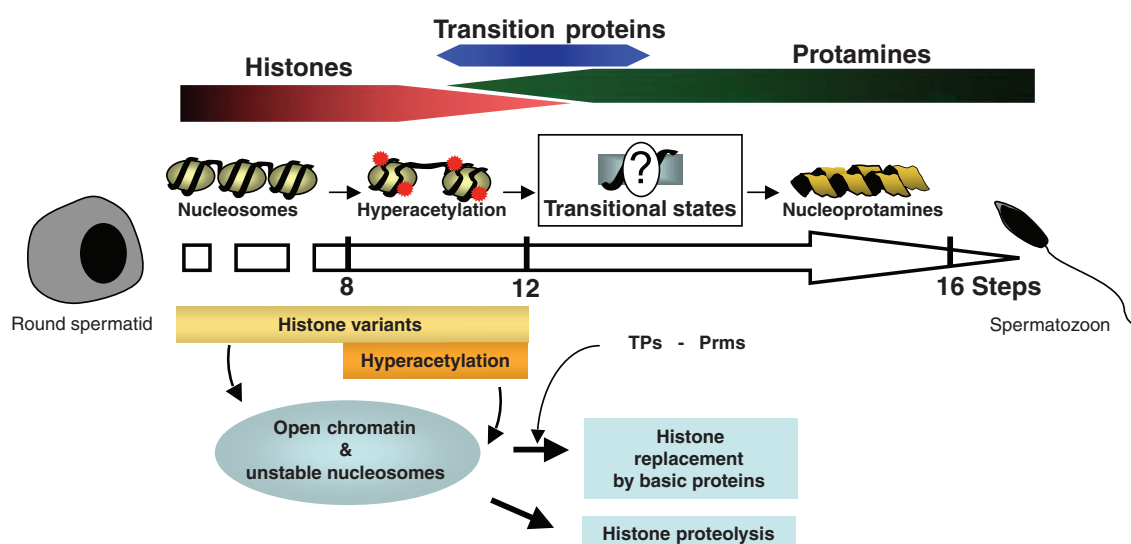


Fig. 1. The secrets of histone disappearance in elongating spermatids. (A) Extensive incorporation of histone variants and global histone hyperacetylation prior to their replacement create open chromatin domains containing unstable nucleosomes. The presence of highly basic small DNA-packaging proteins such as TPs could facilitate histone eviction and a shift from a nucleosomal-based genome organization to nonhistone protein-based DNA packaging.

incorporation, as H2AL1 and H2AL2 dimerize better with TH2B than with H2B [11].

The incorporation of the human homolog of H2AL2 [12], H2A.Bbd, has also been shown to significantly affect nucleosome stability [13].

It is also of note that, even in the case of somatic-type histone variants expressed in spermatogenic cells, there is a high probability of them combining to create peculiar nucleosomes bearing various combinations of histones, such as H3.3 and H2A.Z, that induce nucleosome instability [3,14].

Furthermore, the testis-specific linker histone, H1t, has also been shown to be less efficient in compacting chromatin than other H1 subtypes, and has less affinity not only for nucleosomal DNA but also for free DNA [15].

It is therefore very tempting to hypothesize that waves of histone variants with the capacity to open chromatin and to form unstable nucleosomes are synthesized and incorporated to create chromatin domains, which then constitute preferential targets for nucleosome disassembly and histone displacement.

Facilitated histone displacement by massive chromatin acetylation

Histone hyperacetylation has long been observed in elongating spermatids in many species [1]. In the mouse, histone hyperacetylation starts while a general transcriptional shutdown is observed [16]. Therefore, elongating spermatids heavily acetylate their histones in the total absence of DNA replication and transcription. TP1 and TP2 are detected first, and the acetylation signal gradually disappears during the course of histone replacement [17]. This chromatin acetylation therefore seems to be tightly linked to histone replacement. Additional arguments in favor of acetylation-dependent histone displacement come from studies showing that histones remain underacetylated in species where they remain present all through spermiogenesis such as winter flounder and carp [18,19]. Furthermore, the antero-caudal disappearance of the acetylation signal correlates very well with an anterior-to-posterior direction of genome compaction [17].

Additionally, several *in vitro* and biochemical studies support the idea that nucleosomes containing hyperacetylated histones are more prone to displacement by highly basic proteins such as Prms [20–22]. These results fit well with later investigations showing that general and site-specific histone acetylation can affect the higher-order structure of chromatin and nucleosome properties [23–26] and facilitate the exchange of histones [27].

Although these acetylation-dependent changes in chromatin properties convincingly point to histone hyperacetylation as a critical element in histone removal, they do not indicate how this removal of acetylated histones is performed. Consideration of the ‘histone code’ and of the corresponding ‘reading factors’ has opened new ways to tackle the *in vivo* mechanistic issue. Indeed, because of the recognition of acetylated histones by bromodomains, which are structural modules of 110 amino acids capable of interacting with acetylated lysines [28], factors containing these domains appear to be the first-choice candidates for interaction with acetylated histones in elongating spermatids and mediation of their removal. This reasoning led us to investigate the function of a testis-specific double-bromodomain factor, Brdt, which has the ability to interact with acetylated chromatin and induce its global reorganization [29]. These investigations support a critical role for Brdt in mediating chromatin acetylation-dependent events during spermiogenesis. This hypothesis has received additional support from the demonstration of its indispensable action in elongating/condensing spermatids [30]. The molecular characterization of this particular factor, as well as of other bromodomain-containing proteins expressed in elongating spermatids, should shed light on the nature of the underlying mechanisms [31].

Direct histone displacement by nonhistone DNA-packaging basic proteins

The chromatin opening and enhanced histone exchange induced by global histone hyperacetylation, as well as the nucleosome instability resulting from the incorporation of histone variants, explain why *in vitro* histone replacement by small testis-specific basic proteins is facilitated [20–22]. These considerations point to TPs in mammals as sufficient to displace the histones. The generation of mice lacking either TP1 or TP2 did not, however, bring an answer, because of considerable functional redundancy between the two proteins [32]. Analysis of mice lacking both TPs gave surprising results. In these mice, histone displacement was found to occur normally despite the total absence of TPs. These results show that, as opposed to the prediction, TPs do not play a role in the removal of histones. A detailed analysis showed, however, that when histone removal is complete, genome compaction does not occur normally along the antero-caudal axis, but that, instead, focal DNA condensations are observed [16]. Interestingly, a focal chromatin condensation has been observed in several species where a

direct histone-to-protamine replacement takes place without any other intermediary states [8,33]. In spermatids lacking TPs, where focal condensation units form upon histone removal and enlarge during later stages, the situation is somehow similar to that observed in these organisms [16]. It is therefore highly probable that, in the absence of TPs, direct replacement of histones by Prms could take place, because the latter would be the winners of the competition for DNA binding.

The generation of mice without TPs did not, therefore, allow conclusions to be drawn concerning the role of small basic DNA-packaging proteins in histone displacement. In order to test this hypothesis, mice lacking both TPs and Prms would be required. Indeed, to understand the basis of histone replacement, it would be critical to know whether the competition for DNA binding plays a direct role in histone displacement. However, these mice would be difficult to obtain, as Prm haploinsufficiency results in male sterility [34], and therefore Prm conditional mutants would need to be generated, and then crossed with mice lacking TPs. The role of Prms in histone removal could, however, be investigated in *Drosophila*, where spermatogenesis is also associated with histone hyperacetylation and histone replacement by two Prm-like proteins [35]. In this organism, the absence of both Prm-encoding genes did not affect histone removal. Here again, it was not possible to draw conclusions about the role of small basic proteins in histone displacement, as a TP-like protein was discovered that is synthesized during histone removal, and the above-mentioned work did not consider the impact of the inactivation of the gene encoding this protein on histone replacement [35].

Histone replacement through proteolysis

The possibility also exists that histones are degraded in place by some specific proteases before or during TP assembly. Indeed, early studies suggested that spermatogenic cells could have specific histone proteases that may account for the disappearance of histones in spermatids.

Marushige *et al.* [20] were the first to propose that histone hyperacetylation combined with the action of chromosomally associated proteases could explain the disappearance of hyperacetylated histones in spermatids. Other reports followed, among which the most interesting was that of Faulkner *et al.*, [36] who found that a chromatin-associated protease is present in micrococcal nuclease-solubilized chromatin from

mouse seminiferous tubules. The protease was associated with dinucleosomes or oligonucleosomes, but not with mononucleosomes, and its activity appeared in a stage-specific manner, as it was not present in spermatogenic cells up to 3–4 weeks after birth [36], suggesting that it affected late postmeiotic cells. Here also, the authors proposed a role for this protease in histone displacement. Although all of these findings need to be taken with caution, mostly because of the presence of many proteases associated with the acrosome [37], the possibility of direct degradation of histones by a chromatin-bound protease should be seriously considered.

There are also some hints on the possibility of histone degradation through the ubiquitin–proteasome system. Indeed, an early report described the presence of mono-ubiquitinated and polyubiquitinated H3, H3t and H2B in elongating rat spermatids, where histones are removed [38]. More interestingly, later on, the group of Wing [39] identified a ubiquitin ligase, named E3^{Histone}, capable of ubiquitinating all histones *in vitro*. Although the enzyme was found to be expressed in many tissues besides testis, its preferred E2 is UBC4, which has a testis-specific isoform, UBC4-testis, expressed mainly in round and elongating spermatids [39]. However, a detailed study of E3^{Histone} expression did not show its presence in spermatids, a result that invites caution concerning its involvement in histone replacement [40]. Involvement of the ubiquitin–proteasome system in histone removal received better support in *Drosophila*. Indeed, the inactivation of a testis-specific proteasome core particle subunit, Pros α 6T, leads to spermiogenesis defects affecting spermatids during the elongation process. A detailed analysis of flies expressing a green fluorescent protein-tagged His2AvD transgene showed that, under these conditions, histone removal is delayed but Prm incorporation and histone disappearance finally take place [41]. This report provides the first serious indication of the role of histone degradation and, more specifically, the involvement of the ubiquitin–proteasome system in histone removal.

Concluding remarks

This minireview highlights the fact that, although the question of the mechanisms controlling genome-wide histone replacement has been raised many times by many investigators, very few studies have specifically aimed at the identification of the principal actors. Analysis of the literature allows us to suggest a working model based on three distinct events that occur long before histone replacement itself but prepare chromatin for these dramatic transitions. It is of note that the findings of many studies converge to show the

occurrence of events known to destabilize chromatin higher-order structures and the nucleosomes themselves during stages preceding the synthesis and incorporation of small basic DNA-packaging proteins. However, almost nothing is known of the actual molecular machinery involved in histone replacement. To better tackle this issue, one has to know whether histones are evicted through competition with TPs and Prms, or degraded on chromatin prior to the assembly of these proteins. There is also a strong possibility that before or during their replacement, histones become degraded by chromatin-bound proteases or the ubiquitin–proteasome system. It is also important to determine whether histone proteolysis concerns nucleosomal histones or histones released after nucleosome disassembly. Further dedicated and specific research is needed to unravel one of the important mysteries of modern biology.

Acknowledgements

The work in SK laboratory is supported by the ANR blanche “EpiSperm” and “Empreinte” and INCADHOS research programs.

References

- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S & Khochbin S (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**, 3459–3469.
- Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK & Khochbin S (2005) Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* **345**, 139–153.
- Boussouar F, Rousseaux S & Khochbin S (2008) A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* **7**, 3499–3502.
- Govin J & Berger SL (2009) Genome reprogramming during sporulation. *Int J Dev Biol* **53**, 425–432.
- Ausio J, Eirin-Lopez JM & Frehlick LJ (2007) Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**, 63–79.
- Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P & Sautiere P (1998) Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* **80**, 117–128.
- Oliva R & Dixon GH (1991) Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40**, 25–94.
- Kurtz K, Martinez-Soler F, Ausio J & Chiva M (2007) Acetylation of histone H4 in complex structural transitions of spermiogenic chromatin. *J Cell Biochem* **102**, 1432–1441.
- Li A, Maffey AH, Abbott WD, Conde e Silva N, Prunell A, Siino J, Churikov D, Zalensky AO & Ausio J (2005) Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* **44**, 2529–2535.
- Boulard M, Gautier T, Mbele GO, Gerson V, Hamiche A, Angelov D, Bouvet P & Dimitrov S (2006) The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Mol Cell Biol* **26**, 1518–1526.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S *et al.* (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**, 283–294.
- Syed SH, Boulard M, Shukla MS, Gautier T, Travers A, Bednar J, Faivre-Moskalenko C, Dimitrov S & Angelov D (2009) The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res* **37**, 4684–4695.
- Gonzalez-Romero R, Mendez J, Ausio J & Eirin-Lopez JM (2008) Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd. *Gene* **413**, 1–7.
- Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K & Felsenfeld G (2009) H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark ‘nucleosome-free regions’ of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet* **41**, 941–945.
- Godde JS & Ura K (2009) Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int J Dev Biol* **53**, 215–224.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R & Meistrich ML (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* **38**, 200–213.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S & Rousseaux S (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**, 950–960.
- Kennedy BP & Davies PL (1980) Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J Biol Chem* **255**, 2533–2539.
- Kennedy BP & Davies PL (1981) Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *J Biol Chem* **256**, 9254–9259.
- Marushige K, Marushige Y & Wong TK (1976) Complete displacement of somatic histones during

- transformation of spermatid chromatin: a model experiment. *Biochemistry* **15**, 2047–2053.
- 21 Oliva R & Mezquita C (1986) Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core particles in vitro. *Biochemistry* **25**, 6508–6511.
 - 22 Oliva R, Bazett-Jones D, Mezquita C & Dixon GH (1987) Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *J Biol Chem* **262**, 17016–17025.
 - 23 Garcia-Ramirez M, Rocchini C & Ausio J (1995) Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* **270**, 17923–17928.
 - 24 Tse C, Sera T, Wolffe AP & Hansen JC (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**, 4629–4638.
 - 25 Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR & Peterson CL (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844–847.
 - 26 Kan PY, Caterino TL & Hayes JJ (2009) The H4 tail domain participates in intra- and inter-nucleosome interactions with protein and DNA during folding and oligomerization of nucleosome arrays. *Mol Cell Biol* **29**, 538–546.
 - 27 Benson LJ, Gu Y, Yakovleva T, Tong K, Barrows C, Strack CL, Cook RG, Mizzen CA & Annunziato AT (2006) Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. *J Biol Chem* **281**, 9287–9296.
 - 28 Mujtaba S, Zeng L & Zhou MM (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521–5527.
 - 29 Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S & Khochbin S (2003) Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**, 5354–5365.
 - 30 Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X & Wolgemuth DJ (2007) The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**, 3507–3515.
 - 31 Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ *et al.* (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**, 664–668.
 - 32 Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR & Zhao M (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**, 483–488.
 - 33 Saperas N, Ribes E, Buesa C, Garcia-Hegart F & Chiva M (1993) Differences in chromatin condensation during spermiogenesis in two species of fish with distinct protamines. *J Exp Zool* **265**, 185–194.
 - 34 Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB & Eddy EM (2001) Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**, 82–86.
 - 35 Rathke C, Baarends WM, Jayaramaiah-Raja S, Bartkuhn M, Renkawitz R & Renkawitz-Pohl R (2007) Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J Cell Sci* **120**, 1689–1700.
 - 36 Faulkner RD & Bhatnagar YM (1987) A protease activity is associated with testicular chromatin of the mouse. *Biol Reprod* **36**, 471–480.
 - 37 Marushige Y & Marushige K (1983) Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin. *Biochim Biophys Acta* **761**, 48–57.
 - 38 Chen HY, Sun JM, Zhang Y, Davie JR & Meistrich ML (1998) Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J Biol Chem* **273**, 13165–13169.
 - 39 Liu Z, Oughtred R & Wing SS (2005) Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones. *Mol Cell Biol* **25**, 2819–2831.
 - 40 Liu Z, Miao D, Xia Q, Hermo L & Wing SS (2007) Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3(Histone)/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis. *Dev Dyn* **236**, 2889–2898.
 - 41 Zhong L & Belote JM (2007) The testis-specific proteasome subunit Pros{alpha}6T of D. melanogaster is required for individualization and nuclear maturation during spermatogenesis. *Development* **134**, 3517–3525.

Special Issue: SBI RM: Invited Papers from the 4th Utah-Florence Symposium on the Genetics of Male Infertility

REVIEW

Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming

Sophie Rousseaux, Fayçal Boussouar, Jonathan Gaucher, Nicolas Reynoird, Emilie Montellier, Sandrine Curtet, Anne-Laure Vitte, and Saadi Khochbin

INSERM, U823, Université Joseph Fourier Grenoble, Institut Albert Bonniot, Grenoble, France

The molecular basis of post-meiotic male genome reorganization and compaction constitutes one of the last black boxes in modern biology. Although the successive transitions in DNA packaging have been well described, the molecular factors driving these near genome-wide reorganizations remain obscure. We have used a combination of different approaches aiming at the discovery of critical factors capable of directing the post-meiotic male genome reprogramming, which is now shedding new light on the nature of the fundamental mechanisms controlling post-meiotic histone replacement and genome compaction. Here we present a summary of these findings. The identification of the first factor capable of reading a precise combination of histone acetylation marks, BRDT, allowed highlighting a critical role for the genome-wide histone hyperacetylation that occurs before generalized histone replacement. In this context, the recent identification of a group of new histone variants capable of forming novel DNA packaging structures on specific regions during late spermatogenesis, when hyperacetylated histones are massively replaced in spermatids, also revealed the occurrence of a post-meiotic region-specific genome reprogramming. Additionally, the functional characterization of other molecular actors and chaperones in action in post-meiotic cells now allows one to describe the first general traits of the mechanisms underlying the structural transitions taking place during the post-meiotic reorganization and epigenetic reprogramming of the male genome.

Keywords acetylation, chromatin, epigenetics

Abbreviations BRDT: a double bromodomain testis-specific protein; TPs: transition proteins; FISH: fluorescence *in situ* hybridization; BD1: first bromodomain; ICRs: imprinting control regions; S1: serine 1.

Introduction

One of the unknown biological processes remains the molecular basis of post-meiotic haploid genome reprogramming [Rousseaux et al. 2008]. Our lack of knowledge of this

phenomenon includes sporulation in lower eukaryotes and pollen formation in plants [Govin and Berger 2009], as well as mammalian spermatogenesis, all directing a spectacular genome compaction. Simple and fundamental questions regarding the molecular basis of genome compaction and reorganization, i.e., the fate of histones, are completely unanswered [Gaucher et al. 2010].

In recent years important efforts have been employed to identify and functionally characterize critical elements in action during post-meiotic phases of spermatogenesis, and to propose the first molecular models underlying haploid male genome reprogramming. Indeed, facing the unknown nature of the mechanisms controlling post-meiotic genome reprogramming, approaches based on factor identification and their functional studies appeared to be very promising. In our group these approaches included: i) a large-scale identification of factors through proteomic approaches using various elongating/condensing spermatid extracts, at the stages when the major genome reorganization occur and ii) comprehensive *in silico* analyses of testis-specific transcripts encoding chromatin-related proteins (harboring known chromatin related domains such as bromo, chromo, etc.) (for detailed information see [Rousseaux and Ferro 2009]). Based on these factor identification strategies and the subsequent functional analyses, the first molecular models for post-meiotic male genome reprogramming could be proposed.

Chromatin acetylation-dependent genome reprogramming

Employing the early detailed analysis of histone acetylation during mouse and human spermatogenesis [Faure et al. 2003; Hazzouri et al. 2000] a hierarchy could be established in the lists of factors obtained through proteomic and *in silico* approaches [Rousseaux and Ferro 2009] for subsequent functional studies. Taking into account the early investigations reporting a massive histone hyperacetylation in spermatogenic cells before histone replacement in different species [Govin

Received 24 February 2010; accepted 09 April 2010.

Address correspondence to Saadi Khochbin, INSERM/UJF U823, Institut Albert Bonniot, Domaine de la Merci La Tronche, Grenoble 38042 Cedex 9 France. E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr

et al. 2004], our investigations started by a detailed analysis of histone acetylation during mouse spermatogenesis, which had remained uncharacterised. This founding work allowed characterizing the wave of global hyperacetylation affecting histones just before their replacement by transition proteins (TPs). This work also showed that, after this genome-wide acetylation, the disappearance of acetylated histones is not homogeneous throughout the whole genome, but that specific acetylated genomic domains persist even when most of the histones are replaced by TPs [Govin et al. 2007; Hazzouri et al. 2000]. Figure 1 shows the occurrence of a massive histone hyperacetylation simultaneously with a dramatic decompaction of pericentric regions revealed by a major satellite (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Interestingly, and unexpectedly, these heterochromatin regions retain nucleosomes for a longer period compared to the other genomic region (Fig. 1).

All of the subsequent functional studies and the choice to focus on the most relevant factors were then based on these

observations. For example, the study of bromodomain-containing proteins, potentially capable of interacting with acetylated chromatin, was privileged, and the nature of the heterogeneous genome organizations (nucleosomal versus non nucleosomal genome organization) that is established during the histone hyperacetylation phase in elongating spermatids, was unraveled [Govin et al. 2007]. These characteristics are of potentially high importance since they may have a decisive role in the establishment of the specific genomic organization recently described in mature spermatozoa [Hammoud et al. 2009; Arpanahi et al. 2009].

Four factors, including two containing bromodomains, potentially acting on acetylated chromatin or controlling histone hyperacetylation, were selected for functional studies in our laboratory. At the time of identification, they were all of unknown function [Caron et al. 2003; Pivot-Pajot et al. 2003; Caron et al. unpublished].

Here, we will briefly develop our functional data on one of these factors, BRDT, a double bromodomain

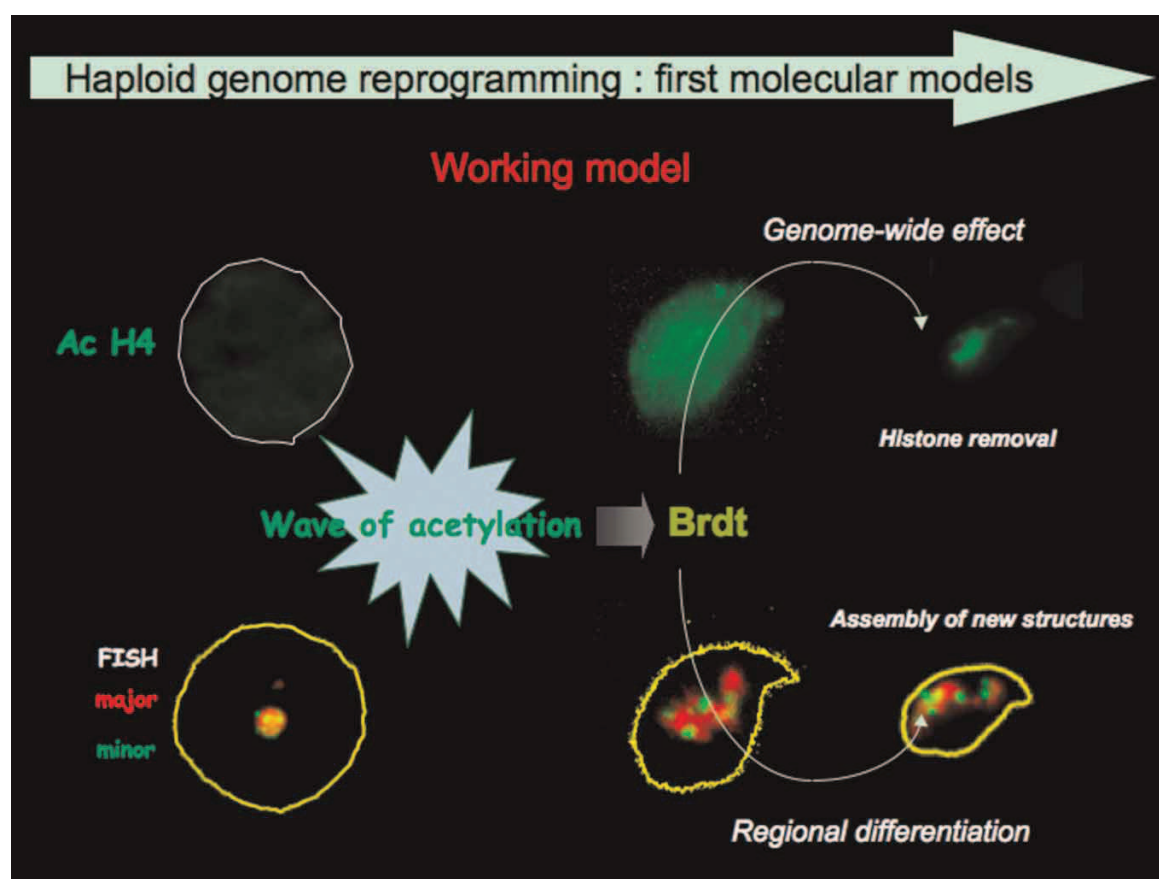


Figure 1. Post-meiotic histone hyperacetylation triggers the subsequent male genome reorganizations. A wave of genome-wide histone hyperacetylation occurs at the beginning of the elongation of spermatids just before histone replacement by transition proteins. BRDT was recently identified as the first factor capable of binding to hyperacetylated histone H4. Interestingly in the absence of functional double bromodomain testis-specific protein (BRDT), the spermatogenesis defects first appear before spermatid's condensation. The wave of histone hyperacetylation is also associated with specific reprogramming of pericentric regions (revealed by a fluorescence *in situ* hybridization (FISH) approach using the major and minor satellite probes, as indicated), which lose their heterochromatic nature and gain histone acetylation. Specific late expressing histone variants organize these regions inducing the formation of new DNA packaging structures. These histones remain associated with the male genome in mature spermatozoa and appear as good candidates for transmitting male-specific epigenetic information to the egg after fertilization.

testis-specific protein. Indeed, our investigations now indicate that BRDT plays a major role in controlling chromatin acetylation-dependent events in spermatids. Our early studies indicated that the protein has two functional bromodomains and possesses the extraordinary capability of specifically condensing hyperacetylated chromatin [Pivot-Pajot et al. 2003]. A multidisciplinary approach was then undertaken to discern its function in spermatids. These studies identified BRDT as the first factor specific for combinatorial histone mark reading. Indeed, its first bromodomain (BD1) is the only known BD, which requires simultaneous modifications (acetylation) of both lysines 5 and 8 of H4 for high affinity binding, whereas its BD2 specifically binds to H3 K18ac [Moriniere et al. 2009]. Therefore, efficient binding of BRDT needs simultaneous acetylation of three lysines on two histone tails. Moreover, since the simultaneous acetylation of K5/K8 specifically occurs in hyperacetylated H4, the requirement of acetylation of both H4K5 and K8 for BD1 recognition also demonstrates that this protein is the first known factor specific for binding tetra-acetylated histone H4. BRDT is therefore the perfect candidate which could act on hyperacetylated chromatin and mediate the subsequent events in elongating spermatids. Accordingly, it has recently been published that mice expressing a mutated form of BRDT lacking its BD1 are sterile and show post-meiotic defects [Shang et al. 2007].

Based on the observation of genomic 'islands' containing surviving acetylated nucleosomes in elongating/condensing spermatids, we developed an approach to characterize the nature of the histones involved. This work led to the discovery of a group of yet unknown histone H2A and H2B variants, which we named H2AL1, H2AL2, H2AL3, and H2BL1 and H2BL2. Our detailed studies of H2AL1/L2 showed that they are specifically expressed in late developing post-meiotic male germ cells, in condensing spermatids, at the same time as TPs, and that they remain present later in mature spermatozoa. We also observed that, after the wave of histone hyperacetylation, pericentric regions undergo a very unique reprogramming process, which ends by the assembly of these histone variants in these regions [Govin et al. 2007]. Therefore these histone variants constitute important characterized elements of the male-specific epigenome that could be transmitted to the egg [Wu et al. 2008].

Along this line of investigation, we showed that during spermatogenesis, the paternally and maternally methylated imprinting control regions (ICRs) carry different histone modifications during the stages that precede the global histone-to-protamine exchange. These chromatin differences could influence the way ICRs are assembled into specific structures in late spermatogenesis, and may thus influence post-fertilization events [Delaval et al. 2007].

Finally, taking advantage of conceptual similarities between spermatogenesis and yeast sporulation, we have also developed a pioneering work to unravel the fundamental and conserved mechanisms underlying post-meiotic

genome compaction. We have investigated the state of H4 serine 1 (S1) phosphorylation during mouse spermatogenesis and at the same time this modification was investigated during yeast sporulation [Krishnamoorthy et al. 2006]. These investigations suggest a critical role for H4S1 phosphorylation in genome compaction.

Other factors identified through the analysis of specific extracts' proteomes, allowed us to discern some of the unknowns of post-meiotic genome structural transitions. Several chaperones in action in condensing spermatids were identified and among them we showed that HSP70.2 (HSPA2), a testis-specific member of heat shock proteins, associates with TPs in post-meiotic cells and is probably involved in their assembly/removal [Govin et al. 2006]. Within other chaperons present in elongating spermatids we also identified NAP1L4 as the chaperon of H2AL1/L2 [Govin et al. unpublished].

The work described above has allowed researchers to functionally dissect one of the less explored phenomenon in modern biology, paving the way to develop an active translational research program. These efforts have led so far to the identification of a mutation in Aurora C as an important genetic component of male infertility [Dieterich et al. 2007], and resulted in the identification of an amino acid change in BRDT responsible for male infertility in European and North African populations [Rousseaux et al. unpublished].

Conclusions

In the past years our various approaches for the identification of the most relevant factors and their subsequent functional characterization allowed to establish a list of potentially critical factors involved in the reorganization and epigenetic reprogramming of the mouse male genome.

Despite an important body of information on the biochemical and structural properties of the identified factors, these studies are now reaching limitations since no convenient *in vitro* model for spermatogenesis is available. In order to study these factors in a real physiological setting, there is a need to develop specific mouse models. Using a knock-in approach, four embryonic stem (ES) cell lines were established, each expressing one of our tagged factors. These include BRDT, a new bromodomain and AAA ATPase factor, the testis-specific H2B variant tH2B, and one of the testis-specific H2A variants discovered in our laboratory, H2AL2.

These models will help us to precisely determine the function of these critical factors in terms of interacting factors and the associated genomic regions. All of these efforts will hopefully lead to the establishment of the first molecular models for post-meiotic male genome reprogramming.

Declaration of Interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., et al. (2009) Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* **19**:1338–1349.
- Caron, C., Pivot-Pajot, C., Van Grunsven, L.A., Col, E., Lestrat, C., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2003) Cdyl: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Rep* **4**:877–882.
- Delaval, K., Govin, J., Cerqueira, F., Rousseaux, S., Khochbin, S. and Feil, R. (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *Embo J* **26**:720–729.
- Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A.K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., et al. (2007) Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet* **39**:661–665.
- Faure, A.K., Pivot-Pajot, C., Kerjean, A., Hazzouri, M., Pelletier, R., Peoc'h, M. et al. (2003) Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* **9**:757–763.
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2010) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* **277**:599–604.
- Govin, J. and Berger, S.L. (2009) Genome reprogramming during sporulation. *Int J Dev Biol* **53**:425–432.
- Govin, J., Caron, C., Escoffier, E., Ferro, M., Kuhn, L., Rousseaux, S., et al. (2006) Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* **281**:37888–37892.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**:3459–3469.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., et al. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**:283–294.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T. and Cairns, B. R. (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**:473–478.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., et al. (2000) Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**:950–960.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W.L., Dorsey, J., Schindler, K. et al. (2006) Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev* **20**:2580–2592.
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.L., et al. (2009) Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**:664–668.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2003) Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *Mol Cell Biol* **23**:5354–5365.
- Rousseaux, S. and Ferro, M. (2009) Epigenetics and Spermiogenesis. In: *Bioinformatics for Systems Biology* ed. Krawetz, S. Humana Press Springer, NY, pp. 105–117.
- Rousseaux, S., Reynoird, N., Escoffier, E., Thevenon, J., Caron, C. and Khochbin, S. (2008) Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* **16**:492–503.
- 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**:3507–3515.
- Wu, F., Caron, C., De Robertis, C., Khochbin, S. and Rousseaux, S. (2008) Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *J Reprod Dev* **54**:413–417.

IV. Objectifs et plan de travail

Pendant les phases post-méiotiques de la spermatogenèse, on assiste à une réorganisation globale de la chromatine. Les histones sont tout d'abord massivement acétylées avant d'être remplacées progressivement par des protéines extrêmement basiques comme les protamines. Ce changement de structure de la chromatine permet la compaction du génome à l'intérieur du spermatozoïde afin d'assurer, entre autre, sa protection jusqu'à la fécondation. Bien que ce phénomène soit très conservé au cours de l'évolution, on ne connaît pas les bases moléculaires qui régissent cet échange.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à décortiquer les mécanismes associés au remplacement des histones. Pour cela, je me suis intéressé à un facteur à double bromodomaine, appelé BRDT, exclusivement exprimé dans les cellules germinales mâles et capable de réorganiser la chromatine hyperacétylée (Pivot-Pajot et al., 2003). De plus, des souris porteuses d'une délétion du premier bromodomaine de BRDT, BD1, présentent une stérilité chez les mâles associée à des anomalies survenant lors de la spermiogenèse (Shang et al., 2007). L'ensemble de ces données suggère que ce facteur assure une fonction cruciale en relation avec la réorganisation post-méiotique du génome mâle.

L'objectif principal de mon travail de thèse a été d'explorer la fonction de BRDT, notamment de son premier bromodomaine, au cours de la spermatogenèse.

Une étude approfondie du modèle de souris délétées de BD1 m'a permis d'investiguer le lien entre cette protéine, la vague d'acétylation des histones et leur remplacement dans le contexte de la spermatogenèse *in vivo*. Des expérimentations *ex vivo* et des approches *in vitro* m'ont permis de compléter ce travail. Ainsi, j'ai pu caractériser la fonction physiologique du premier bromodomaine de BRDT et montrer son rôle crucial dans l'échange des histones acétylées par les protéines de transition et les protamines.

Afin d'élargir cette investigation et d'explorer les fonctions potentielles des autres domaines de BRDT, j'ai étudié la spermatogenèse chez des souris KO pour BRDT, qui présentent aussi une stérilité mâle, mais dont le phénotype montre une absence totale de cellules post-méiotiques. Un troisième modèle de souris a été obtenu suite à notre tentative de produire des souris porteuses d'une version tagguée de la protéine. En effet, après injection dans des blastocystes de cellules ES contenant une construction de BRDT tagguée, les chimères que nous avons obtenues se sont révélées stériles avec une absence totale de cellules méiotiques. L'exploration de ces deux modèles m'a permis de démontrer un rôle de BRDT, indépendant de la présence de BD1, dans la régulation du programme d'expression des gènes lors de l'entrée en méiose.

De plus, j'ai participé à d'autres travaux engagés par l'équipe sur l'étude du facteur BRDT. J'ai contribué au travail réalisé sur l'analyse structurale et fonctionnelle des bromodomains de BRDT et notamment leurs interactions avec les histones acétylées (Morinière et al, 2009). J'ai aussi été impliqué dans des analyses fonctionnelles d'une forme mutée de BRDT correspondant à un polymorphisme identifié chez des hommes infertiles. J'ai également été

associé à un projet d'analyse protéomique visant l'identification de facteurs potentiels du remodelage post-méiotique de la chromatine (Govin et al., 2011). Enfin, j'ai eu l'opportunité de décrire un certain nombre de modifications post-traductionnelles des histones conservées au cours de la gamétogenèse chez la souris et la levure (Govin et al., 2010).

Dans le chapitre 2 (résultats), je commencerai par décrire mon travail sur les différents modèles de souris BRDT avec les principaux résultats obtenus, présentés sous forme de manuscrit. Ensuite, je présenterai les travaux collaboratifs de l'équipe auxquels j'ai pu participer et qui ont donné lieu à des publications. Enfin je dévoilerai une partie des études en cours et certains résultats complémentaires.

CHAPITRE 2

RESULTATS

1. Les différentes fonctions de BRDT au cours de la méiose et de la spermiogenèse

- Introduction

Depuis longtemps on sait qu'une vague d'acétylation des histones précède l'enlèvement massif des histones au cours des phases post-méiotiques de la spermatogenèse. Bien que ce phénomène soit conservé chez de nombreux organismes les liens moléculaires entre ces deux événements restent complètement obscurs. Nos premières études ont permis l'identification d'une protéine à double bromodomaine, spécifique des cellules germinales, appelée BRDT qui pourrait intervenir dans ce processus. Cette hypothèse est soutenue par les récentes études structurales qui ont permis de montrer que BRDT est le premier facteur de liaison spécifique de la forme hyperacétylée de l'histone H4. Dans cette étude, nous avons utilisé différents modèles de souris : une souris exprimant une forme mutante de BRDT délétée de son premier bromodomaine, une souris invalidée génétiquement pour BRDT et une souris possédant une version tagguée de la protéine BRDT en carboxy-terminal. BRDT.

- Principaux résultats

Nous avons montré qu'en l'absence du premier bromodomaine, la protéine tronquée BRDT est suffisante pour que les cellules germinales progressent à travers la méiose et entrent en spermiogenèse. A l'inverse l'absence complète de BRDT engendre un arrêt en fin de prophase méiotique et une impossibilité des cellules à subir les deux divisions méiotiques. Dans les cellules post-méiotiques, le premier bromodomaine de BRDT est nécessaire pour le remplacement des histones par les protéines de transition. Au cours de la méiose, BRDT est important pour la régulation des programmes transcriptionnels nécessaires au bon déroulement de la spermatogenèse. L'ensemble de ces résultats montrent l'importance de BRDT dans la reprogrammation du génome mâle. Par ailleurs, les multiples fonctions de BRDT sont entièrement dépendantes de ses différents domaines.

Mon implication personnelle a porté sur la caractérisation complète de tous les modèles de souris BRDT, la gestion de ce projet et la discussion des résultats.

- Présentation de l'article soumis

Male germline meiotic progression and post-meiotic histone replacement involve independent domains of the double bromodomain factor Brdt.

Jonathan Gaucher, Fayçal Boussouar, Patrick Hery, Sylvie Jounier, Arnaud Depaux, Anne-Laure Vitte, Thierry Buchou, Debra J. Wolgemuth, Matthieu Gérard, Sophie Rousseaux, Saadi Khochbin.

Manuscript Number:

Title: Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt

Article Type: Research Article

Keywords: Histone acetylation; Histone variant; Bookmarking; Brd2; Brd3; infertility; inhibitor

Corresponding Author: Dr. Saadi Khochbin,

Corresponding Author's Institution: INSERM U823

First Author: Jonathan Gaucher, PhD

Order of Authors: Jonathan Gaucher, PhD; Faycal Boussouar, PhD; Patrick Hery, PhD; Sylvie Jounier, PhD; Arnaud Depaux, PhD; Anne-Laure Vitte, PhD; Philippe Guardiola, MD, PhD; Karin Pernet, PhD; Thierry Buchou, PhD; Debra J Wolgemuth, PhD; Matthieu Gérard, PhD; Sophie Rousseaux, MD, PhD; Saadi Khochbin

Abstract: Male germ cell differentiation is a highly regulated multistep process initiated by the commitment of progenitor cells into meiosis and major chromatin reorganization in haploid spermatids. We report that a single member of the double bromodomain BET factors, Brdt, is a master regulator of both meiotic divisions and post-meiotic genome repackaging. Functional integrity of Brdt's C-terminal "Brd4-like" domain is required for spermatocyte survival when the protein is first expressed at the onset of meiosis. In these cells, Brdt mediates the silencing of genes active in pre-meiotic progenitor cells and drives the meiotic divisions by activating essential genes required at meiosis I. Brdt requires its first bromodomain, BD1, to "prime" the transcription of genes in meiotic cells, which become fully active in early post-meiotic cells. At later post-meiotic stages BD1 becomes indispensable for the genome-wide exchange of histones. Brdt therefore uses its various domains in a developmentally controlled manner to organize the male genome.

Suggested Reviewers: Paolo Sassone-Corsi

Distinguished Professor and Chair, Department of Pharmacology, 2115 Gillespie Neuroscience
University of California, Irvine Irvine, California 92697-4625
psc@uci.edu

Expertise in male germ cells and transcription

Hiroyuki Sasaki MD, PhD

Division of Human Genetics, National Institute of Genetics

hisasaki@lab.nig.ac.jp

Expert in male germ cells and epigenetics

Shelley L Berger PhD

Departments of Cell & Developmental Biology, University of Pennsylvania

bergers@mail.med.upenn.edu

Expert in chromatin and epigenetics

Opposed Reviewers:



Grenoble, Feb. 9th 2012

Dear Dr. Kruger,

We would like to submit a manuscript to Cell reporting the first functional dissection of Brdt, a testis-specific member of the BET double bromodomain factors family, in the physiological setting of male germ cell differentiation.

Following a discussion with Drs. Bradner and Matzuk, whose manuscript entitled “*Small-molecules inhibition of BRDT for male contraception*” is under revision in Cell, we reached the conclusion that the two studies present very complementary approaches, one based on chemical genetics and the other on molecular genetics. Both studies explore the molecular basis of Brdt’s action in spermatogenic cell differentiation, one by targeting its bromodomains through the use of a specific bromodomain inhibitor and the other, by considering in parallel three mouse models: *Brdt*^{-/-} mice, mice expressing a truncated Brdt deleted for its first bromodomain, BD1, and mice expressing a Brdt with an altered C-terminal domain.

The contribution of our paper is the demonstration that Brdt is a master regulator of both meiosis and post-meiotic events.

We show that Brdt is a male-specific functional orthologue of Brd4, which uses its bromodomains to activate the transcription of a whole set of testis-specific genes through the binding of the pTEFb complex to its “Brd4-like” C-terminal domain.

Upon activation of its gene, in early spermatocytes, Brdt switches on a meiotic gene expression program including critical genes known to direct meiotic divisions. The absence of activation of one of them, *Ccna1*, encoding the testis-specific cyclin A1, is itself sufficient to explain the meiotic phenotype observed in *Brdt*^{-/-} testes. At the same time, in meiotic cells, Brdt silences genes normally active in progenitor pre-meiotic cells. An interesting finding is the requirement of Brdt’s first bromodomain, BD1, for an early “pre-activation” of post-meiotic genes in spermatocytes. This observation suggests the occurrence of a gene bookmarking process in meiotic cells, which is exclusively dependent on Brdt’s BD1.

Additionally, we demonstrate that after meiosis BD1 also controls important post-meiotic events such as the genome-wide replacement of hyperacetylated histones by the transition proteins.

Therefore our manuscript reports the first comprehensive characterization of a protein of the BET family in its physiological context. It demonstrates that Brdt uses its different domains, mainly the bromodomains, to shape the male genome in a cell type-dependent manner.

We believe that the consideration of this and Drs Bradner/Matzuk's manuscript, for a "back to back" publication would make a very unique "package", combining chemistry, structural biology, molecular and physiological dissection of the male gametogenesis relying on unique animal models.

They bring important new concepts, which together significantly increase our understanding of the functions of the BET proteins in general, and of the biology of male gametes, in particular, with many new translational applications.

For all these reasons, we hope that you will find these data of sufficient interest for publication in Cell.

Yours Sincerely,

Saadi Khochbin, Ph D.

Sophie Rousseaux, MD, Ph D.

Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt

Jonathan Gaucher¹, Fayçal Boussouar¹, Emilie Montellier¹, Patrick Hery², Sylvie Jounier², Arnaud Depaux², Anne-Laure Vitte¹, Philippe Guardiola³, Karin Pernet⁴, Thierry Buchou¹, Debra J. Wolgemuth⁵, Matthieu Gérard², Sophie Rousseaux^{1*}, Saadi Khochbin^{1*}.

SUMMARY

Male germ cell differentiation is a highly regulated multistep process initiated by the commitment of self-renewing progenitor cells into a defined number of mitotic divisions followed by entry into meiosis and major chromatin reorganization in haploid spermatids. We report here that a single member of the BET family of double bromodomain containing genes, Brdt, is a master regulator of both meiotic divisions and post-meiotic genome repackaging. Functional integrity of Brdt's C-terminal "Brd4-like" domain is required for spermatocyte survival when the protein is first expressed at the onset of meiosis. In these cells, Brdt mediates the silencing of genes active in pre-meiotic progenitor cells and drives the meiotic divisions by activating essential genes required at the prophase of meiosis I. Brdt requires its first bromodomain, BD1, to "prime" the transcription of genes in meiotic cells, which become fully active in early post-meiotic cells. At later post-meiotic stages BD1 becomes indispensable for the genome-wide exchange of histones. Brdt therefore uses its various domains in a developmentally controlled manner to organize the male genome.

Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt

Jonathan Gaucher¹, Fayçal Boussouar¹, Emilie Montellier¹, Patrick Hery², Sylvie Jounier², Arnaud Depaux², Anne-Laure Vitte¹, Philippe Guardiola³, Karin Pernet⁴, Thierry Buchou¹, Debra J. Wolgemuth⁵, Matthieu Gérard², Sophie Rousseaux^{1*}, Saadi Khochbin^{1*}.

1 - INSERM, U823; Université Joseph Fourier - Grenoble 1; Institut Albert Bonniot
Grenoble, F-38700 France

2 – CEA, iBiTec-S, Gif-sur-Yvette, F-91191 France

3 - INSERM, U892 ; Centre de Recherche sur le Cancer Nantes Angers et UMR_S 892;
Université d'Angers ; Plateforme SNP, Transcriptome & Epigénomique;
Centre Hospitalier Universitaire d'Angers; Angers, F-49000 France

4 - Unité Inserm U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Université Joseph Fourier, Site
Santé, 38700 La Tronche, France

5 - Dept. of Genetics and Development and Obstetrics and Gynecology, Columbia University
Medical Center, New York, NY 10032, USA

- Correspondence : Sophie Rousseaux (sophie.rousseaux@ujf-grenoble.fr) and Saadi Khochbin (Khochbin@ujf-grenoble.fr).

SUMMARY

Male germ cell differentiation is a highly regulated multistep process initiated by the commitment of self-renewing progenitor cells into a defined number of mitotic divisions followed by entry into meiosis and major chromatin reorganization in haploid spermatids. We report here that a single member of the BET family of double bromodomain containing genes, Brdt, is a master regulator of both meiotic divisions and post-meiotic genome repackaging. Functional integrity of Brdt's C-terminal "Brd4-like" domain is required for spermatocyte survival when the protein is first expressed at the onset of meiosis. In these cells, Brdt mediates the silencing of genes active in pre-meiotic progenitor cells and drives the meiotic divisions by activating essential genes required at the prophase of meiosis I. Brdt requires its first bromodomain, BD1, to "prime" the transcription of genes in meiotic cells, which become fully active in early post-meiotic cells. At later post-meiotic stages BD1 becomes indispensable for the genome-wide exchange of histones. Brdt therefore uses its various domains in a developmentally controlled manner to organize the male genome.

Short Title:

Brdt: a master regulator of spermatogenesis

One sentence summary:

The testis specific member of the BET family proteins, Brdt, establishes spermatocyte identity, drives meiotic and post-meiotic gene expression and mediates post-meiotic chromatin reorganization.

INTRODUCTION

With the recent availability of specific bromodomain inhibitors, the highly conserved double bromodomain factors of the BET family (Florence and Faller, 2001; Sanchez and Zhou, 2009) have become promising targets, especially in anticancer therapies (Muller et al., 2011). A precise understanding of their diverse activities is essential for a rational targeting of their functions. In this regard, *Brdt*, a BET member with a restricted expression in male germ cells, is a prototype of choice, since spermatogenesis involves very specific gene expression patterns (Sassone-Corsi, 2002), as well as major reorganization of chromatin (Gaucher et al., 2010). Indeed, one of the most dramatic examples of chromatin remodelling takes place during spermatogenesis, mainly during the post-meiotic phases, when an almost genome-wide histone removal occurs, associated with the assembly of new DNA-packaging structures formed by non-histone proteins (Rousseaux et al., 2008). Despite the fundamental nature of these events in the life cycle and in procreation, almost nothing is known on the molecular basis of the underlying mechanisms (Rousseaux et al., 2010). Since a correlation between histone hyperacetylation and histone removal had been observed in many organisms (Govin et al., 2004), we looked for bromodomain-containing proteins specifically expressed in male germ cells as potentially interesting candidate factors capable of establishing a functional link between these two events. An *in silico* search led to the identification of the double bromodomain protein, Brdt, with a testis specific pattern of expression, as a potentially important factor acting on acetylated chromatin in post-meiotic cells (Pivot-Pajot et al., 2003). This idea received strong support from our subsequent structural studies, which revealed the unusual capacity of its bromodomains to recognize a defined combination of acetylated histones. In particular, Brdt's first bromodomain, BD1, binds histone H4 only if a simultaneous acetylation of H4K5 and H5K8 occurs (Moriniere et al., 2009). Since

acetylation of both H4K5 and H4K8 is a characteristic of hyperacetylated H4 (Garcia et al., 2007; Zhang et al., 2002), Brdt was also identified as the first factor specific for hyperacetylated H4. Interestingly, this property of Brdt to recognize hyperacetylated H4, was confirmed *in vivo* independently, in living cells, in studies using a particular Brdt-H4 FRET probe (Sasaki et al., 2009). This hyperacetylation-dependent activity of Brdt allowed us to predict its action precisely when histone hyperacetylation occurs, at the time of histone replacement by transition proteins (TPs) (Moriniere et al., 2009). Another observation supporting this prediction was that male mice expressing Brdt deleted of its BD1, showed defective spermatogenesis (Shang et al., 2007), with abnormalities appearing in post-meiotic cells exactly when spermatids begin their elongation and exchange their histones for TPs.

To unravel the functions of Brdt, we explored spermatogenesis in three mouse models, which enabled us to demonstrate that Brdt is one of the most critical factors involved in male genome programming. Indeed, our parallel detailed molecular studies of *Brdt* KO mice and of mice expressing a truncated Brdt, deleted of its BD1, highlighted essential roles of Brdt and more specifically, of its BD1, in meiotic and in haploid cells. A third mouse model, expressing a Brdt C-terminal domain with an altered capacity to recruit the RNA pol II kinase complex pTEFb, demonstrated the importance of this domain and its essential role in spermatocyte survival.

Altogether, we provide here the first thorough molecular analysis of the activity of a BET factor in its physiological context and shed light on its context and domain-dependent activity.

RESULTS

Brdt gene activation at the onset of meiosis

As a first step toward the understanding of Brdt's function, its expression during spermatogenic differentiation was determined at the mRNA and protein levels during the first wave of spermatogenesis, as well as in adult mouse testis. First, RNA extracted from pre-pubertal and adult mouse testes at time points corresponding to defined steps of spermatogenesis was used to monitor the presence of *Brdt* mRNA. [Figure 1A](#) shows that the first detectable accumulation of Brdt mRNA corresponds to a particular period when type B spermatogonia give rise to early meiotic cells (pre-leptotene, leptotene and zygotene) at 10-12 days post-partum (dpp), producing a clearly detectable protein at 12 dpp ([Figure 1B](#)). The activity of the *Brdt* promoter was visualized using a mouse strain driving the expression of the *lacZ* gene under *Brdt* gene promoter (*Brdt*^{+/*lacZ*}). Sections of seminiferous tubules of adult mouse testes were stained for β -galactosidase activity and the results confirmed both the absence of *Brdt* expression in spermatogonia and its expression in spermatogenic cells at later stages ([Figure 1C](#)). Hence, according to the timing of expression of its gene, Brdt should first act in spermatogenic cells in meiotic prophase.

Brdt ensures critical functions before the first meiotic division

To begin to understand Brdt's function in spermatocytes, testes from *Brdt*^{-/-} mice were analyzed morphologically for the occurrence of the first detectable defects. [Figure 2A](#) shows a total absence of post-meiotic cells in adult mice testes, since no cells expressed the acrosomal protein, Sp56, in the seminiferous tubules sections, and no round spermatids could be detected in DNA stained tubule sections. The staining of histological sections of these testes with an antibody specific for H3 phosphorylated at serine 10 (H3S10Ph), showed a dramatic decrease in cells bearing this histone mark ([Figure 2B](#)), suggesting that a blockage occurs at the end of

the meiotic prophase when chromosomes should undergo compaction in preparation for the first meiotic division. A detailed analysis of spermatocytes in seminiferous tubule sections showed that earlier meiotic events occur normally, including chromosome pairing, synaptonemal complexes and sex body formation (Figure 2C). Therefore Brdt's action becomes specific and indispensable in late pachytene spermatocytes, but its absence does not significantly alter the total number of pachytene cells (a comparable number of cells containing the synaptonemal complexes and γ H2A.X foci, was observed in both genotypes, data not shown).

Brdt is a major spermatocyte transcriptional regulator

To investigate the molecular basis of Brdt's action in spermatocytes, transcriptomic analyses of *Brdt*^{-/-} spermatogenic cells at 17 and 20 dpp were carried out. These timings were chosen since they correspond to an accumulation of pachytene spermatocytes (17 dpp) and to the pachytene/diplotene transition (20 dpp), respectively, and are before the appearance of a visible phenotype in the *Brdt*^{-/-} animals. The results at 20 dpp show that Brdt controls the expression levels of more than 3000 genes, with approximately two-thirds of the genes being down-regulated and one-third up-regulated in the absence of Brdt (corresponding to Brdt-activated and Brdt-repressed genes respectively). At 17 dpp, 10% of these genes are already affected, but, in contrast to 20 dpp, only Brdt-activated genes are affected (Figure 3A).

This observation of a transcriptional regulatory role of Brdt suggested that it could be a tissue-specific paralogue of Brd4, with a "Brd4-like" function. Indeed, a previous report demonstrated a striking sequence similarity between the C-terminal region of Brd4 with Brdt among all BET members (Bisgrove et al., 2007). This report also showed that this domain in Brd4 and in ectopically expressed Brdt is required for the recruitment of positive transcription elongation factor b (P-TEFb), suggesting that Brdt's transcriptional function could involve the

same mechanism as Brd4. One prediction of this hypothesis is that in spermatogenic cells, at least a fraction of Brdt should be found in a complex with P-TEFb components, cyclin T1 and Cdk9. Extracts from adult mouse testes were therefore subjected to immunoprecipitation by anti-Cdk9 and anti-cyclin T1 antibodies to test their interaction with Brdt. The same experiment was carried out in parallel with extracts from *Brdt*^{-/-} testes, which gave an indication of the specificity of the experiment. [Figure 3B](#) shows that significant amounts of Brdt could be co-immunoprecipitated with both Cdk9 and cyclin T1 only from wild type testes. These data confirmed that Brdt is a true functional tissue-specific paralogue of Brd4.

Brdt is a major determinant in the establishment of spermatocyte identity

Having established that Brdt has the potential to control a specific gene expression program, we decided to exploit our transcriptomic data to uncover the characteristics of Brdt-regulated genes. The list of Brdt regulated genes at 20 dpp was sub-divided into two groups: genes requiring Brdt for their activation (Brdt-activated genes) and genes repressed in the presence of Brdt (Brdt-repressed genes). First, we asked whether these Brdt-regulated genes are normally specifically or predominantly expressed in a particular mouse tissue. Mouse tissue transcriptomic data (available from the GEO website: GSE10744, GSE12950 and GSE9954) were downloaded and the expression pattern of our lists of Brdt-activated and Brdt-repressed genes in different tissues was established. As shown in [Figure 4 \(left panel\)](#), almost all Brdt-activated genes are predominantly expressed in the testis, while the Brdt repressed genes show no particular tissue specificity of expression. Interestingly, this profile is also visible with the Brdt-activated genes at 17 dpp ([Figure 4](#)). We then investigated whether these Brdt-regulated genes, testis-specific or not, would show any particular patterns of expression in spermatogenic cells. To this end, we downloaded available transcriptomic data corresponding to the staged mouse spermatogenic cells: spermatogonia, spermatocytes and post-meiotic cells

(GSE21749 and GSE4193). [Figure 4 \(right panel\)](#) shows that the Brdt-activated testis-specific genes are all switched on in spermatocytes, and are either fully active or just “primed” in these cells, the latter becoming fully active in post-meiotic cells. None of these genes are expressed in spermatogonia, in agreement with the absence of Brdt expression in these cells ([Figure 1](#)). The complete opposite occurs with Brdt-repressed genes, which are nearly all predominantly expressed in spermatogonia ([Figure 4, right panel, Brdt-repressed genes](#)). Together, these data show that Brdt is a major determinant of spermatocyte cell identity, turning on a spermatocyte-specific gene expression program and directly or indirectly repressing pre-meiotic genes.

Brdt is essential to the completion of meiosis I

We then addressed the question of whether some of the Brdt-regulated genes could give a molecular explanation for the meiotic arrest occurring in the absence of Brdt. Within the list of genes repressed by the absence of Brdt, we noticed a critical meiotic gene, *Ccna1*, which was strongly down regulated (14-fold compared to control according to our 20 dpp transcriptomic analysis). *Ccna1* is a testis-specific A-type cyclin gene, known to be expressed in spermatocytes and to be absolutely essential for spermatocytes to enter into the first meiotic division (Liu et al., 1998; Nickerson et al., 2007). We confirmed the specific down-regulation of *Ccna1* gene in the absence of Brdt by RT-qPCR approach ([Figure 5A](#)). Pachytene spermatocytes appear at 14 dpp and accumulate up to 20 dpp when diplotene spermatocytes become visible. Using testes from aged-matched wild type and *Brdt*^{-/-} mice at different times of pachytene spermatocytes differentiation, we monitored the expression of *Ccna1*, as well as of two other genes, *Hspa2* and *Hlt*, known to be activated in pachytene cells but whose expression was not significantly affected by the absence of Brdt (according to our transcriptomic analysis). [Figure 5A](#) shows that in wild type testes, the appearance of

pachytene spermatocytes is associated with the activation of the three genes, but that *Ccnal* is expressed after the other two, at late pachytene/diplotene stage at 20 dpp. These experiments confirm first that, in the absence of *Brdt*, pachytene spermatocytes are present and second that *Brdt* specifically controls the expression of *Ccnal* as opposed to other pachytene-specific meiotic genes. Additionally, a ChIP-PCR demonstrated the presence of *Brdt* on the *Ccnal* promoter, while no *Brdt* signal could be observed in a parallel ChIP performed on *Brdt* KO cells (Figure 5A, lower panel), suggesting a direct transcriptional role for *Brdt* in *Ccnal* gene activity.

Finally, the published phenotype of *Ccnal* KO mice (Liu et al., 1998) is very similar to that exhibited here in the total absence of *Brdt*, in particular the absence of post-meiotic cells with a significant decrease of H3S10ph positive meiotic cells (Figure 2A and 2B) and an abnormal centromere clustering (Nickerson et al., 2007) (Figure 5B, Figure S1), suggesting that the absence of *Ccnal* expression in *Brdt*^{-/-} spermatocytes could by itself explain the phenotype observed in *Brdt* KO animals.

The C-terminal domain of *Brdt* is critical for its activity

The hypothesis of a critical role of the C-terminal domain of *Brdt* as being responsible for pTEFb recruitment during male germ cell differentiation received unexpected support from another mouse model: chimeric mice with male germ cell expressing a C-terminal tagged *Brdt*. In order to tag the endogenous *Brdt*, three epitopes (tap-tag) were introduced at the 3' end of *Brdt*'s last exon in mouse embryonic stem (ES) cells (Figure S2A). Two clones (AT1 agouti, *Brdt*^{+/tag}) were injected into blastocysts from C57BL/6 (black *Brdt*^{+/+}) mice. Unexpectedly, in chimeric mice, whenever heterozygous *Brdt*^{+/tag} ES cells significantly contributed to testis formation, testes were of smaller volumes and reduced weight as compared to wild type testes (Figure 6A), and seminiferous tubules were devoid of meiotic and post-meiotic cells (Figure

6B). The same knock-in, in an independent ES cell line, 46C, resulted in chimeric mice displaying exactly the same phenotype (not shown). In addition, AT1 ES cells were used to tap-tag another testis-specific gene, *th2b* encoding the testis-specific histone H2B variant, TH2B, known to be expressed in spermatocytes (Figure S2B), and not only was germline transmission successful and a mouse strain established, but also the tagged proteins were expressed, with no apparent toxicity in spermatocytes (Figure S3), demonstrating the specific effect of the C-terminal tagged Brdt and not of the tag itself.

These experiments indicate that the tag alters critical functions of Brdt, as soon as the protein is expressed in early spermatocytes. In line with this conclusion, in testes from 14-day old chimeric mice, only a few days after the activation of the *Brdt* gene, spermatocytes massively disappear and most of the remaining cells are apoptotic (Figure 6C).

Due to its C-terminal position, we hypothesized that the tag could interfere with the capacity of Brdt's "Brd4-like" C-terminal domain to recruit pTEFb complex (Bisgrove et al., 2007). Accordingly, using the ectopic expression of different Brdt constructs, we explored pTEFb recruitment by the C-terminal domain of Brdt. We first confirmed that the Brdt's C-terminal region is required for pTEFb recruitment (Figure 6D, ΔC), and second we observed that the presence of the tag in its vicinity leads to a remarkable enhancement of pTEFb recruitment (Figure 6D, FL TAG). This experiment could not be done in spermatogenic cells because of the rapid disappearance of spermatogenic cells from testis of chimeric animals (Figure 6C). These results are in agreement with the finding by Verdin's laboratory on the role of Brdt/Brd4 C-terminal conserved domain in the regulation of transcription (Bisgrove et al., 2007).

Pre-programming of post-meiotic genes by Brdt's BD1

To explore the specific contribution of BD1 in Brdt's transcriptional activity, we performed a transcriptomic analysis of 20 dpp testes from *Brdt*^{BD1/ΔBD1} mice. The results show first that 100% of the genes affected by the absence of BD1 are included in the *Brdt*^{-/-} differentially expressed genes (Figure 3A), giving high confidence in the robustness and reliability of the transcriptomic data. These data show that BD1 is required for the transcriptional activation of more than half of the genes whose activation is also affected by the total absence of Brdt (down-regulated in *Brdt*^{-/-} testis). Interestingly, within the affected genes, almost none are up-regulated in the *Brdt*^{BD1/ΔBD1} testes, demonstrating that BD1 has no role in gene repression (Figure 3A). To better characterize the BD1-dependent genes, we examined their expression patterns in various mouse tissues and in spermatogenic cells (using the same approach as described above). Figure 7A shows that, like the other Brdt-activated genes, nearly all these genes are testis-specific, but their pattern of expression during spermatogenesis reveals that the majority of them belongs to the category of genes “primed” in spermatocytes and fully active in post-meiotic cells. At this point, it became important to confirm the existence of these two categories of Brdt-activated genes, by performing our own transcriptomic analyses. Whole genome gene expression profiles of purified spermatocytes and round spermatids isolated from adult wild type testes in two independent experiments were established, and the expression patterns of the BD1-dependent Brdt-activated genes were measured. This analysis confirmed the expression profiles of these two categories of meiotic and post-meiotic genes with an almost complete overlap (Figure 7B).

We could not detect any important meiotic genes in the category of genes whose full activation in spermatocytes depended on Brdt's BD1. In agreement with this observation, none of the pachytene-specific genes affected in *Brdt*^{-/-} spermatocytes, *Ccnal*, *Hspa2* nor *hlt*, were significantly affected by Brdt lacking its BD1 (Figure 5A).

Brdt's BD1 is essential to link histone removal to transition proteins assembly

To test our original hypothesis of a potential role of Brdt in the replacement of hyperacetylated histones in elongating spermatids, we focused our attention on post-meiotic cells, where the global and genome-wide histone hyperacetylation occurs. We first questioned whether histone hyperacetylation itself normally occurs in the absence of a functional Brdt BD1. [Figure S4](#) shows that elongating spermatids from *Brdt*^{BD1/ΔBD1} testes contain hyperacetylated histones, as in normal elongating spermatids. Because of the capacity of Brdt's BD1 to specifically act on hyperacetylated histones, we questioned whether the replacement of histones is maintained in the absence of BD1. The analysis of elongating spermatids from *Brdt*^{BD1/ΔBD1} mice showed that, although transition proteins (TPs) and protamines (Prms) are synthesized, they remain in the cytoplasm ([Figure 7C](#)) and histone replacement does not occur, as judged by the co-detection of TH2B and protamine 1 ([Figure 7D](#)). This situation is never observed in wild type spermatids, where Prm1 accumulates in the nucleus after the disappearance of histones ([Figure 7D](#)). The absence of genome compaction in elongating cells expressing a BD1-less Brdt is also clearly visible by electron microscopy, comparing elongating spermatids at the same stage of acrosome development ([Figure 7E](#)). These data suggest that BD1 is required for the post-meiotic re-organization of the male genome and directly and/or indirectly mediates the replacement of acetylated histones. Additionally, we observed that, when TPs and Prms accumulate in the cytoplasm of elongating spermatids of *Brdt*^{BD1/ΔBD1} mice, BD1-less Brdt is also trapped in the cytoplasm ([Figure S5](#)).

DISCUSSION

The functional dissection of Brdt's activity reported here opens the door to important conceptual developments and brings to light crucial and heretofore unknown aspects of mammalian spermatogenesis. First, Brdt is critical for the activation of hundreds of testis-specific genes, which are fully activated either in spermatocytes or in post-meiotic spermatids. Therefore Brdt acts as a transcriptional activator whose action becomes visible at the time when pachytene spermatocytes appear and culminates at the late pachytene/diplotene transition. In these cells, Brdt directly or indirectly controls the activity of approximately 3000 genes, two-thirds and one-third of which are respectively activated or repressed in a Brdt-dependent fashion. These include about 1000 genes, which would normally be repressed, but which become active in the absence of Brdt. Our data do not allow us to show if this gene repression is directly mediated by Brdt, or is due to specific repressors activated by Brdt at earlier stages. The characterization of these Brdt-repressed genes shows that they are all normally active in spermatogonia and should be silenced in spermatocytes. In other words, Brdt is necessary to prevent the expression of spermatogonia genes in spermatocytes. All the genes requiring Brdt to be active in spermatocytes are predominantly expressed in testis and, according to their pattern of expression, can be divided into two distinct categories. The first (category 1) is a group of genes fully active in meiotic cells whereas the second (category 2) corresponds to genes pre-activated in spermatocytes but becoming fully active after the completion of meiotic division. In spermatocytes from mice expressing a truncated Brdt lacking its BD1, the deregulated genes were all down regulated, showing that BD1 only contributes to the Brdt transcriptional activating function but not to its repressive activity. Moreover, the majority of these genes belonged to the category 2 of testis-specific genes, meaning that in spermatocytes, Brdt, *via* its BD1, "primes" a specific category of genes, which will become fully active in round spermatids, after completion of meiosis. The BD1 of

Brdt recognizes a specific histone acetylation code and is essential for its stable binding to hyperacetylated and condensed chromatin (Moriniere et al., 2009; Pivot-Pajot et al., 2003). Very recently, an elegant study demonstrated the occurrence of a “book-marking” phenomenon responsible for rapid gene activation immediately after mitotic division, in early G1 cells, due to the recognition by Brd4 of increased levels of H4K5ac on a previously activated locus (Zhao et al., 2011). It is therefore probable that Brdt assumes a “Brd4-like” function also in post-meiotic cells, by controlling the kinetics of their activation immediately after the completion of meiosis.

This work also highlights another aspect of the “Brd4-like” nature of Brdt, by the demonstration of the presence of Brdt in the pTEFb complex in spermatogenic cells. This observation is perfectly in line with the presence in Brdt of a C-terminal domain similar to that of Brd4, shown to be involved in the recruitment of pTEFb (Bisgrove et al., 2007; Schroder et al., 2012). It is also in agreement with the highly deleterious effect of a tag placed adjacent to this domain, as shown here. By introducing the same tags at the C-terminal part of TH2B, which is also expressed in spermatocytes, we found that, in contrast to Brdt^{tag}, TH2B^{tag}-expressing spermatocytes appear normal and no meiotic defects were observed in these mice. Altogether, these data highlight the critical role of the Brdt C-terminal domain in its function as soon as the protein accumulates in early meiotic cells.

Finally, from our previous structural studies demonstrating that Brdt’s BD1 is the first bromodomain known to specifically recognize hyperacetylated histone H4 (Moriniere et al., 2009), we anticipated that BD1 should mainly act in elongating spermatids, during the genome-wide hyperacetylation of histones which occurs before their replacement. In the absence of a functional BD1, the predicted defects in the removal of hyperacetylated histone were exactly confirmed by our observations. Indeed, in *Brdt*^{BD1/ΔBD1} mice, while histone replacing proteins, TPs and Prms, were synthesized and histone hyperacetylation occurred,

histone removal and the assembly of TPs and Prms did not happen. TPs and Prms accumulated in the peri-nuclear regions of these elongating spermatids, where the truncated BD1-less Brdt was also trapped. This latter observation suggests that Brdt may provide a link between hyperacetylated nucleosomes and transition proteins and somehow mediate their exchange. In the absence of interaction with hyperacetylated histones due to the lack of Brdt BD1, only the interaction of Brdt with non-assembled TPs is observed.

In summary we present here a comprehensive functional study of a member of the BET family, demonstrating for the first time in a physiological setting that the bromodomains can have specific roles and act in a stage-dependent manner. This work opens the way to new strategies to specifically target their activity.

Experimental Procedures

Mouse models

Brdt^{BD1/ΔBD1} mice were previously described (Shang et al., 2007). *Brdt* KO mice were obtained from the International KnockOut Mouse Consortium, Wellcome Trust Sanger Institute, UK, and their genotype confirmed. The ‘knockOut-first’ allele (tm1a) contains an IRES :lacZ trapping cassette and floxed promoter-driven *neo* cassette inserted into the intron of the *Brdt* gene, disrupting *Brdt* function. The construction of the targeting vector, electroporation of C57BL/6N ES cells and generation of mice bearing a null mutation of *Brdt* was described in (Skarnes et al., 2011). *Brdt* and *th2b* tap-tagging was accomplished by adapting the gap-repair recombineering technique from (Liu et al., 2003) to construct our *Brdt* and *th2b* tap-tag targeting vectors for homologous recombination in ES cells (AT1 and 46C lines). Animal experiments were approved by *ad hoc* committees and all the investigators directly involved, have an official animal-handling authorisation obtained after a two weeks intensive training and a final exam. Knock-in through homologous recombination in ES cells is described in detail in the extended experimental procedures.

Analyses of testis sections and spermatogenic cells

Spermatogenic cells were analyzed either on sections of paraffin-embedded AFA-fixed testes or seminiferous tubules or testis “imprints” on slides, as previously described (Govin et al., 2010; Govin et al., 2007; Hazzouri et al., 2000).

Spermatogenic cell preparations for *in situ* analysis

Staged seminiferous tubules: Mice were sacrificed by cervical dislocation. Testis and Epididymis were biopsied, washed in PBS. Albuginea was removed and seminiferous tubules were dissected at 4°C in DMEM media with 100mM sucrose. Microdissection and isolation

of staged tubules was carried out under a transillumination microscope, as previously reported (Kotaja et al., 2004). Tubules were cut into 2-mm segments and each segment was “squashed” by pressure between a cover-slip and the slide, prefixed 20s in liquid nitrogen, 10min in 90% ethanol, air dried, and processed for immunofluorescence or β -galactosidase activity staining. Testis “imprints” were prepared as follows. Testes were frozen in liquid nitrogen, cut in two parts and directly applied on slides by apposition. Each slide was fixed in 90% ethanol, air dried, and processed for immunofluorescence staining. X gal staining for Brdt expression is detailed in the extended experimental procedures.

Immunofluorescence and immunohistochemistry and microscopy

Protein visualization by immunofluorescence was carried out as previously described (Govin et al., 2007). Protein detection by immunohistochemistry was performed exactly as described in (Hazzouri et al., 2000). The antibodies used were as follows: goat polyclonal anti TP2 antibody 1/250 (Santa Cruz biotechnology), and rabbit polyclonal anti TP1 antibody 1/500 (gift from Dr Kistler, University of South Carolina), rabbit polyclonal anti H4ac4 antibody 1/500 (Millipore), mouse monoclonal anti Prm1 and Prm2 antibodies 1/250 (Shaltech), rabbit polyclonal anti-acrosomal protein (Sp56) antibody 1/200, rabbit polyclonal anti H3S10Ph antibody 1/500 (Millipore), mouse monoclonal anti Sycp3 antibody 1/500 (Abcam), rabbit polyclonal anti Sycp1 antibody 1/500 (Abcam), rabbit monoclonal anti phosphoH2Ax 1/500 (Epitomics). Anti-Brdt antibodies were generated either as described in (Govin et al., 2006) or in (Shang et al., 2007). The secondary antibodies were Alexa 488 or Alexa 546 fluor conjugates (Molecular Probes, Invitrogen). Apoptotic cells were detected by TUNEL assay, using a Millipore kit following the furnished instructions.

Electron Microscopy morphological analysis is described in extended experimental procedures.

PCR based analyses

The degree of AT1 ES cell (129 strain) contribution to C57BL/6 mice germline was evaluated by PCR on testis DNA as described in (Cho et al., 2001). Gene expression analysis was carried out on purified RNA using appropriate sets of primers, listed in the extended experimental procedures. Chimeric mice testis DNA genotyping is also detailed in the extended experimental procedures.

Transcriptomic analyses

The transcriptomes of age-matched testes from control (wild type) and mutant mice as well as fractionated spermatogenic cells, were obtained using the Illumina mouse WG-6 V2.0 gene expression array. For testes, three independent experiments were performed using two mouse models: *Brd**t* *KO* at 17dpp or at 20dpp, or *Brd**t*^{*BD1/ΔBD1*} mice at 20dpp and age-matched wild type testes (5 or 6 replicates of the mutated and of the corresponding controls for each model). Spermatogenic cell suspensions were fractionated as described previously (Pivot-Pajot et al., 2003) from wild type mice or from *Brd**t*^{*BD1/ΔBD1*} adult mice and fractions corresponding to spermatocytes and round spermatids used for further analyses. Testis and fractionated cells RNA was harvested with TRI Reagent (Sigma), and RNA was isolated following the manufacturer's instructions.

The detailed experimental procedure is described in extended experimental procedures.

Analyses of expression patterns using online expression data

The patterns of expression of the genes, found differentially expressed in *Brd**t* *KO* and *Brd**t*^{*BD1/ΔBD1*} mice, were analyzed in normal mouse tissues and during spermatogenesis using transcriptomic data available online as described in (Tan et al., 2011). The raw expression

data (.CEL files) of four studies (available from the GEO website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>; GSE10744, GSE12950, GSE9954, GSE21749 and GSE4193) were downloaded from the GEO website and RMA normalized using the GeneSpring GX software (Agilent Technologies). The analysis was carried out as described in (Tan et al., 2011). The expression patterns are represented as heatmaps using the Permutmatrix software (<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/index.html>).

Immunoprecipitation and ChIP analyses

An anti-Brdt ChIP was performed on micrococcal digested chromatin as described by Tan et al. (Tan et al., 2011). Immunoprecipitation of Cdk9 and CyclinT1 was as follows.

Testis or HeLa cell extracts were used for immunoprecipitation using anti-Cdk9 and anti-CyclinT1 rabbit polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Lysis, immunoprecipitation and washes were performed in LSDB250 buffer (HEPES 50mM pH8, MgCl₂ 3mM, KCl 250mM, Glycerol 20%, NP40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche). Bound proteins were migrated on 4-12% Bis-Tris SDS PAGE (NuPAGE Precast gel, Invitrogen), transferred on a nitrocellulose membrane (Hybond C+, GE), and probed with an anti Brdt rabbit polyclonal antibody (produced against Brdt C-terminal peptide), as well as with anti-Cdk9 and anti-CyclinT1.

Acknowledgements:

ES cells 46C were a gift from Philippe Avner (Institut Pasteur, Paris) and AT1 cells a gift from Muriel Vernet (CEA, Fontenay-aux-roses, France). The *Brdt* tap-tag project was initiated in the frame of the ANR-REGULOME consortium in SK and MG laboratories. Paraffin embedding and histology sections were performed on the histology platform of Grenoble Medical School. The Brdt project is supported by ANR EpiSperm1&2 grants and its cancer oriented developments by INCa-DHOS and “ARC libre” funds. JG was a recipient of a

PhD fellowship by “Région Rhône-Alpes” “cible” grant to SR and ARC fellowship for his 4th year. SR and SK are recipients of a “contrat d’interface” from INSERM-Aviesan. FB was a recipient of “contrat jeune chercheur” INSERM, from 2006 to 2011). DJW’s contribution is supported by NIH grant 1R01. We wish to thank Bin Berkovits (from DJW’s lab.) for critical reading of the manuscript.

Figure legends

Figure 1. Brdt is activated at the onset of meiosis

The expression of *Brd*t/*Brd*t was analyzed either by Q-RT-PCR (A) or western blots (B). The histograms represent the mean values of biological duplicates (normalized with respect to *Actin* as a control gene and to *Brd*t expression in 50 days-old wt testes) (bars indicate standard deviations). β -galactosidase activity, driven by *Brd*t gene promoter, was assessed in seminiferous tubules sections (C, lower panels: “X-gal”). The corresponding sections were stained by Hoechst (C, upper panels: “Hoechst”). Scale bars, 10 μ M.

Figure 2. Brdt is required at the late stages of male meiotic prophase

(A) Testis histological sections, from 50 dpp *Brd*t^{+/-} and *Brd*t^{-/-} animals, either stained by PAS/HE (Periodic Acid Schiff / Hematoxyline Eosine), or analyzed by immunohistochemistry (IH) of the post-meiotic specific acrosome antigen, Sp56, without counter staining (left and middle panels respectively). Scale bars, 50 μ M. A higher magnification of adult testis sections at 50 dpp, stained with Hoechst is represented (right panels). A dotted line separates meiotic cells (lower left side of the panel) from post-meiotic cells (upper right side of the panel). Scale bars, 10 μ M.

(B) Testis histological sections, from 50 dpp *Brd*t^{+/-} and *Brd*t^{-/-} animals stained by IH with an antibody against S10 phosphorylated histone H3. Scale bars, 50 μ M.

(C) Synaptonemal complex components, Sycp1 and Sycp3, and sex body marker γ H2AX, were co-detected as indicated, in seminiferous tubule sections of *Brd*t^{+/-} and *Brd*t^{-/-} mice. Scale bars, 5 μ M.

Figure 3. Brdt is a major spermatocyte transcriptional regulator

(A) The transcriptome of the *Brdt*^{-/-} testes at 20 dpp shows a total of 3017 genes affected by the absence of Brdt, of which 1153 genes were repressed by Brdt (upregulated in *Brdt*^{-/-} testes compared to heterozygous testes) and 1864 genes activated by Brdt (downregulated in *Brdt*^{-/-} testes compared to heterozygous testes). The genes differentially expressed in the testes of *Brdt*^{-/-} mice at 17 dpp (n=337) were all included in those down regulated in the *Brdt*^{-/-} testes at 20 dpp. The genes affected by the absence of the first bromodomain BD1 ($\Delta BD1/\Delta BD1$) all corresponded to a subset of down-regulated genes in the *Brdt*^{-/-} testes (n=1040).

(B) Extracts from wild type (WT) or *Brdt*^{-/-} (KO) testes were used for an immunoprecipitation using either an anti-Cdk9 (upper panels) or an anti-cyclinT1 antibody (lower panels). Co-immunoprecipitation of Brdt was detected using an anti-Brdt antibody (indicated).

Figure 4. Brdt activates testis-specific spermatocyte genes and represses genes active in pre-meiotic cells.

RNA extracted from testes at the indicated postnatal ages from *Brdt*^{+/-} (Ctrl, n=6) or *Brdt*^{-/-} (n=6) was used for a transcriptomic analysis (not shown). The differentially expressed genes (fold change threshold of 1.5), between *Brdt*^{+/-} and *Brdt*^{-/-} mice at 17 dpp and at 20 dpp were respectively listed (not shown) and their expression status was retrieved from mouse tissue transcriptomes (left panel) and staged spermatogenic cell transcriptomes (right panel) and shown as heatmaps. The low versus high expression levels are represented on a green to red scale. “Soma” represents the following mouse adult tissues from left to right: Ovary, embryonic stem cells, placenta, foetus, brain, eye, pituitary, adipose, adrenal, bone marrow, heart, lung, muscle, salivary, seminal, small intestine, spleen and thymus.

Figure 5. Brdt specifically controls the expression of *Ccna1* gene. (A) RNA was extracted from testes at the indicated postnatal ages and the expression of three meiotic genes *Ccna*, *Hlt* and *Hspa2* (Dix et al., 1996), was monitored. The right panels show the expression of the same genes in testis from the three indicated genotypes, at 20 dpp. Bottom panel: Micrococcal nuclease digested chromatin fibres were immunoprecipitated from wild type or *Brdt*^{-/-} testis using an anti-Brdt antibody and the *Ccna1* promoter region was analyzed by Q-PCR in input as well as in the immunoprecipitated materials (“Brdt IP”, values expressed relative to the input value, set at 1). Data represent two independent experiments (bars indicated the standard deviations).

(B) Synaptonemal complex component, Sycp3 (green), and centromeric proteins CREST (red), were co-detected as indicated, in seminiferous tubule sections of *Brdt*^{+/+} and *Brdt*^{-/-} mice. The panels show higher magnifications of two representative spermatocytes either wild type or *Brdt*^{-/-}. A general view of the spermatocytes is also shown. Scale bars, 5 µM.

Figure 6. C-terminal-tagged Brdt severely interferes with spermatogenic cell differentiation.

(A) The degree of the contribution of AT1 *Brdt*^{+tag} ES cells (129), to embryogenesis was evaluated by coat colour (left panel) and more specifically to testis formation by genome-type specific PCR on testis DNA thanks to the strain-specific polymorphism of the *D2Mit94* locus (middle upper panel). Chimeric mice testes were grouped into three classes according to the PCR-based estimation of their level of chimerism and their respective weights were plotted as a function of postnatal age (right panel). Representative testes from 49 days old mice belonging to the three indicated classes are shown on the middle lower panel. (B) Testes from the three classes of 14 days old chimeric mice were fixed and stained by Hoechst (scale bars,

50 μ M). (C) TUNEL assay was carried out on age-matched wild type or chimeric mouse testes harvested at 14 dpp. Scale bars, 50 μ M.

(D) The C-terminal tag stabilizes Brdt-pTEFb interaction. HeLa cells were transfected with the indicated GFP-Brdt constructs. Δ C corresponds to GFP-Brdt deleted of its C-terminal region (Pivot-Pajot et al., 2003). FL and FL TAG correspond to the full-length GFP-Brdt without or with the C-terminal tag, respectively (using the same tag as in the knock-in approach). After immunoprecipitation using an anti-cyclinT1 (upper panels) or an anti-Cdk9 antibody (lower panels), the presence of co-immunoprecipitated GFP-Brdt was monitored using an anti-GFP antibody. The positions of the GFP-Brdt fusion proteins in the input and immunoprecipitated materials are indicated by red arrows.

Figure 7. Post-meiotic functions of Brdt's first bromodomain

(A) RNA was extracted from pre-pubertal 20dpp testes from *Brdt*^{+/+} (n=5) and *Brdt*^{BD1/ Δ BD1} (n=5) mice or from fractionated spermatocytes and round spermatids and submitted to transcriptomic analysis as in Fig. 4 (not shown), and the differentially expressed genes were listed and analyzed exactly as presented in the legend of Figure 4; (B) The patterns of expression of these genes differentially expressed in *Brdt*^{BD1/ Δ BD1} 20dpp testes were compared between adult spermatogenic meiotic (n=10) and post-meiotic (n=10) cells in two independent experiments.

An immunofluorescence detection of TP2 and of the Prm1 and Prm2 (C) and a co-detection of the histone TH2B (green) and of Prm1 (red) (D) were performed; Scale bars, 5 μ M; (E) A comparative observation by electronic microscopy (EM) of two representative elongating spermatids at the same stage (as evaluated by the percentage of coverage of the spermatids' heads by the acrosome) from wild type (+/+) and *Brdt*^{BD1/ Δ BD1} mice is shown. Scale bars, 1 μ m.

References

- Bisgrove, D.A., Mahmoudi, T., Henklein, P., and Verdin, E. (2007). Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13690-13695.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 28, 82-86.
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E.H., and Eddy, E.M. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3264-3268.
- Florence, B., and Faller, D.V. (2001). You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front Biosci* 6, D1008-1018.
- Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Kauer, M., Morris, S.A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B.D., Allis, C.D., *et al.* (2007). Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J Biol Chem* 282, 7641-7655.
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 277, 599-604.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* 271, 3459-3469.
- Govin, J., Dorsey, J., Gaucher, J., Rousseaux, S., Khochbin, S., and Berger, S.L. (2010). Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev* 24, 1772-1786.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., *et al.* (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 176, 283-294.
- Govin, J., Lestrat, C., Caron, C., Pivot-Pajot, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2006). Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. In *The Histone Code and Beyond*, S.L. Berger, O. Nakanishi, and B. Haendler, eds. (Berlin Heidelberg, Springer-Verlag), pp. 155-172.
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 79, 950-960.
- Kotaja, N., Kimmins, S., Brancorsini, S., Hentsch, D., Vonesch, J.L., Davidson, I., Parvinen, M., and Sassone-Corsi, P. (2004). Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* 1, 249-254.

- Liu, D., Matzuk, M.M., Sung, W.K., Guo, Q., Wang, P., and Wolgemuth, D.J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nat Genet* 20, 377-380.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* 13, 476-484.
- Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., *et al.* (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664-668.
- Muller, M., Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2011). Bromodomains as therapeutic targets. *Exper reviews in Molecular medicine* 13, 1-21.
- Nickerson, H.D., Joshi, A., and Wolgemuth, D.J. (2007). Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Dev Biol* 306, 725-735.
- Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *Mol Cell Biol* 23, 5354-5365.
- Rousseaux, S., Boussouar, F., Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Curtet, S., Vitte, A.L., and Khochbin, S. (2010). Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med* 57, 50-53.
- Rousseaux, S., Reynoird, N., Escoffier, E., Thevenon, J., Caron, C., and Khochbin, S. (2008). Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* 16, 492-503.
- Sanchez, R., and Zhou, M.M. (2009). The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12, 659-665.
- Sasaki, K., Ito, T., Nishino, N., Khochbin, S., and Yoshida, M. (2009). Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16257-16262.
- Sassone-Corsi, P. (2002). Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 296, 2176-2178.
- Schroder, S., Cho, S., Zeng, L., Zhang, Q., Kaehlcke, K., Mak, L., Lau, J., Bisgrove, D., Schnolzer, M., Verdin, E., *et al.* (2012). Two-pronged Binding with Bromodomain-containing Protein 4 Liberates Positive Transcription Elongation Factor b from Inactive Ribonucleoprotein Complexes. *J Biol Chem* 287, 1090-1099.
- 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, 3507-3515.
- Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., *et al.* (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337-342.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., *et al.* (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* *146*, 1016-1028.

Zhang, K., Williams, K.E., Huang, L., Yau, P., Siino, J.S., Bradbury, E.M., Jones, P.R., Minch, M.J., and Burlingame, A.L. (2002). Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* *1*, 500-508.

Zhao, R., Nakamura, T., Fu, Y., Lazar, Z., and Spector, D.L. (2011). Gene bookmarking accelerates the kinetics of post-mitotic transcriptional re-activation. *Nat Cell Biol* *13*, 1295-1304.

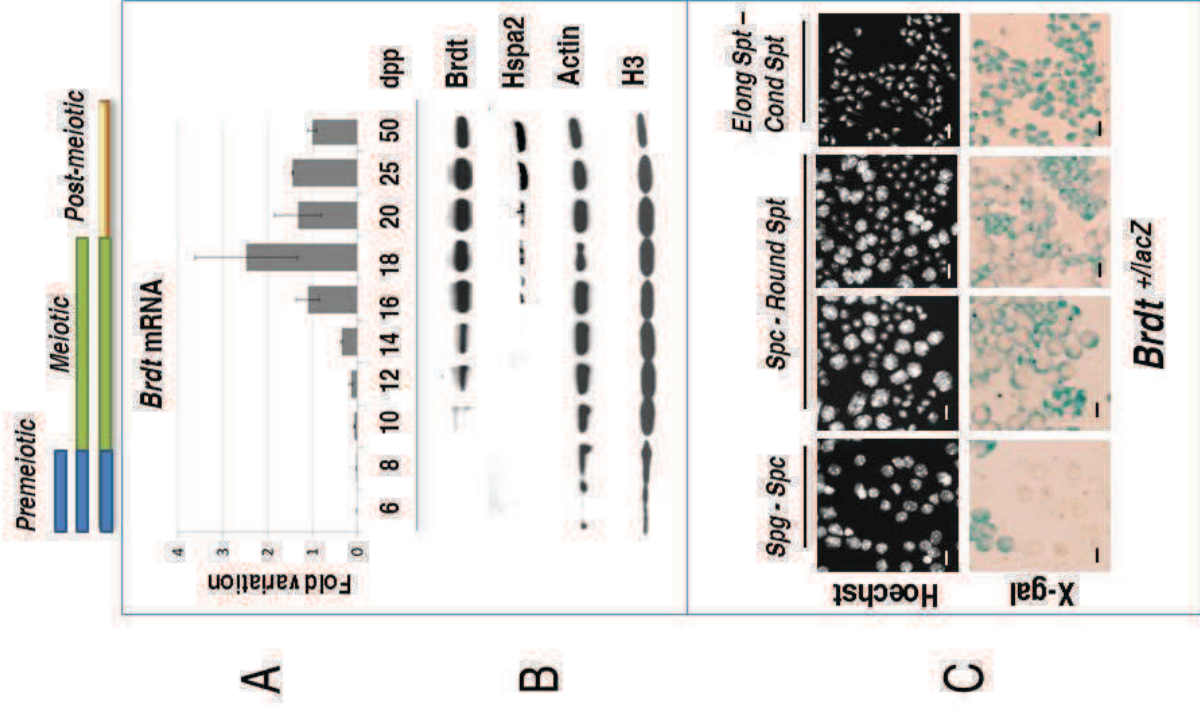


Figure 2

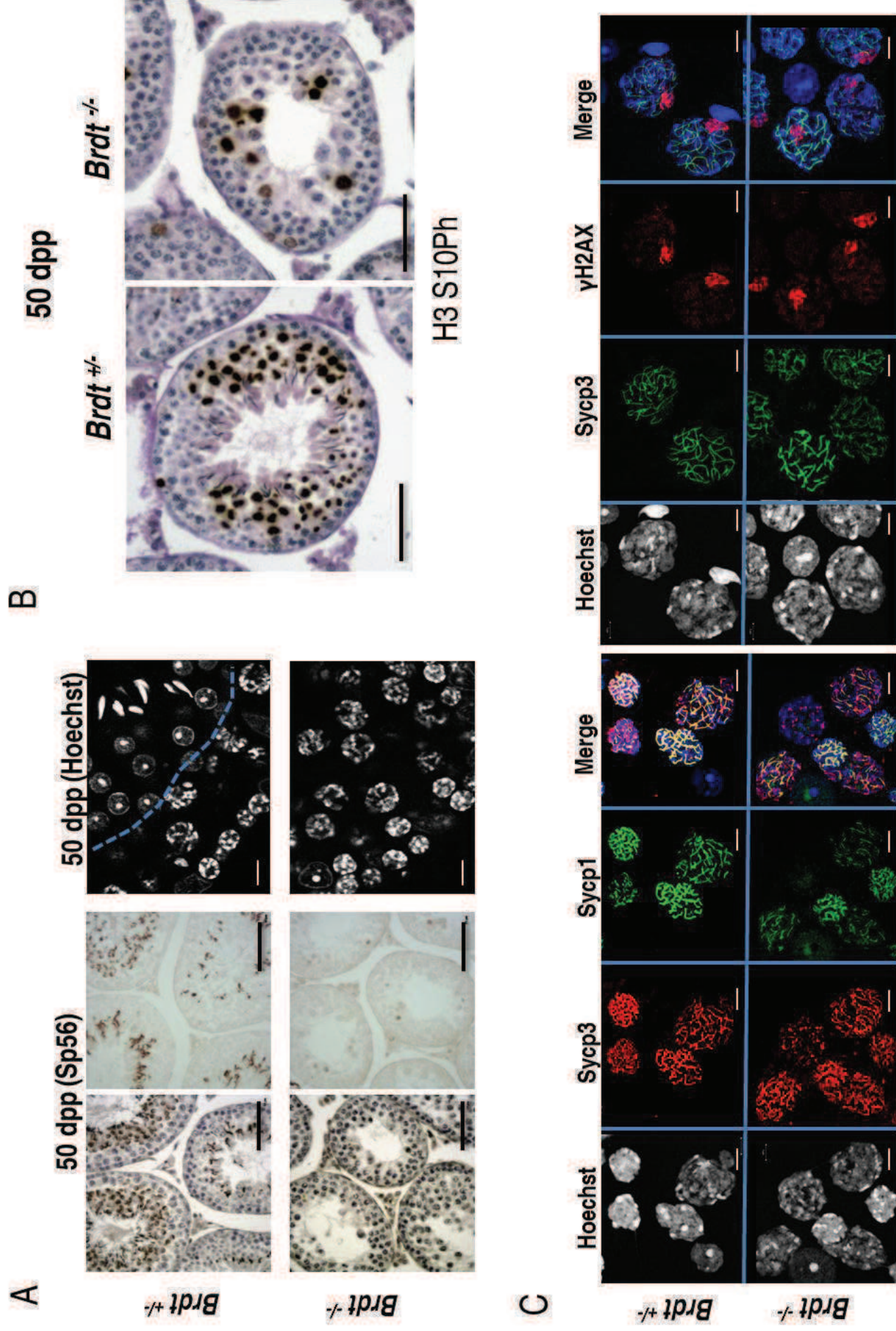


Figure 3

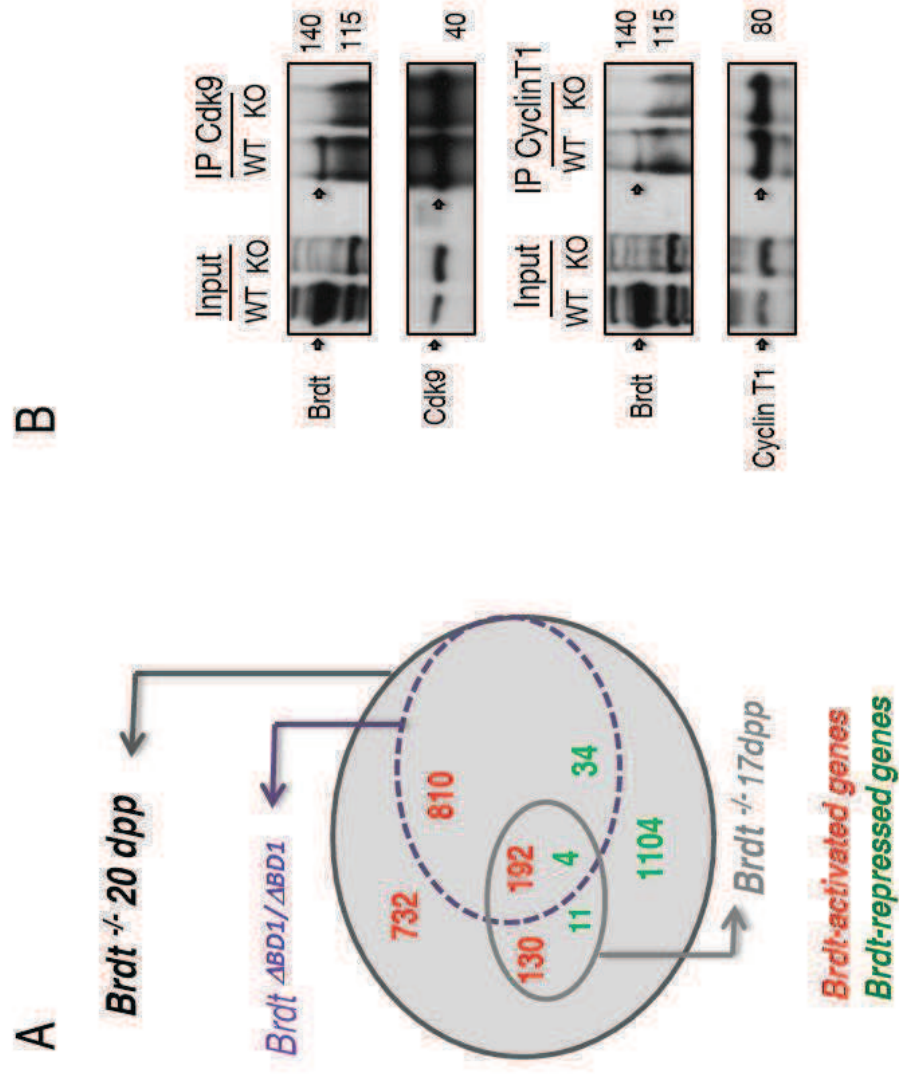


Figure 4

Expression pattern of genes differentially expressed in 17 and 20 dpp testes from *Brdt*^{-/-} mice

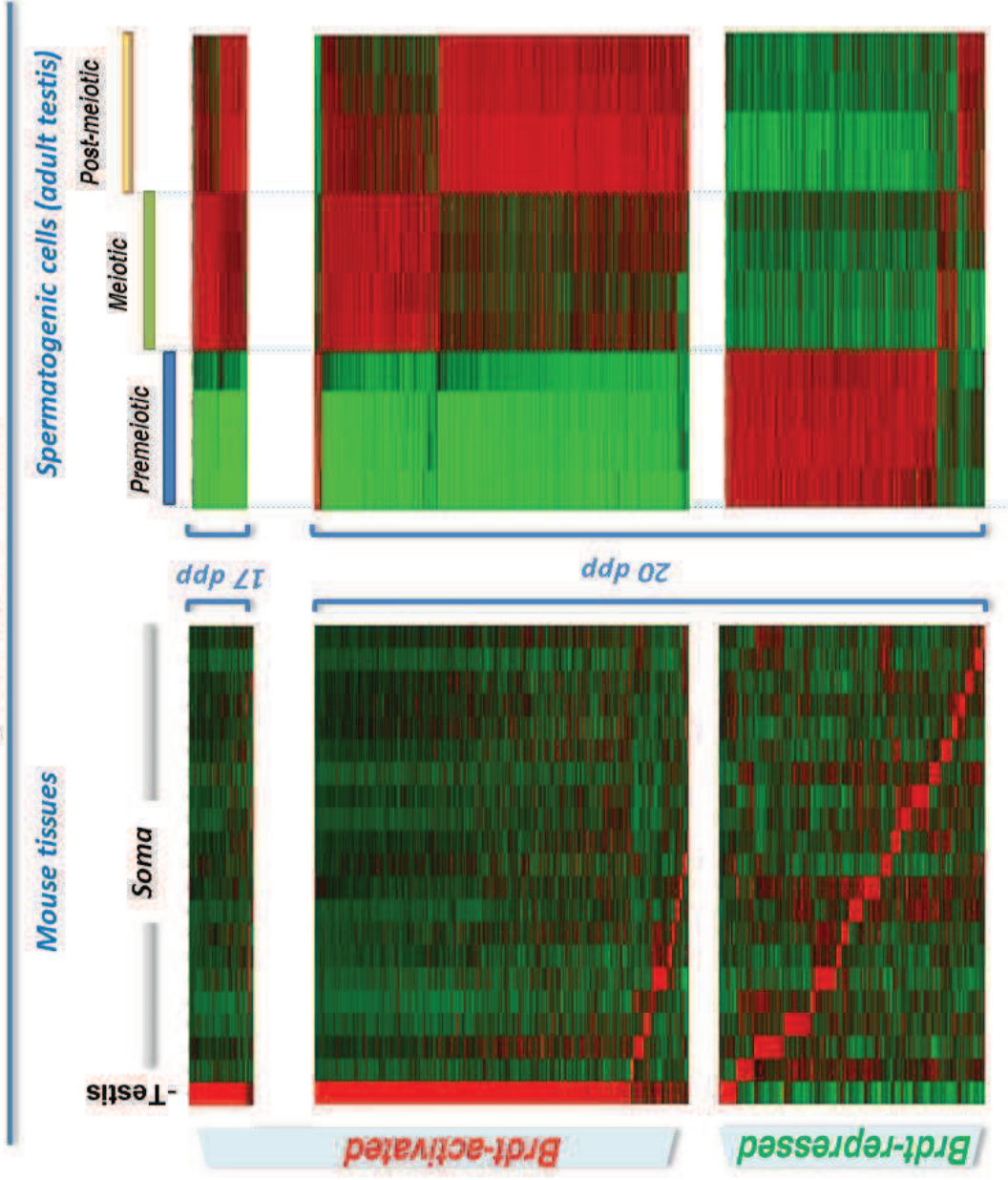
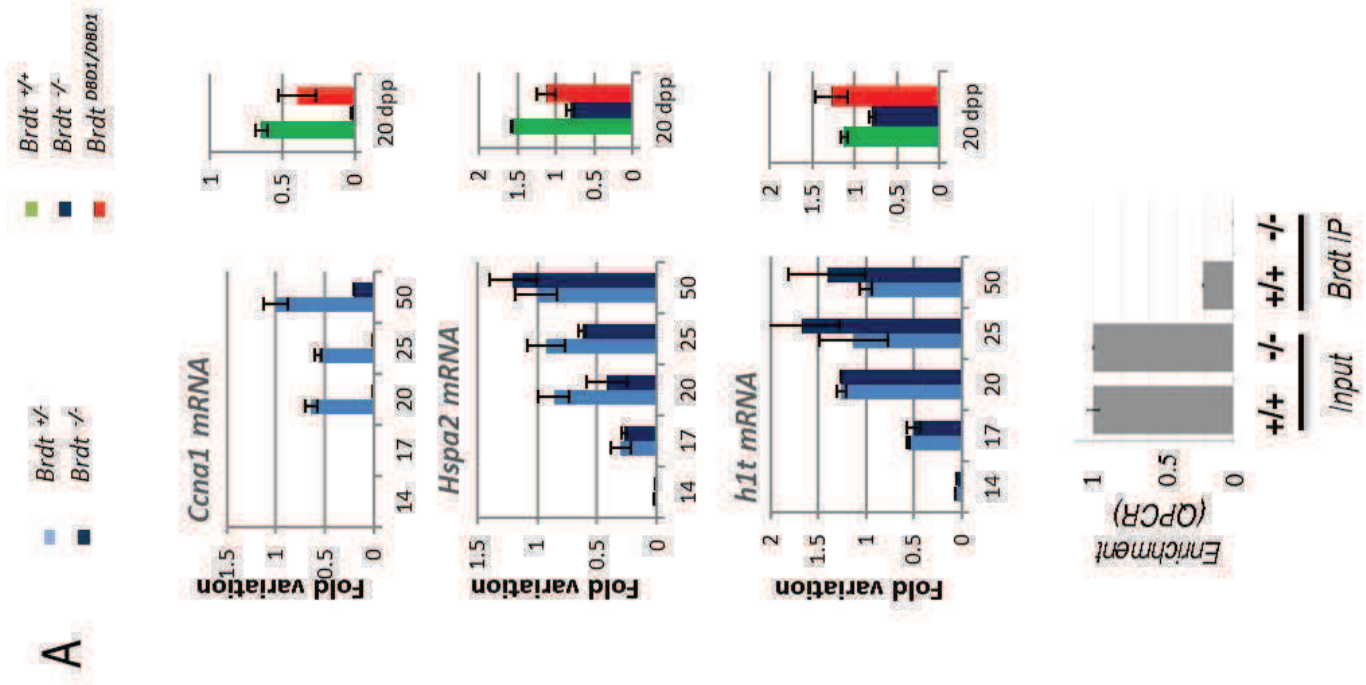


Figure 5



B

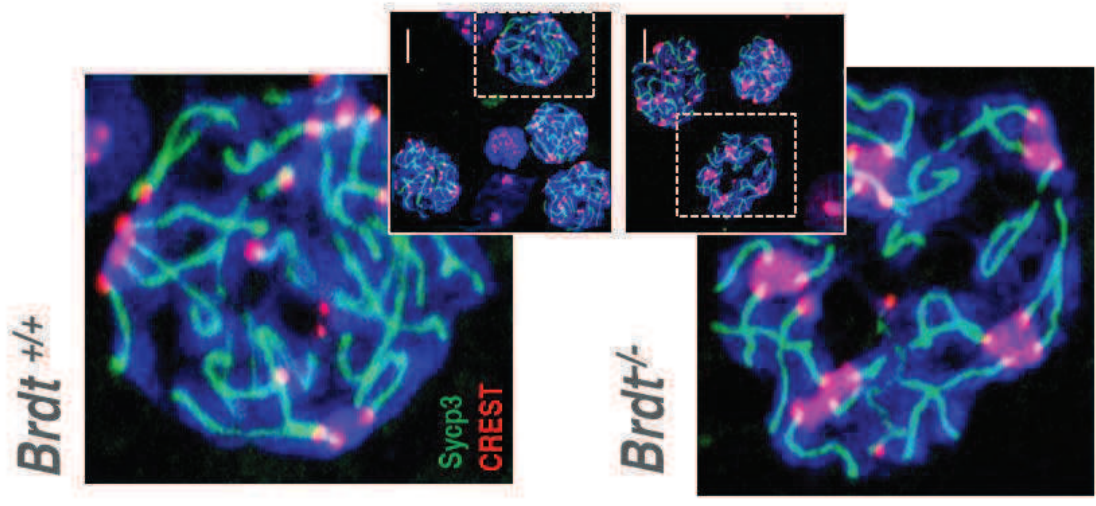
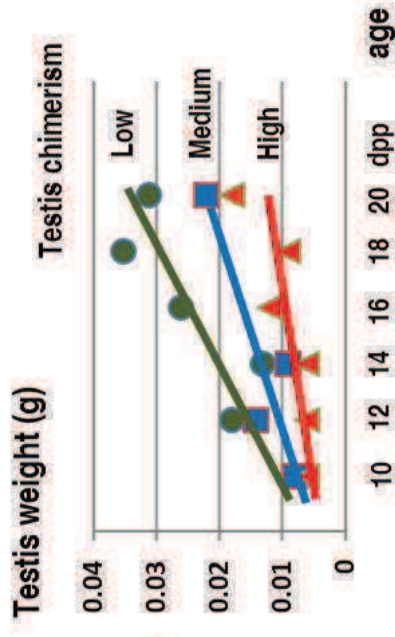
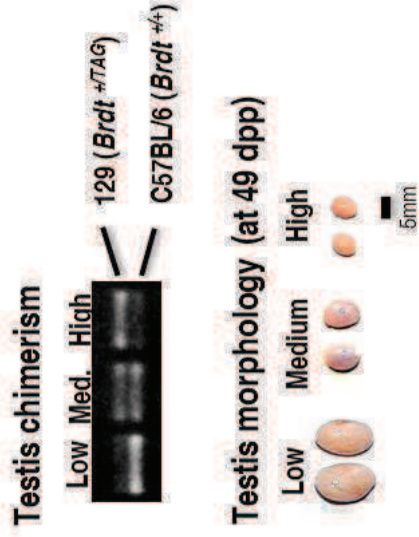
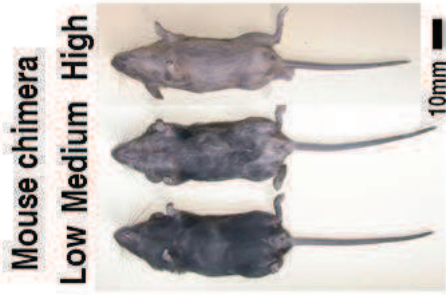
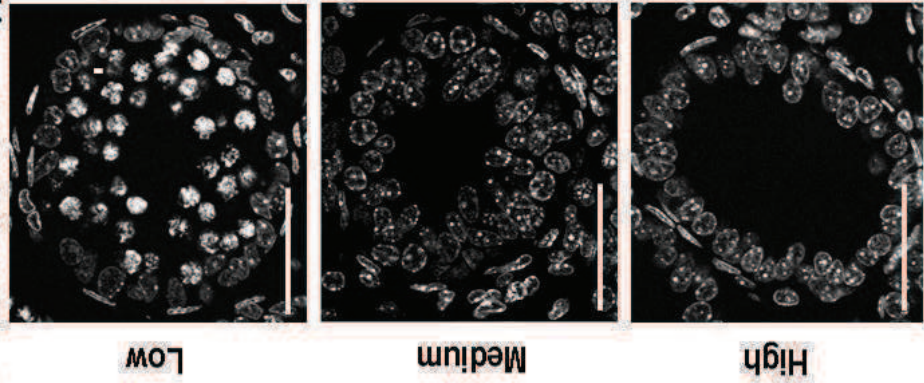


Figure 6



B Testis sections at 14 dpp



C

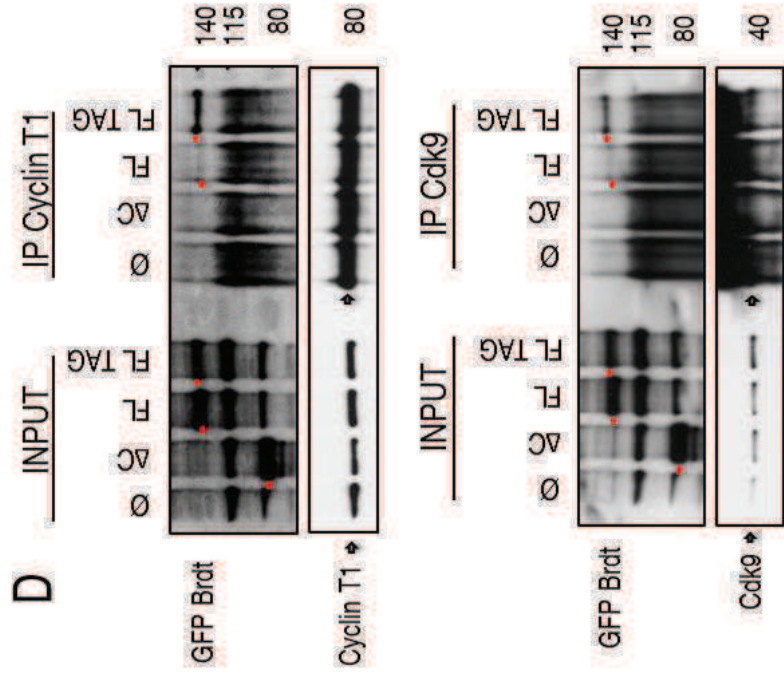
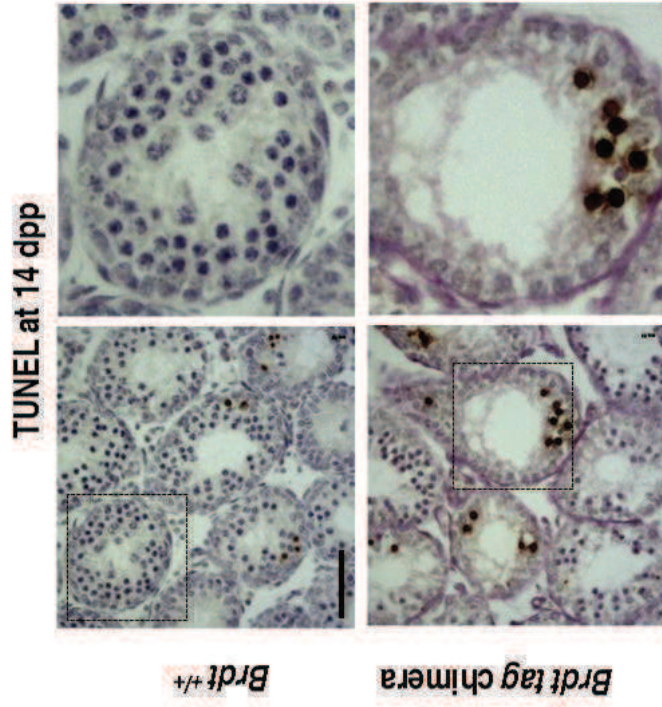


Figure 7

Expression pattern of the genes differentially expressed in 20 dpp testes from *Brdl* ^{Δ BD1/ Δ BD1} mice

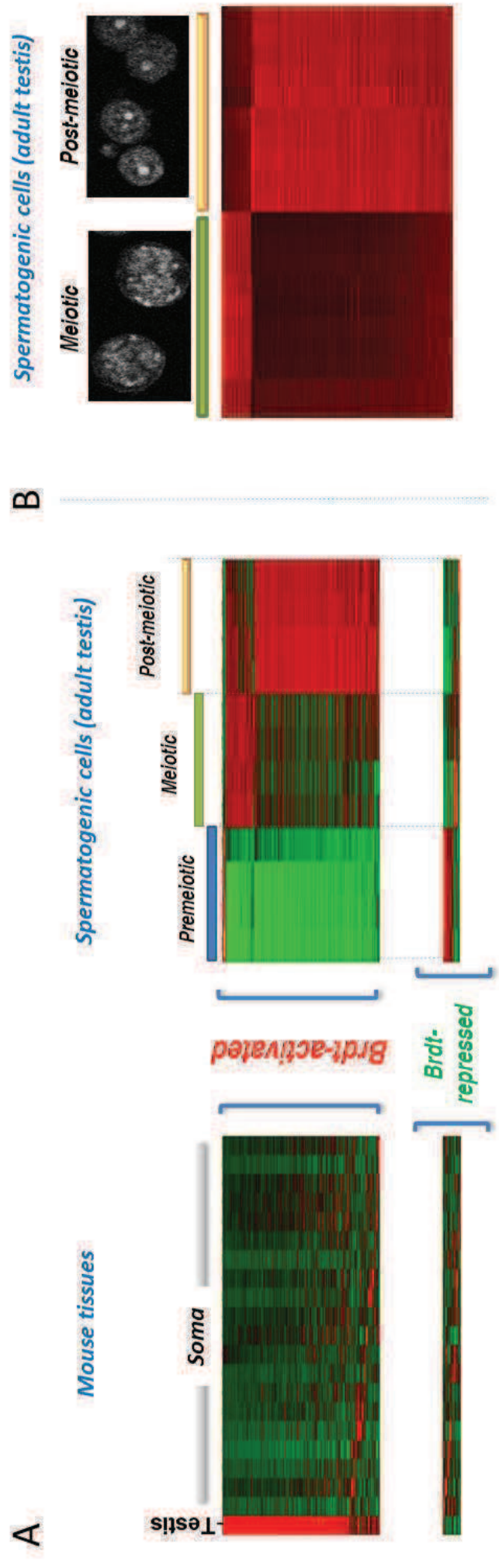
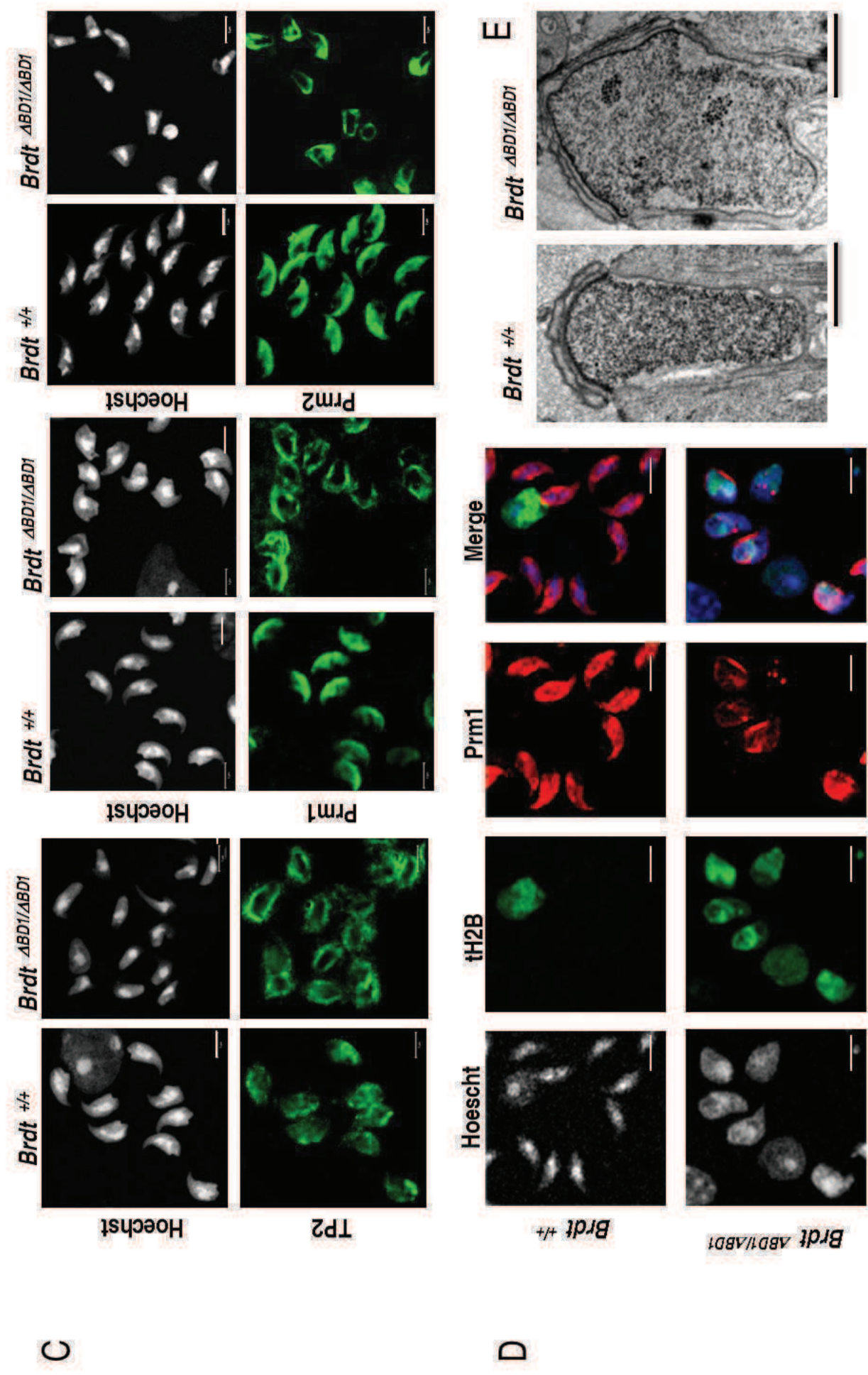


Figure 7



Supplemental Information

Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt

Jonathan Gaucher¹, Fayçal Boussouar¹, Emilie Montellier¹, Patrick Hery², Sylvie Jounier², Arnaud Depaux², Anne-Laure Vitte¹, Philippe Guardiola³, Karin Pernet⁴, Thierry Buchou¹, Debra J. Wolgemuth⁵, Matthieu Gérard², Sophie Rousseaux^{1*}, Saadi Khochbin^{1*}.

1 - INSERM, U823; Université Joseph Fourier - Grenoble 1; Institut Albert Bonniot
Grenoble, F-38700 France

2 – CEA, iBiTec-S, Gif-sur-Yvette, F-91191 France

3 - INSERM, U892 ; Centre de Recherche sur le Cancer Nantes Angers et UMR_S 892;
Université d'Angers ; Plateforme SNP, Transcriptome & Epigénomique;
Centre Hospitalier Universitaire d'Angers; Angers, F-49000 France

4 - Unité Inserm U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Université Joseph Fourier, Site
Santé, 38700 La Tronche, France

5 - Dept. of Genetics and Development and Obstetrics and Gynecology, Columbia University
Medical Center, New York, NY 10032, USA

- Correspondence : Sophie Rousseaux (sophie.rousseaux@ujf-grenoble.fr) and Saadi Khochbin (Khochbin@ujf-grenoble.fr).

EXTENDED EXPERIMENTAL PROCEDURES

Knock-in through homologous recombination in ES cells

The gap-repair recombineering technique from (Liu et al., 2003) was adapted to construct our *Brdt* TAP-tag (Tandem Affinity Purification) targeting vector for homologous recombination in ES cells. Briefly, the retrieval vector was generated by mixing 5' miniarm (*NotI*/*Spe* I), 3' miniarm (*Spe*I/*Bam*HI) and the plasmid PL253 (*NotI*/*Bam*HI). Electro-competent SW102 cells containing either *Brdt* BAC (bMQ 389E17, CHORI) or *th2b* BAC (bMQ 347D5), which had been induced for recombination by prior growth at 42°C for 15 min, were electroporated with the *Spe* I-linearized retrieval vector. A 10 kb *Brdt* fragment spanning the last exon of the *Brdt* gene and a 10.9 kb genomic fragment spanning the only exon of *th2b* were subcloned. The next step in creating the TAP-tag targeting vector was the introduction of 6His-Flag-Ha tag along with a *Neo* cassette into the subcloned DNA. To generate the *Neo*-targeting vector, we first modified the PL452 vector by inserting the TAP-tag. An *Asc*I site was inserted in frame to allow cloning of 5' homology arm as *Sal*II/*Asc*I fragment in the PL452^{tag} vector. Sequences of primers and plasmids used in this study are available upon request.

Mouse ES cells (AT1 and 46C lines) were electroporated with *Not*I-linearized targeting constructs and cultured with G418 to positively select for clones that had integrated the targeting construct. For *Brdt*, positive clones were screened by southern blot using an *Eco*RV digest with a 5' external probe to check for homologous targeting. Two correctly targeted clones were karyotyped and transferred to C57BL/6 blastocysts and chimeric mice were generated.

For *th2b*, positive clones were checked by southern blotting using a *Bam*HI digest and a 3' external probe. Correctly targeted clones were karyotyped and injected into blastocysts.

X gal staining for Brdt expression

Staged seminiferous tubules for X-gal staining were fixed in Pre-fix buffer (Phosphate buffer 100mM pH7.3, Glutaraldehyde 0.2%, EGTA 5mM, DOC 0.1%, NP40 0.2%, MgCl₂ 2mM). After washes in Phosphate buffer 100mM pH7.3 with DOC 0.1%, staining was performed by incubating slides overnight at 37°C in LacZ-staining solution (Phosphate buffer 100mM pH7.3, MgCl₂ 2mM, potassium ferricyanide 5mM and potassium ferrocyanide 5mM, X gal 1mg/mL) followed by washes with PBS and post fixation in formalin solution (Sigma). After washes in PBS seminiferous tubules were stained with Hoechst (Invitrogen) and mounted with DaKO fluorescent mounting medium (DaKO). The tubule sections were observed with an epifluorescence / transmitted light microscope (BX41, Olympus)

Primers used for gene expression and ChIP

Gene	Forward	Reverse
<i>Hspa2</i>	CTA CGT GGC CTT CAC TGA CA	GGT CAG GAT GGA CAC ATC GA
<i>H1t</i>	CCA GCT CTT GAC CAT GTC G	CAG GAG CTG GAA CAA GGG TA
<i>Hoxa4</i>	TGT ACC CCT GGA TGA AGA AGA TC	GCT TAG GTT CGC CTC CGT TA
<i>Cyclina1</i>	CAC TTC CTG CTG GAT TTC AAC	CGA TGA ATC TCC TCT GCA TAC
<i>Brdt</i>	CAT GCA TGC CAC CTT ACA ACA	AGG CTT TTT CCT TGG GTT TTC
<i>Actin</i>	CTA AGG CCA ACC GTG AAA AG	ACC AGA GGC ATA CAG GGA CA

Primers for ChIP-PCR analysis of the *Ccna1* gene promoter are as follows:

Forward	Reverse
GGT TGG CAT GGA AGC GGC	GGA GAG GAG AGA TTC CAG G.

Mice testis DNA genotyping

Chimeric mice testis DNA genotyping was carried out on testis DNA by PCR (30 cycles) using forward primer, 5'-GGCTTCGACCCTGGTTTTAG-3'; reverse primer, 5'TGAAAGTTCAGATGACCACACG-3') that amplify a microsatellite in the D2Mit94 locus of mouse chromosome 2²⁰. The PCR products were 194 bp for 129 and 160 bp for C57BL/6. *Brdt* KO mice genotyping was carried out on tail DNA by PCR (35 cycles). The presence of the mutant allele (130 bp) was confirmed using the following primers: Forward primer, 5'-TGACCATTGTGCAGGGTTTC-3'; reverse primer 5'-TCGTGGTATCGTTATGCGCC-3'. For the wild-type allele (303 bp) the following primers were used: forward primer, 5'-TGACCATTGTGCAGGGTTTC-3'; reverse primer, 5'-TGGTGTGCCCTGTAGTGTCC-3'.

Transcriptomic analyses

0.5-1 µg RNA was reverse transcribed with the SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Total RNA quantification was performed using the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA). Integrity of the extracted RNAs was assessed with the Bioanalyzer 2100 and the RNA6000 Nano kit (Agilent Technologies Incorporation, Santa Clara, USA). A RNA integrity number (RIN) greater or equal to 7.00 was achieved for all samples. No sign of DNA contamination was detected in any of the samples analyzed. The starting amount of total RNA used for the reactions was 200 nanograms per sample, for all samples. The Illumina Total Prep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems / Ambion, Austin, USA) was used to generate biotinylated, amplified cRNA according to the manufacturer recommendations. Hybridization, staining and detection of cRNAs on Illumina Mouse WG-6 v2 Expression BeadChips were performed according to the manufacturer's protocol. The Illumina I-Scan system was used to scan all Expression BeadChips, according to Illumina recommendations.

The Quantile normalization method was applied to the primary probe data. Processed probe data were then filtered according to the following criteria: minimal signal intensity fold change of 1.50 across all samples, minimal probe signal intensity absolute change of 150 across all samples, and maximal value for probe signal intensity of 50 000 across all samples. Filtered data were then log₂-transformed, and the expression values compared between the testis samples of mutant mice and their corresponding age-matched wild type samples. Genes were considered differentially expressed when their level of expression in the mutated mouse testes satisfied two criteria: i/ the values of expression in more than half of the replicates from the mutant animals were either above or below the range comprising all the values of the control samples ii/ the absolute fold change between the mean expression value in the samples from mutant animals compared to that in control samples was at least 1.5.

Electron Microscopy morphological analysis

Spermatids were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4 during 24 hours at room temperature. Cells were then washed with buffer and embedded in 10% gelatin diluted in 0.1M cacodylate at 37°C. After solidification on ice, this cell pellet was cut in small pieces and samples were post fixed with 1% Osmium tetroxide and 0.1 M cacodylate pH 7.2 during 1 hour at 4°C. After extensive washing with water, cells were further stained with 1% uranile acetate pH 4 in water during 1 hour at 4°C before being dehydrated through graded alcohol (30%-60%-90%-100%-100%-100%) and infiltrate with a mix of 1/1 epon/alcohol 100% during 1 hour and several bath of fresh epon (Flukka) during 3 hours. Finally, samples were included in a capsule full of resin that was let to polymerise during 72h at 60°C. Ultrathin sections of the cell samples were cut with an ultramicrotome (Leica), sections were post-stained with 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate before observation using an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX). Images were acquired with a digital camera

(Veleta, SIS, Olympus) and morphometric analysis was performed with iTEM software (Olympus).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. Related to Figure 5

Abnormal centromere clustering in *Brdt*^{-/-} mice. Synaptonemal complex component, Sycp3, and centromeric proteins Crest, were co-detected as indicated, in seminiferous tubule sections of *Brdt*^{+/+} and *Brdt*^{-/-} mice. Cells were arranged to show their progression in prophase. Scale bars : 5μm.

Figure S2. Related to Figure 6

Strategy for TAP-tagging endogenous *Brdt* and *th2b* in ES cells.

A schematic representation of homologous recombination constructs of *Brdt* (A) and *th2b* (B): exons are represented in black and introns in grey-green. A 6His-flag-Ha tag was inserted in frame with the last exon of *Brdt* and *th2b* (no intron), by homologous recombination with a neomycin-resistance gene driven by the Pgk1 promoter (Neo). This causes a reduction in size of the EcoRV and BamHI restriction fragments, in *Brdt* and in *th2b* respectively, shown in heterozygous ES cell by Southern blot analysis of wild-type (+/+) and heterozygous (+/-) ES cells, confirming the occurrence of homologous recombination in the corresponding genes.

Figure S3. Related to Figure 6.

“His-Flag-Ha” tag has no deleterious effects on meiosis. Sections of seminiferous tubules from a TH2B^{tag/+} mouse strain were compared to corresponding testis sections from a wild type mouse. TH2B-Tag was revealed by an anti-Ha antibody. Scale bar: 20μm

Figure S4. Related to Figure 8

Histone H4 hyperacetylation occurs in spermatids expressing a BD1-less *Brdt*.

Paraffin-embedded testis sections from wild type (+/+) and BD1-less Brdt-expressing homozygous mice (indicated Δ BD1/ Δ BD1) were used to detect hyperacetylated histone H4 with an anti-hyperacetylated histone H4 antibody by immunohistochemistry. Scale bars, 50 μ M; Higher magnifications of the indicated fields are shown in the lower panels.

Figure S5. Related to Figure 8

Brdt lacking its first bromodomain is trapped in the cytoplasm of elongating spermatids

Detection of Brdt in male germ cells from wild type mice (*Brdt*^{+/+}) and mice with Brdt deleted of its first bromodomain (*Brdt* ^{Δ BD1/ Δ BD1}). The antibody and detection method used were as reported in (Govin et al., 2006).

Supplemental references

Govin, J., Lestrat, C., Caron, C., Pivot-Pajot, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2006). Histone acetylation-mediated chromatin compaction during mouse spermatogenesis. In *The Histone Code and Beyond*, S.L. Berger, O. Nakanishi, and B. Haendler, eds. (Berlin Heidelberg, Springer-Verlag), pp. 155-172.

Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res* *13*, 476-484.

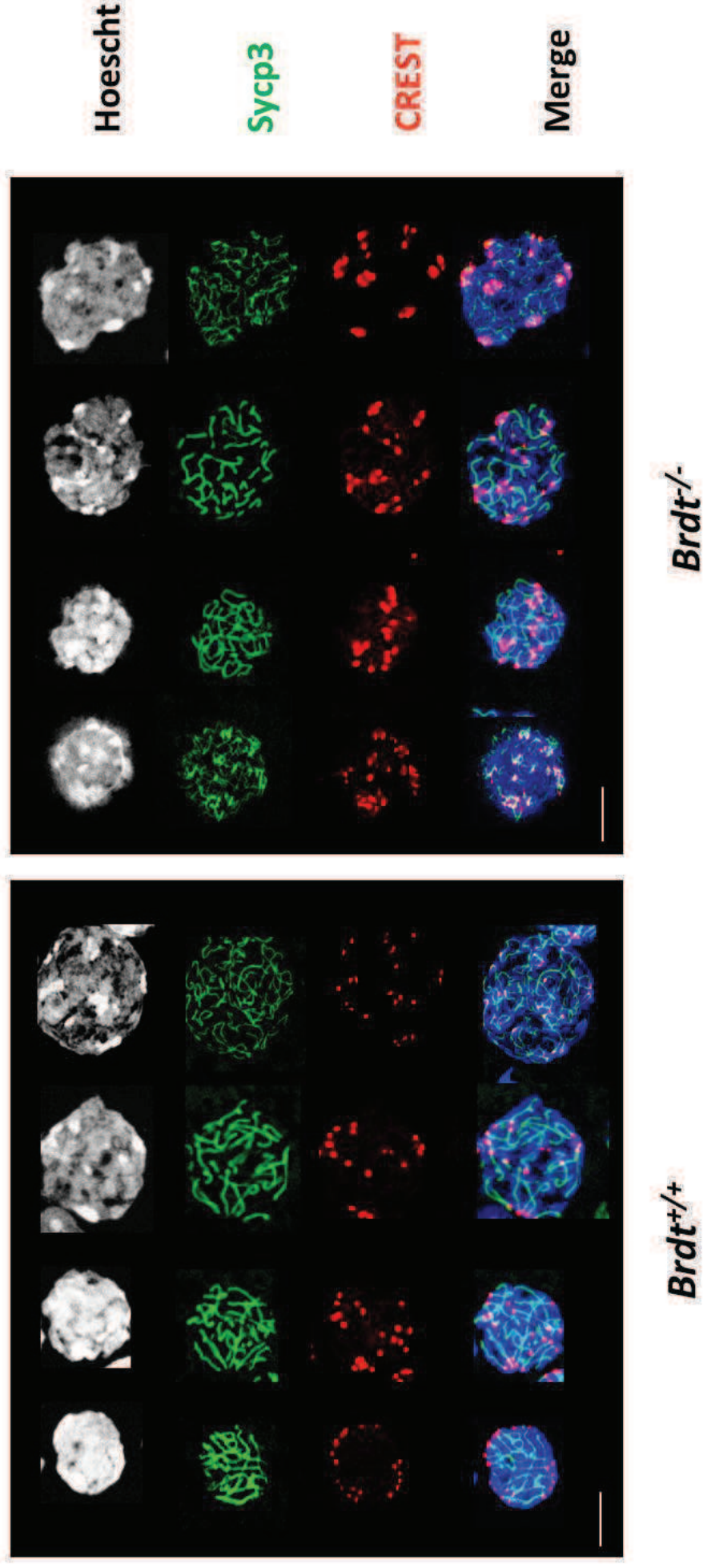


Figure S2

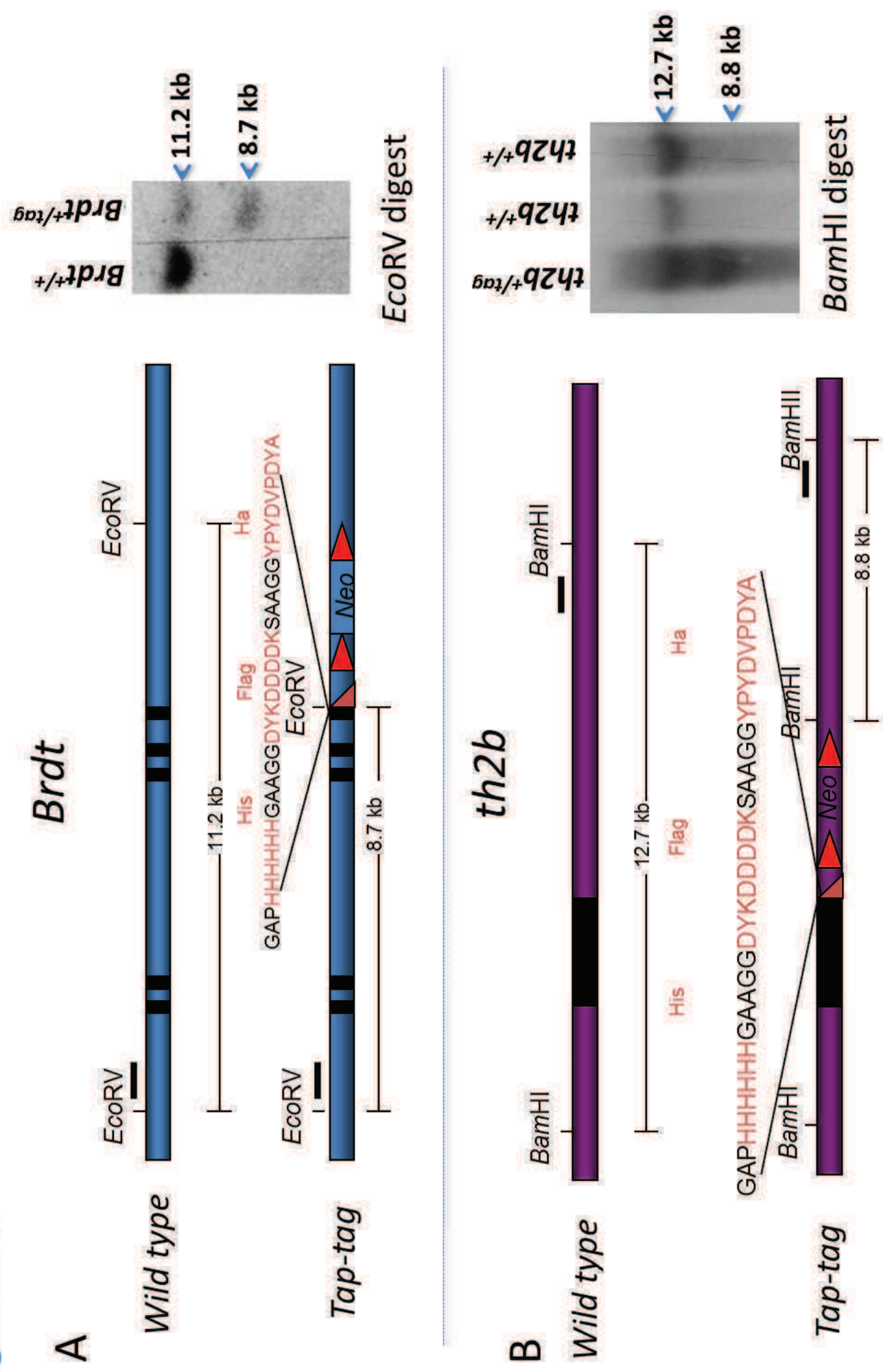


Figure S3

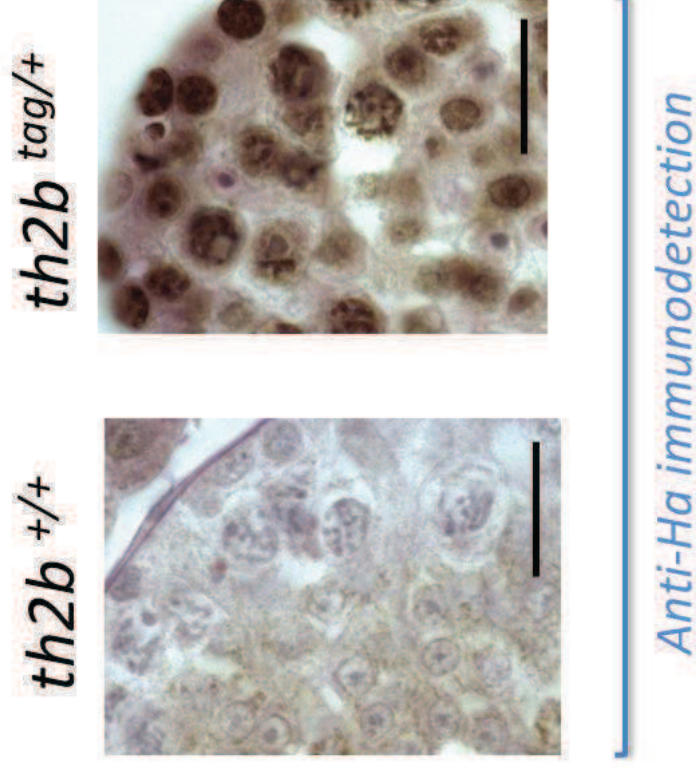


Figure S4

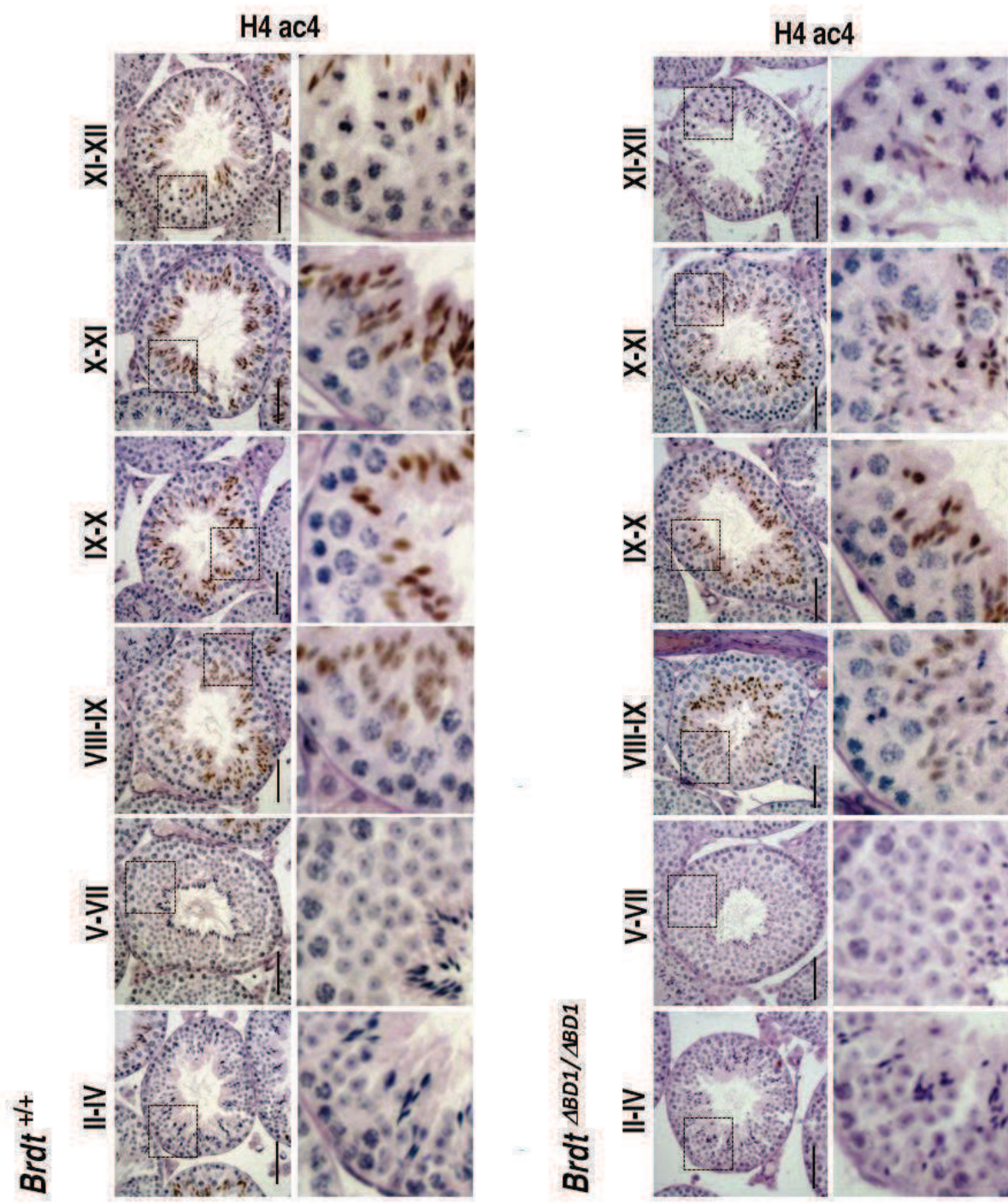
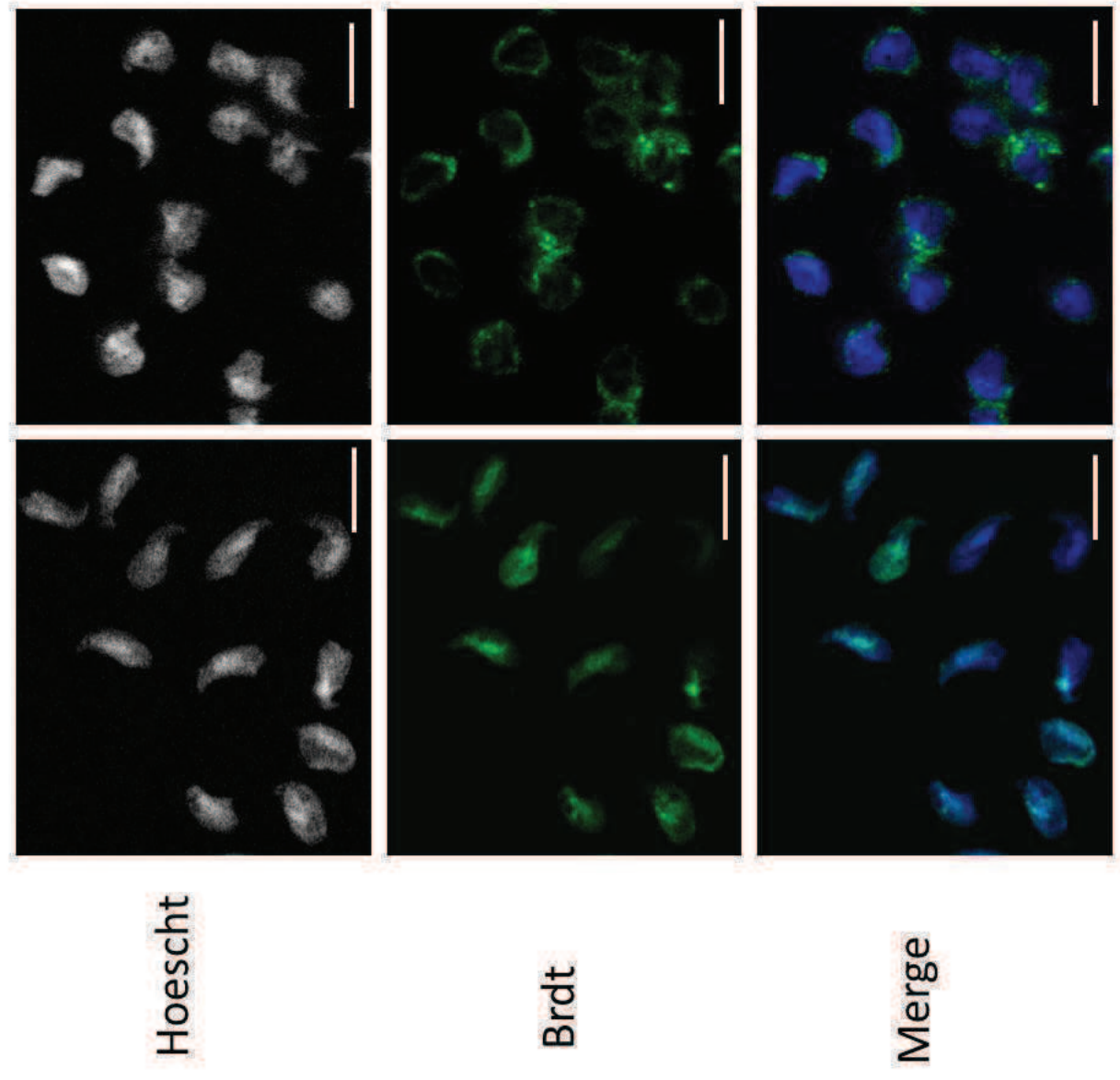


Figure S5



2. Caractérisation structurale et fonctionnelle des bromodomaines de BRDT

- Introduction

BRDT est une protéine à double bromodomaine appartenant à la famille BET, capable d'interagir avec les histones acétylées et de réorganiser la chromatine hyper acétylée. Nous avons caractérisé les spécificités d'interaction de BRDT avec les résidus histones acétylées, la structure de ses bromodomaines ainsi que les mécanismes moléculaires associés.

Nos collaborateurs, des biochimistes et des biophysiciens de l'EMBL, ont caractérisé les structures et les affinités de chaque bromodomaine pour les marques d'acétylation des queues amino-terminales des histones. Cela nous a permis de relier ces résultats à une potentielle implication de BRDT lors de la vague d'acétylation au cours de la spermiogenèse. Nous avons aussi étudié les bases moléculaires qui régissent la réorganisation de la chromatine hyperacétylée.

- Principaux résultats

Le premier bromodomaine de BRDT, BD1, reconnaît le motif diacétylé de H4 sur K5 et K8. Sur le plan stérique, la liaison de ce bromodomaine avec le motif diacétylé est possible à l'intérieur d'une seule grande poche. Il est très proche du bromodomaine de p300 lui aussi capable de reconnaître un motif diacétylé sur la MyoD par exemple. Le deuxième bromodomaine de BRDT, BD2, reconnaît l'acétylation de H3 K18. De structure plus classique, il pourrait posséder un rôle distinct de BD1. Au cours de la spermiogenèse on observe une vague d'acétylation des histones juste avant leur remplacement par les protamines. Nous avons caractérisé la vague d'hyperacétylation de H4 au cours de la spermiogenèse par Western blot et immunofluorescence et, nous avons également confirmé la présence du motif diacétylé sur H4 par spectrométrie de masse. Enfin nous avons émis l'hypothèse d'un rôle potentiel de BD1 au cours de la spermiogenèse. En effet, les souris mâles délétées de BD1 sont stériles et présentent des troubles de la spermiogenèse avec des défauts de compaction de la chromatine.

Mon implication personnelle a porté sur la préparation d'histones, issues de cellules méiotiques et post méiotiques, pour l'analyse par spectrométrie de masse de leur degré d'acétylation au cours de la spermatogenèse murine. J'ai également participé aux clonages de différentes formes de BRDT et à la discussion des résultats.

- Présentation de l'article publié

Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain.

Nature Letter, publication 1 octobre 2009

Jeanne Moriniere, Sophie Rousseaux, Ulrich Steuerwald, Montserrat Soler-Lopez, Sandrine Curtet, Anne-Laure Vitte, Jerome Govin, Jonathan Gaucher, Karin Sadoul, Darren J. Hart, Jeroen Krijgsveld, Saadi Khochbin, Christoph W. Mueller & Carlo Petosa

LETTERS

Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain

Jeanne Morinière^{1,2}, Sophie Rousseaux³, Ulrich Steuerwald⁴, Montserrat Soler-López^{1,2,†}, Sandrine Curtet³, Anne-Laure Vitte³, Jérôme Govin³, Jonathan Gaucher³, Karin Sadoul³, Darren J. Hart^{1,2}, Jeroen Krijgsveld⁴, Saadi Khochbin³, Christoph W. Müller⁴ & Carlo Petosa⁵

A key step in many chromatin-related processes is the recognition of histone post-translational modifications by effector modules such as bromodomains and chromo-like domains of the Royal family^{1,2}. Whereas effector-mediated recognition of single post-translational modifications is well characterized³, how the cell achieves combinatorial readout of histones bearing multiple modifications is poorly understood. One mechanism involves multivalent binding by linked effector modules⁴. For example, the tandem bromodomains of human TATA-binding protein-associated factor-1 (TAF1) bind better to a diacetylated histone H4 tail than to monoacetylated tails, a cooperative effect attributed to each bromodomain engaging one acetyl-lysine mark⁵. Here we report a distinct mechanism of combinatorial readout for the mouse TAF1 homologue Brdt, a testis-specific member of the BET protein family⁶. Brdt associates with hyperacetylated histone H4 (ref. 7) and is implicated in the marked chromatin remodelling that follows histone hyperacetylation during spermiogenesis, the stage of spermatogenesis in which post-meiotic germ cells mature into fully differentiated sperm^{7–10}. Notably, we find that a single bromodomain (BD1) of Brdt is responsible for selectively recognizing histone H4 tails bearing two or more acetylation marks. The crystal structure of BD1 bound to a diacetylated H4 tail shows how two acetyl-lysine residues cooperate to interact with one binding pocket. Structure-based mutagenesis that reduces the selectivity of BD1 towards diacetylated tails destabilizes the association of Brdt with acetylated chromatin *in vivo*. Structural analysis suggests that other chromatin-associated proteins may be capable of a similar mode of ligand recognition, including yeast Bdf1, human TAF1 and human CBP/p300 (also known as CREBBP and EP300, respectively). Our findings describe a new mechanism for the combinatorial readout of histone modifications in which a single effector module engages two marks on a histone tail as a composite binding epitope.

Bromodomains and extraterminal (BET)-family proteins (including yeast Bdf1, *Drosophila* Fsh and mammalian Brd2, Brd3 and Brd4) contain two bromodomains (BD1 and BD2) spaced ~150 residues apart and followed by an 'extra terminal' (ET) domain⁶. These proteins recognize multi-acetylated histones H3 and H4 (refs 7, 11–14) and are distinguished from other bromodomain proteins by their retention on mitotic chromosomes, implicating BET proteins in epigenetic memory^{15–17}. Brdt associates with, and has the unique ability to compact, hyperacetylated chromatin *in vitro* and *in vivo*⁷. Compaction activity is ATP-independent, is enhanced by a carboxy-terminal truncation that removes the ET domain, and

requires integrity of BD1 (ref. 7). Deletion of BD1 results in male sterility in mice⁸.

To investigate how Brdt recognizes acetylated chromatin, we assessed binding to histone H3 and H4 tail peptides by isothermal calorimetry (ITC), using a murine construct (δ C-sBrdt) with enhanced remodelling activity⁷ (Fig. 1a). δ C-sBrdt specifically binds a tetra-acetylated H4 peptide (H4ac4) with a dissociation constant ($K_d = 11.4 \pm 2.2 \mu\text{M}$) similar to that reported for Bdf1 ($8.4 \mu\text{M}$)¹³ and for the TAF1 double bromodomain ($5.3 \mu\text{M}$)⁵ (Supplementary Fig. 1a and Table 1). We next analysed binding by the isolated Brdt bromodomains, expecting each to engage a unique acetyl-lysine residue within H4. Surprisingly, BD2 did not bind tetra- or mono-acetylated H4 peptides, whereas BD1 bound H4ac4 nearly as well ($K_d = 28.0 \pm 6.1 \mu\text{M}$) as δ C-sBrdt, suggesting that the latter recognizes H4ac4 primarily through BD1 alone (Supplementary Fig. 1b and Table 1). Recognition does not seem to involve protein oligomerization, as both BD1 and δ C-sBrdt are monomeric in solution (Supplementary Fig. 2).

BD1 failed to bind monoacetylated H4 tails, but recognized four diacetylated H4 peptides (out of six tested), highlighting the cooperative nature of ligand recognition (Fig. 1b and Table 1). The affinity was highest for H4 diacetylated on K5/K8, equalling that for tetra-acetylated H4, and 5–15 times lower for the three other diacetylated H4 peptides recognized. Likewise, BD1 failed to bind monoacetylated H3 peptides, but recognized tetra-acetylated H3 (albeit more weakly than H4ac4) (Table 1). This behaviour contrasts with that of BD2, which binds H3 peptides acetylated on K18 but does not discriminate mono-, di- and tetra-acetylated forms (Table 1). BD1 also binds an H2B peptide bearing a diacetylated motif (Kac-GS-Kac) resembling that of H4K5acK8ac (Kac-GG-Kac) (Supplementary Fig. 1c). However, the affinity ($K_d = 157 \pm 15 \mu\text{M}$) is eight times lower than for H4K5acK8ac, indicating that sequence context, and not merely spacing between acetylation marks, is important for optimal binding.

To verify the physiological relevance of the high-affinity ligand of BD1 (H4K5acK8ac), we performed immunoblot analysis on fractionated mouse spermatogenic cells using antibodies raised against K5-, K8-, K12-, K16- or tetra-acetylated H4 tails, and additionally assessed H4 acetylation by immunofluorescence microscopy. In rat, chicken and other species, the wave of histone hyperacetylation associated with spermiogenesis is known to occur during spermatid elongation, just before histone replacement and chromatin compaction⁹. Consistent with this, we found that K16 acetylation was constitutive, whereas K5, K8 and K12 gained acetylation during post-meiotic stages in elongating spermatids (Fig. 1c, d). Tandem mass spectrometry confirmed

¹European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France. ²Unit of Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 Université Joseph Fourier-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France. ³INSERM, U823; Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, F-38700 Grenoble, France. ⁴European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany. ⁵Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, UMR 5075 CEA-CNRS-Université Joseph Fourier, 41 Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France. [†]Present address: Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), Parc Científic de Barcelona, calle Baldori Reixac 10–12, 08028 Barcelona, Spain.

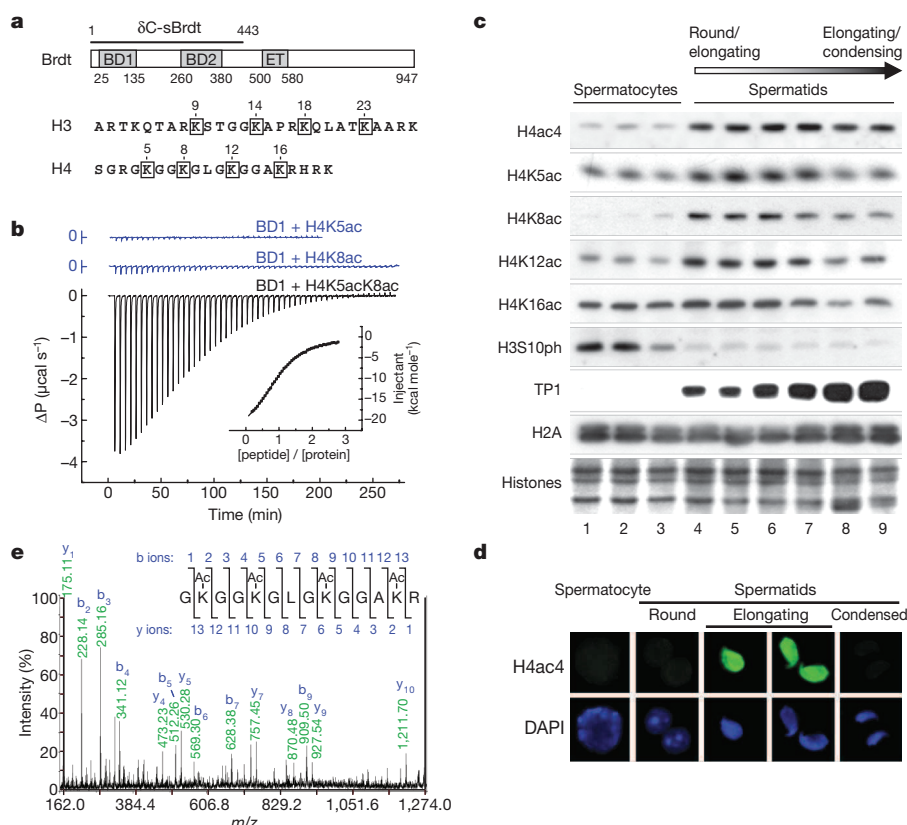


Figure 1 | Brd1 recognizes a diacetylated H4 peptide through BD1. **a**, Brd1 domain organization and H3 and H4 tail sequences. **b**, ITC profiles showing the binding of BD1 to H4 peptides monoacetylated on K5 or K8 or diacetylated on K5 and K8. Protein (150 μ M) was titrated with 2 mM peptide. Δ P, differential power. **c**, Western blot showing the occurrence of H4 hyperacetylation in post-meiotic spermatogenic cells. Extracts prepared from spermatogenic cells as previously described²³ were immunoblotted with antibodies against the indicated species. Anti-H2A and anti-histone blots serve as loading controls. Histone H3 phosphorylated on Ser 10 (H3S10ph) and transition protein 1 (TP1) were used as specific markers for meiotic and post-meiotic cells, respectively⁹. **d**, Immunofluorescence microscopy. Mouse spermatogenic cells at the indicated stages of

development were stained by DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) and by an antibody against tetra-acetylated H4 tails. Original magnification, $\times 380$. **e**, Tandem mass spectrometry (MS) analysis confirms the presence of histone H4 tetra-acetylated on lysines 5, 8, 12 and 16 in post-meiotic spermatids. Histone residues extracted from nuclei of murine round/elongated spermatids were separated by SDS-PAGE. The band corresponding to histone H4 was digested by trypsin and analysed by matrix-assisted laser desorption/ionization–tandem time of flight (MALDI–TOF/TOF; Applied BioSystems 4800) MS. A peak with mass $M+1 = 1438.8125$ corresponding to $G(Kac^5)GG(Kac^8)GLG(Kac^{12})GGA(Kac^{16})R$ was detected and its identity confirmed by the fragmentation spectrum.

that histone H4 was indeed tetra-acetylated on lysines 5, 8, 12 and 16 in round/elongating spermatids (Fig. 1e). A semiquantitative analysis revealed that the level of tetra-acetylated H4 was more than fivefold higher in round/elongating spermatids than in spermatocytes, comparable to the increase induced in a somatic mouse cell line by treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) (Supplementary Fig. 3). Importantly, the first defects detected in BD1 knockout mice also appear in post-meiotic elongating spermatids⁸. The selectivity of BD1 towards H4K5acK8ac *in vitro* fits neatly with these observations.

To understand how BD1 mediates cooperative binding, we solved the 2.4 Å crystal structure of BD1 bound to an H4K5acK8ac peptide. (Statistics are summarized in Supplementary Table 1.) BD1 exhibits the standard bromodomain fold¹⁸: a left-handed bundle of four helices (α Z, α A, α B and α C) with a peptide-binding pocket defined by a short BC and an elaborate ZA loop (Fig. 2a). BD1 aligns well with known bromodomain structures, and among ligand-bound structures most closely resembles that of yeast GCN5 (ref. 19) (yGCN5; Supplementary Table 2). BD1 recognizes H4 residues 4–10 in an orientation anti-parallel to that of the yGCN5 ligand (Fig. 2b and Supplementary Figs 4 and 5a). Both acetyl-lysine side chains point into the BD1-binding pocket: K5ac extends perpendicularly from the peptide backbone, inserting deep into the pocket, while K8ac reaches diagonally towards K5ac. A water-mediated hydrogen bond between the K5ac acetyl and K8ac amide groups structurally links the two post-translational

modifications (PTMs) (Fig. 2c, d). The Kac-GG-Kac tetrapeptide motif thus forms a composite binding epitope resembling a two-pronged plug, with the left prong bent towards the right.

BD1 recognition of the K5ac side chain is prototypical: compared to yGCN5, the hydrogen bond between K5ac and Asn 108, the hydrophobic contacts involving Val 55, Leu 62 and Cys 104, and the characteristic ring of five water molecules stabilized by ZA- and BC-loop carbonyl groups are all conserved (Fig. 2c, d). However, in yGCN5 a tyrosine (Tyr 413) packs against the entire length of the acetyl-lysine side chain, whereas in BD1 the corresponding isoleucine (Ile 114) contacts only the acetyl group (Supplementary Fig. 5b). As a result, the keyhole-like pocket that engages the acetyl-lysine side chain in yGCN5 is wider in BD1, accommodating both acetyl-lysines (Fig. 2b). Mutating residue Ile 114 either to tyrosine (as in yGCN5) or to tryptophan (for increased steric hindrance) abolished the binding of BD1 to H4K5acK8ac, confirming the importance of this residue in ligand recognition (Supplementary Fig. 5c and Table 1). The K8ac side chain is recognized by BD1 primarily through hydrophobic contacts: the acetyl moiety's methyl group by Leu 60, and the aliphatic lysyl moiety by residues Trp 49, Pro 50 and Met 117. A similarly oriented unmodified lysine would unfavourably bury its positive charge in this apolar environment, explaining why monoacetylated H4K5ac binds poorly. Additional specificity is due to H4 residue Leu 10, which interacts with three hydrophobic residues (Phe 47, Trp 49 and Val 116), and to extensive recognition of the peptide backbone

Table 1 | Summary of ITC data

Binding experiment	Lysines acetylated	K_d (μ M)	N^*		
δC-sBrdt + H4					
(1)	None	Large†	ND	5 8 12 16	—
(2)	5/8/12/16	11.4 ± 2.2	1.01 ± 0.03		++
(3)	5/8	8.9 ± 1.2	1.03 ± 0.03		++
(4)	5/16	350 ± 45	1.01 ± 0.06		+
BD1 + H4					
(5)	None	Large	ND		—
(6)	5/8/12/16	28.0 ± 6.1	1.01 ± 0.02		++
(7)	5	Large	ND		—
(8)	8	Large	ND		—
(9)	12	Large	ND		—
(10)	16	Large	ND		—
(11)	5/8	21.9 ± 1.7	1.00 ± 0.03		++
(12)	8/12	193 ± 22	1.06 ± 0.01		+
(13)	12/16	117 ± 22	0.99 ± 0.04		+
(14)	5/12	340 ± 67	1.01 ± 0.04		+
(15)	8/16	Large	ND		—
(16)	5/16	Large	ND		—
BD1 + H2B					
(17)	12/15	157 ± 15	1.00 ± 0.04	12 15	+
BD1 + H3					
(18)	9/14/18/23	390 ± 36	1.00 ± 0.06	9 14 18 23	+
(19)	18	Large	ND		—
BD2 + H3					
(20)	None	Large	ND		—
(21)	9/14/18/23	214 ± 48	1.03 ± 0.11		—
(22)	9/14	Large	ND		+
(23)	14/18	217 ± 28	1.00 ± 0.05		+
(24)	18/23	176 ± 52	1.00 ± 0.03		+
(25)	9/18	360 ± 140	1.01 ± 0.03		+
(26)	14/23	Large	ND		—
(27)	14	Large	ND		—
(28)	18	251 ± 62	1.03 ± 0.11		+
(29)	23	Large	ND		—
BD2 + H4					
(30)	5/8/12/16	Large	ND		—
BD1-I114Y + H4					
(31)	5	Large	ND		—
(32)	5/8	Large	ND		—
BD1-I114W + H4					
(33)	5	Large	ND		—
(34)	5/8	Large	ND		—
BD1-mutBC + H4					
(35)	5	$1,010 \pm 50$	1.00 ± 0.10		±
(36)	5/8	195 ± 23	1.00 ± 0.05		+
BD1-mutBC + H3					
(37)	18	345 ± 45	1.00 ± 0.08		+

Mean and s.d. were determined from experiments performed in triplicate. Horizontal lines separate experiments involving different protein constructs. At right, relative binding is summarized as strong (++) , significant (+) or weak/non-detectable (—). ND, not determined.

* Binding stoichiometry.

† Poor or no binding detected ($K_d > 1$ mM).

by the BC and ZA loops, which make water-mediated and direct hydrogen bonds with K5ac, Gly6, K8ac and Gly9 (Fig. 2c–e). These backbone contacts would be partly disrupted in diacetylated ligands with three or more residues between acetylation marks, accounting for the lower affinity of such peptides (Table 1).

To gain additional insights we solved the 2.15 Å structure of BD2 bound to H3K18ac. BD2 interacts with H3 residues 16–22: recognition of K18ac matches that of K5ac by BD1, and further specificity is achieved through a hydrogen bond to the peptide main chain, a salt bridge to Arg 17 and hydrophobic contacts to Leu 20 (Supplementary Fig. 6). Like BD1, BD2 has a binding pocket wide enough to accommodate two acetyl-lysine side chains. However, aligning the BD1 and BD2 structures reveals a steric clash between the BC loop of BD2 and the superimposed H4K5acK8ac peptide (Supplementary Fig. 7), underscoring that pocket size does not uniquely determine diacetylated ligand recognition. We surmised that replacing the BC loop of BD1 with that of BD2 would result in a mutant (BD1-mutBC) with altered ligand selectivity. Indeed, BD1-mutBC binds to H4K5ac and

H3K18ac slightly better, and to H4K5acK8ac nine times worse, than wild-type BD1, corresponding to a more than tenfold reduction in selectivity towards the diacetylated ligand (Table 1, compare rows 7, 11 and 19 with 35–37; see also Supplementary Fig. 8). We previously described two triple mutations within the ZA loops, P50A/F51A/V55A (mutPFV1) and P293A/F294A/V298A (mutPFV2), that abolish ligand binding by BD1 and BD2, respectively⁷. This loss of binding is rationalized by our crystal structures, which show that the mutated residues form direct and water-mediated contacts with the H4K5ac and H3K18ac side chains (Fig. 2c and Supplementary Fig. 6c).

To assess the functional significance of BD1-mediated H4K5acK8ac recognition, we introduced the above mutations into an haemagglutinin (HA)-tagged δ C-sBrdt construct and assayed for acetylation-dependent chromatin compaction activity using TSA to induce chromatin hyperacetylation. As previously reported⁷, wild-type δ C-sBrdt and mutPFV2 both compacted chromatin in a TSA-dependent manner, whereas compaction was abolished for mutPFV1 (Supplementary Fig. 9, Hoechst panels). The I114Y and I114W mutants also abolished TSA-dependent compaction, whereas mutBC behaved like the wild type. These results indicate that (at least partial) ligand-binding activity by BD1 is required for compaction, whereas that by BD2 is dispensable (Fig. 3c). For further insights we introduced the mutations into a green fluorescent protein (GFP)-tagged δ C-sBrdt construct and used fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) to examine retention on hyperacetylated chromatin. In the absence of TSA, mutants and wild type behaved similarly: bleached regions rapidly recovered fluorescence, exhibiting a time to half-maximal recovery ($t_{1/2}$) of ~ 3 s (Fig. 3 and Supplementary Fig. 10). Addition of TSA greatly retarded recovery of the wild-type protein and of mutPFV2 ($t_{1/2} \sim 20$ s), indicating significant retention on acetylated chromatin. In contrast, TSA had no effect on mutants with BD1 domains completely defective for ligand binding (mutPFV1, I114Y/W), and had an intermediate effect ($t_{1/2} \sim 8$ s) for mutBC, whose BD1 domain has reduced affinity for H4K5acK8ac (Table 1). The recovery time thus mirrors the binding affinity of BD1 towards H4K5acK8ac (last two columns in Fig. 3c), highlighting the importance of this interaction for the stability of Brdt on acetylated chromatin *in vivo*.

Superimposing our BD1–ligand complex onto known bromodomain structures revealed that several bromodomains were sterically compatible with the superimposed K5ac-GG-K8ac tetrapeptide (Supplementary Fig. 11). This has possible implications for the following proteins.

First, other BET proteins. The BD1 and BD2 domains are highly conserved among BET proteins (for example, Brd2-BD1 is 70% identical to Brdt-BD1 and preserves all contacts with the K5ac-GG-K8ac tetrapeptide when structurally aligned with Brdt-BD1). Moreover, the ligand specificity of many BET proteins resembles that of Brdt-BD1: Brd2 and Brd4 both bind to tetra-acetylated H4 and to an H4 peptide diacetylated on K5/K12, but not on K8/K16 (refs 16, 20), and Bdf1 binds hyperacetylated H3 and H4 tails, associating more stably with the latter^{13,14}. Thus, BD1-mediated diacetylated ligand recognition is probably a conserved feature of the BET family.

Second, TAF1. The TAF1 double bromodomain cooperatively binds H4 peptides diacetylated on K5/K12 or K8/K16, an ability putatively attributed to TAF1 simultaneously engaging one acetyl-lysine residue in each binding pocket⁵. As previously noted¹⁹, however, such a binding mode would imply a large conformational change of TAF1 (Supplementary Fig. 12). In light of the present study, an alternative (or additional) binding mode in which TAF1 recognizes diacetylated ligands through a single bromodomain is conceivable.

Third, CBP/p300. The bromodomains of CBP and p300 bind the transcription factor MyoD by recognizing a motif acetylated either on Lys 99 or on both Lys 99 and Lys 102 (refs 21, 22). CBP discriminates poorly between mono- and diacetylated MyoD, whereas p300 prefers the diacetylated form²². Structural alignment with Brdt shows that both bromodomains (which share 97% sequence identity) are sterically compatible with the superimposed K5ac-GG-K8ac tetrapeptide,

but that p300 can hypothetically form an extra hydrogen bond (Supplementary Fig. 13). The ability to rationalize the difference in selectivity suggests that CBP/p300 may use a mode of diacetylated ligand recognition similar to that by Brdt-BD1.

The present work describes an effector module that mediates positive cooperativity by engaging two histone PTMs in a common binding pocket. Unlike linked modules that are constrained by a minimal inter-domain distance, a common pocket is ideal for mediating cross-talk between PTMs located closely on a histone tail. Brdt-BD1 binds two PTMs of the same chemical type. Whether a single module can mediate agonistic interactions between heterotypic PTMs is a question for future study.

METHODS SUMMARY

Recombinant δ C-sBrdt, BD1 and BD2 constructs were bacterially expressed and purified using standard techniques. BD1 and BD2 were co-crystallized with acetylated histone tail peptides by hanging drop vapour diffusion. Diffraction data were collected using synchrotron radiation. Crystal structures were solved by molecular replacement.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 19 April; accepted 13 August 2009.

- Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407–412 (2007).
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693–705 (2007).
- Taverna, S. D., Li, H., Ruthenburg, A. J., Allis, C. D. & Patel, D. J. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**, 1025–1040 (2007).
- Ruthenburg, A. J., Li, H., Patel, D. J. & Allis, C. D. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 983–994 (2007).
- Jacobson, R. H., Ladurner, A. G., King, D. S. & Tjian, R. Structure and function of a human TAF_{II}250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422–1425 (2000).
- Florence, B. & Faller, D. V. You BET-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Front. Biosci.* **6**, d1008–d1018 (2001).
- Pivot-Pajot, C. *et al.* Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5354–5365 (2003).
- Shang, E., Nickerson, H. D., Wen, D., Wang, X. & Wolgemuth, D. J. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* **134**, 3507–3515 (2007).
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S. & Khochbin, S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3459–3469 (2004).
- Rousseaux, S. *et al.* Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene* **345**, 139–153 (2005).
- Crowley, T. E., Kaine, E. M., Yoshida, M., Nandi, A. & Wolgemuth, D. J. Reproductive cycle regulation of nuclear import, euchromatic localization, and association with components of Pol II mediator of a mammalian double-bromodomain protein. *Mol. Endocrinol.* **16**, 1727–1737 (2002).

- Leroy, G., Rickards, B. & Flint, S. J. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol. Cell* **30**, 51–60 (2008).
- Ladurner, A. G., Inouye, C., Jain, R. & Tjian, R. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol. Cell* **11**, 365–376 (2003).
- Matangkasombut, O. & Buratowski, S. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Mol. Cell* **11**, 353–363 (2003).
- Toyama, R., Rebbert, M. L., Dey, A., Ozato, K. & Dawid, I. B. Brd4 associates with mitotic chromosomes throughout early zebrafish embryogenesis. *Dev. Dyn.* **237**, 1636–1644 (2008).
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T. & Ozato, K. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 8758–8763 (2003).
- Dey, A. *et al.* A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G₂-to-M transition. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6537–6549 (2000).
- Mujtaba, S., Zeng, L. & Zhou, M. M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521–5527 (2007).
- Owen, D. J. *et al.* The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p. *EMBO J.* **19**, 6141–6149 (2000).
- Kanno, T. *et al.* Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol. Cell* **13**, 33–43 (2004).
- Poleskaya, A. *et al.* Interaction between acetylated MyoD and the bromodomain of CBP and/or p300. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5312–5320 (2001).
- Wei, L., Jamonnak, N., Choy, J., Wang, Z. & Zheng, W. Differential binding modes of the bromodomains of CREB-binding protein (CBP) and p300 with acetylated MyoD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **368**, 279–284 (2008).
- Govin, J. *et al.* Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* **176**, 283–294 (2007).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank the ESRF and EMBL staff for beamline assistance, the Partnership for Structural Biology (PSB) for access to technical platforms, M. Jamin for MALLS experiments, G. Natrajan and V. Rybin for help with ITC, C. Soucier for help with FRAP, D. Panne and C. Clapier for comments on the manuscript, and S. Cusack for critical support. Work in the S.K. laboratory was supported by ANR blanche 'EpiSperm' and 'Empreinte', INCa and 'ARECA' (ARC) research programmes. J.Ga. was supported by a Ph.D. fellowship from the Rhône-Alpes region. J.M. was supported by an 'E-STAR' fellowship funded by EU FP6. C.P. acknowledges support from the ANRS/Fondation de France AIJC and CNRS ATIP programmes.

Author Contributions M.S.-L., D.J.H., S.K. and C.W.M. initiated the study. S.K., C.P. and C.W.M. coordinated the entire project and specific author contributions. J.M., S.R., U.S., M.S.-L., A.-L.V. and D.J.H. prepared constructs. J.M., U.S. and M.S.-L. expressed, purified and crystallized BD1 and BD2. J.M. and U.S. performed and analysed ITC and biophysical experiments. J.M., M.S.-L. and C.P. measured diffraction data and solved the crystal structures. C.P. and C.W.M. analysed structural and biochemical data. J.Go. performed immunoblot analysis and immunofluorescence microscopy. S.C. and S.R. performed FRAP and chromatin compaction experiments. J.Ga. prepared histones for MS/MS analysis. K.S. and J.K. performed the MS/MS analysis. C.P. wrote the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Author Information Atomic coordinates and structure factors have been deposited with the Protein Data Bank under accession codes 2WP2 (BD1) and 2WP1 (BD2). Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.W.M. (christoph.mueller@embl.de).

METHODS

Protein purification and histone peptides. Murine δ C-sBrdt (residues 2–442), BD2 (residues 257–383) and two BD1 constructs (residues 23–142 for ITC; residues 17–136 for crystallization) were cloned from mouse Brdt cDNA (GenBank accession number AF019085) as fusion constructs containing an N-terminal His tag and a TEV protease site. δ C-sBrdt corresponds closely to the human sequences with GenBank accession numbers AAH05281, AAH17582, AAH62700 and AAH47900, but lacking their C-terminal 20-residue lysine-rich tail. BD1-mutBC was generated from BD1 (residues 23–142) by replacing residues 109–114 (KTGDDI) with residues 352–357 (PPDHEV). Expression of BD1 constructs was from a pETM11 vector in *Escherichia coli* strain BL21(DE3). Expression of BD2 and δ C-sBrdt constructs was from a pFAR1201 vector (a pTriEx (Novagen) derivative with N-terminal His tag and TEV protease site) in *E. coli* strain BL21-AI (Invitrogen). Proteins were purified by two Ni-NTA (Qiagen) chromatography steps interspaced by TEV cleavage to remove the His tag, and followed by either Superdex 75 (BD1 and BD2) or Superdex 200 (δ C-sBrdt) chromatography (GE Healthcare). Cell lysis and Ni-NTA steps were performed in 500 mM NaCl, 1 mM DTT and 50 mM HEPES (pH 7.5 for BD1 and BD2, pH 8.0 for δ C-sBrdt). Gel filtration was in 100 mM NaCl, 10 mM HEPES (pH 7.5 or 8.0), and either 1 mM (for crystallization) or no DTT (for ITC). Protein concentrations were measured by ultraviolet absorbance at 280 nm using an extinction coefficient determined by amino acid analysis.

Peptides corresponding to mouse histone H4 residues 1–20, histone H2B residues 3–22, and either histone H3 residues 4–27 (for ITC) or H3 residues 14–23 (for crystallization) were chemically synthesized with the relevant lysine(s) acetylated. Lyophilized peptides were dissolved in the gel filtration buffer used to purify the bromodomain of interest. Peptide concentrations were determined by amino acid analysis.

Isothermal titration calorimetry. Experiments were performed with a MicroCal VP-ITC calorimeter at 25 °C. Peptides (1.9–5.6 mM) were injected in 5 μ l aliquots every 300 s into a cell containing 1.7 ml of protein (50–160 μ M). Data were analysed using ORIGIN software (MicroCal). Average values of K_d and N (binding stoichiometry) were determined from three or more experiments.

Crystallization. Hanging drop crystallization was performed at 20 °C by combining equal volumes of reservoir solution and one of three protein/peptide complexes, made by mixing either BD1 (residues 17–136) at 15 mg ml⁻¹ with H4K5acK8ac in a 1:20 molar ratio; or BD2 at 25 mg ml⁻¹ with H3K18ac in a 1:5 molar ratio. Crystallization conditions were 2.4 M (NH₄)₂SO₄, 0.1 M HEPES (pH 7), and 2.0 M (NH₄)₂SO₄, 2% PEG 400, 0.1 M HEPES (pH 7.5).

Structure determination. Crystals were cryoprotected with 30% glycerol and flash-cooled in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at ESRF beamlines ID23-1 (λ = 0.954 Å; BD2) and ID23-2 (λ = 0.873 Å; BD1) on an ADSC Quantum 4 detector and processed with XDS²⁴ and programs of the CCP4 suite²⁵. The BD2 structure was solved by molecular replacement with Phaser²⁶ using the yGCN5 bromodomain as search model. The BD1 structure was solved using the refined BD2 structure as search model. Model building was performed with Coot²⁷ and refinement with CNS²⁸.

FRAP. Cos7 cells grown on Labtek glass coverslips were transfected with 2 μ g of wild-type or mutated GFP- δ C-sBrdt using lipofectamine, treated with TSA (50 ng ml⁻¹) and incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 16 h. FRAP analysis was performed on ten independent nuclei using a Confocor II Zeiss microscope equipped with a 488 nm laser and a LP505 filter. A circular region 4.4 μ m in diameter was bleached for 0.7 s; fluorescence was measured in an area comprising over 50% of the bleached region.

24. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800 (1993).
25. CCP4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D* **50**, 760–763 (1994).
26. Storoni, L. C., McCoy, A. J. & Read, R. J. Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr D* **60**, 432–438 (2004).
27. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D* **60**, 2126–2132 (2004).
28. Brünger, A. T. et al. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D* **54**, 905–921 (1998).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Data

	BD1 : H4-acK5/K8	BD2 : H3-acK18
Brdt residues	17-136	275-382
Histone residues in peptide	H4: 1-20	H3: 14-23
Space Group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₁ 2 ₁ 2
Cell parameters (Å)	a=49.3 b=61.2 c=97.9	a= b=101.3 c=79.3
ESRF Beamline	ID23-2	ID23-1
Resolution (Å), overall	20 – 2.4	20 – 2.15
outer shell	2.5 – 2.4	2.2 – 2.15
R _{sym} ^{a,b}	14.2 (41.0)	10.9 (49.7)
Total number of reflections	39432 (3477)	217882 (8115)
Number of unique reflections	11851 (1266)	28347 (1002)
Completeness (%)	97.8 (92.9)	91.6 (93.8)
Redundancy	3.3 (2.7)	7.7 (8.1)
I / σ(I)	7.3 (2.8)	7.0 (3.0)
R _{cryst} /R _{free} ^c	20.1 / 25.6	22.5 / 25.5
Number of protein/water atoms	1965 / 157	2041 / 253
Rmsd bond lengths (Å) / angles (°)	0.007 / 1.16	0.013 / 1.35
Residues in Ramachandran plot(%)		
Most favoured/additonally allowed	91.0 / 9.0	93.6 / 6.4

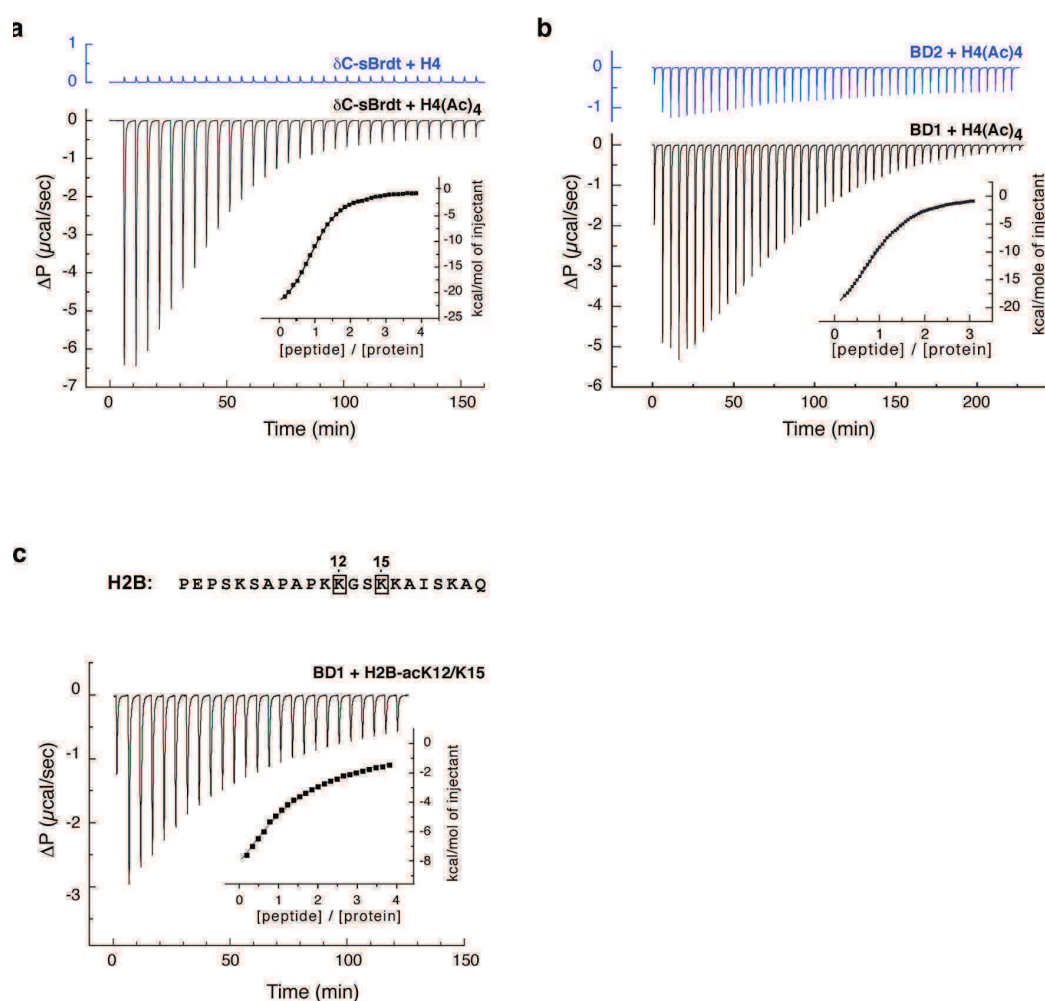
Supplementary Table 1. Crystallographic Data.^a Values in parentheses refer to the outer resolution shell.^b $R_{\text{sym}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, where I is the observed intensity of a given reflection.^c $R_{\text{cryst}} = \sum |F_o - F_c| / \sum F_o$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure factor amplitudes, respectively. R_{free} is equal to R_{cryst} for a randomly selected 5% subset of reflections not used in the refinement.

Protein	PDB id	Ligand	Ligand sequence	Similarity with BD1		Similarity with BD2		Reference
				rmsd (Å)	%Seq. id	rmsd (Å)	%Seq. id	
Brd1, BD1		H4-acK5/K8	G(acK)GG(acK)GL	0.00	100	1.25	39.8	This work
“ , BD2		H3-acK18	PR(acK)QLAT	1.25	39.8	0.00	100	“ “
Brd2, BD1	1X0J*	none		0.51	70.4	1.27	43.9	1
yeast Gcn5	1E6I*	H4-acK16	(acK)RHK	1.26	37.8	1.05	34.7	2
BPTF	2F6J*	none		1.31	40.8	1.20	35.7	3
yeast Rsc4, BD2	2R0V*	none		1.42	29.6	1.54	27.0	4
“ , BD1	“	Rsc4-K25Ac	YLPG(acK) HPK	2.19	25.5	2.15	22.2	4
CBP	2RNY†	H4-acK20	KRHR(acK)VLRD	1.54	35.7	1.42	37.8	5
“	1JSP†	P53-acK382	HK(acK)LMFK	2.65	“	2.59	“	6
PCAF	2RNW†	H3-acK9	QTAR(acK)STGG	1.73	33.7	1.57	34.7	5
“	2RNX†	H3-acK36	TGGV(acK)KPHR	1.81	“	1.60	“	5
“	1N72†	Ac-histamine		1.93	“	1.76	“	7
“	1JM4†	HIV1 Tat-acK50	YGR(acK)KRRQ	2.22	“	2.04	“	8
Brg1	2GRC*	none		1.79	24.5	1.87	21.0	9
Gcn5	1F68†	none		1.88	33.7	1.58	32.6	10
TafII250, BD2	1EQF*	none		1.85	30.6	1.86	30.2	11
“ , BD1	“	none		2.04	24.5	2.32	25.5	11
Brd7	2I7K†	none		2.20	29.6	2.03	23.1	12
Brd4, BD2	2I8N†	none		1.69	38.8	1.70	73.0	13
KAP1	2RO1†	none		2.98	20.4	3.04	22.0	14

Supplementary Table 2. Comparison of BD1 and BD2 from Brdt with previously described bromodomain structures.

Entries are listed in decreasing order of structural similarity with BD1, except where two or more structures are from the same polypeptide. All entries are human unless otherwise specified; Brdt is from mouse. BD1 residues 33-130 and BD2 residues 274-373 were used for the structural alignments. Rmsd values are normalized to 100 Cα atoms to facilitate comparison.

*,† Structures determined by crystallography or by NMR, respectively. For structures with non-crystallographic symmetry, the mean rmsd is shown for all chains in the asymmetric unit. In the case of structures determined by NMR, the rmsd is shown for the first model in the PDB entry.



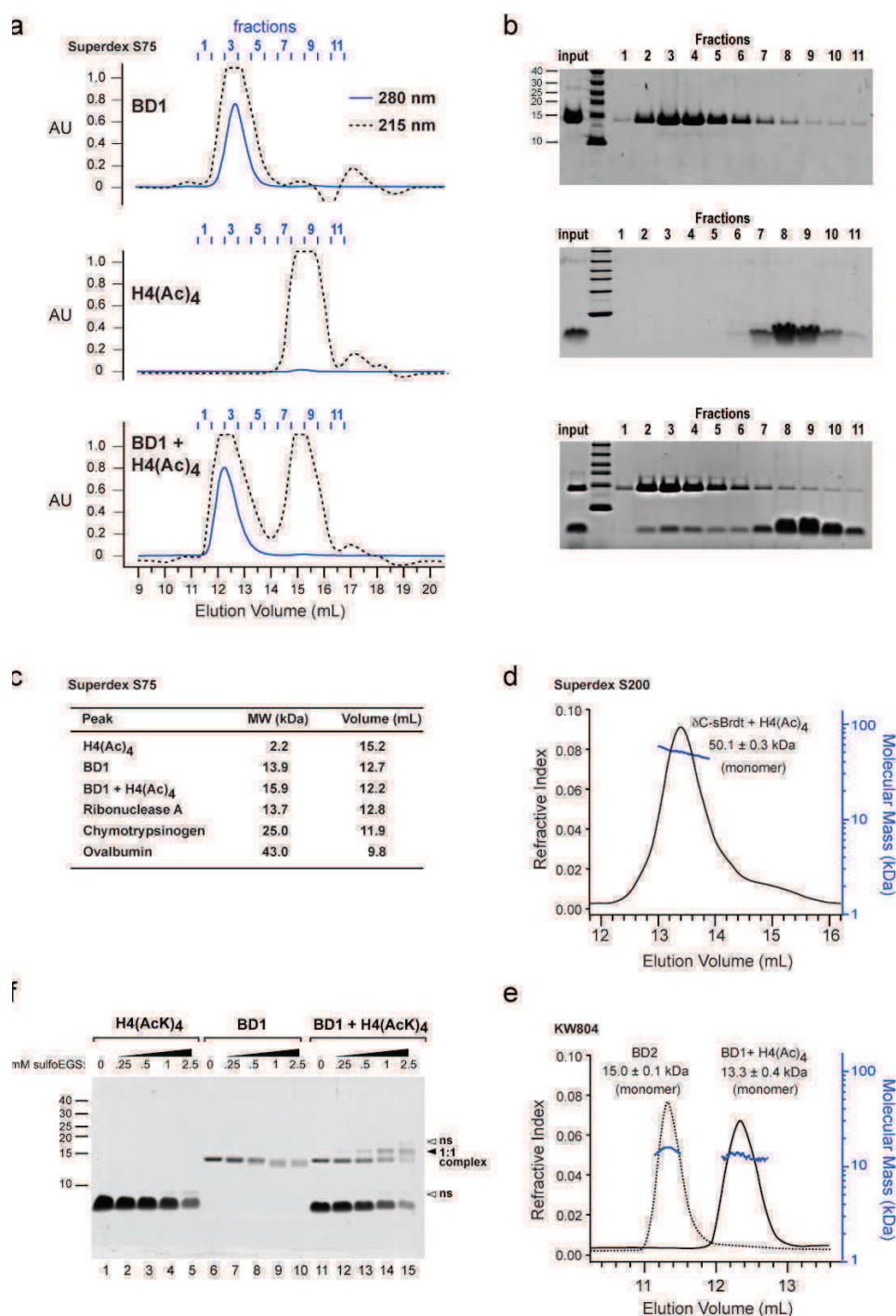
Supplementary Figure 1. ITC profiles of histone tail binding by Brdt.

a. $\delta\text{C-sBrdt}$ binds a tetra-acetylated H4 tail peptide (bottom) but not an unmodified H4 tail (top).

150 μM protein was titrated with 2 mM peptide. ΔP , differential power.

b. ITC profiles showing the binding of Brdt-BD1 and -BD2 to a tetra-acetylated H4 tail.

c. Binding of BD1 to a diacetylated histone H2B tail.

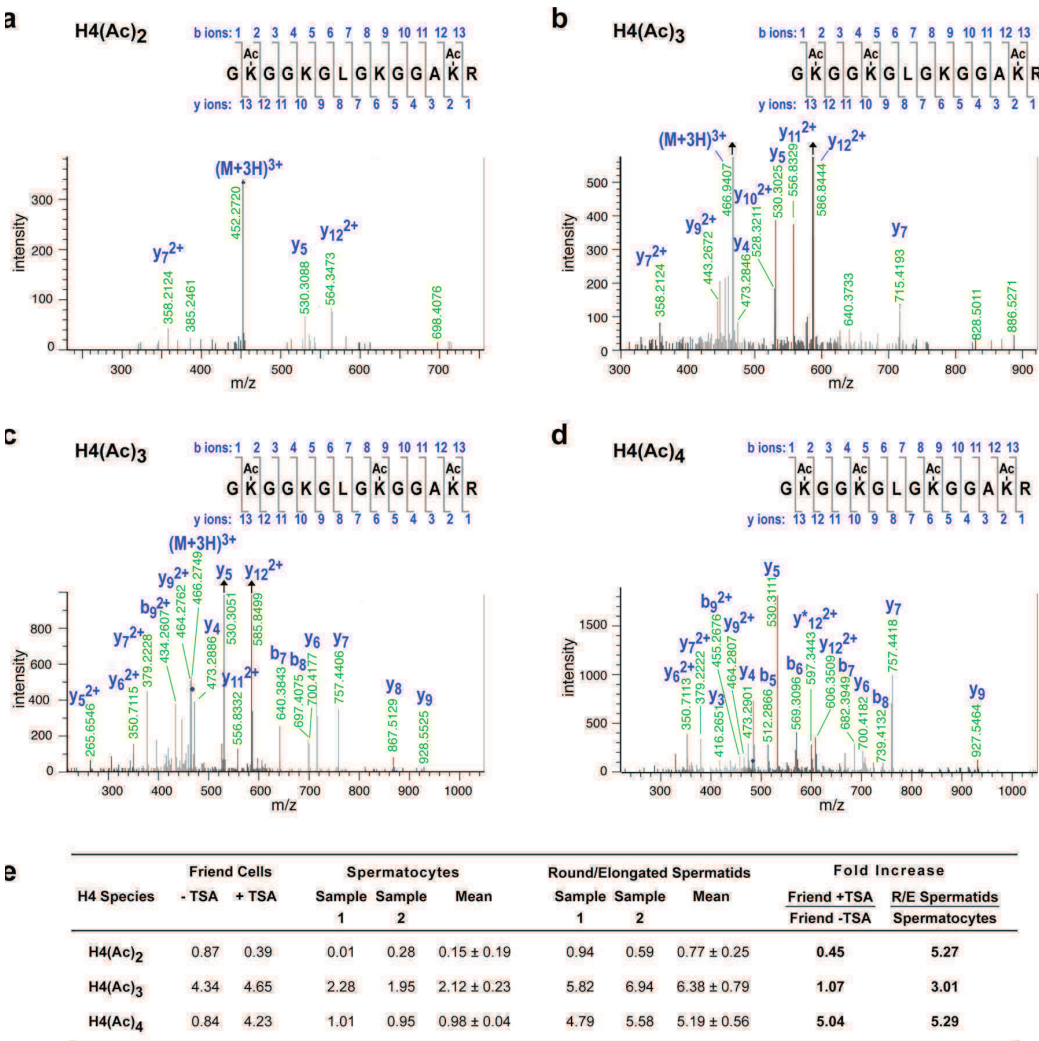


Supplementary Figure 2. Brdt and its bromodomains are monomeric in solution.

a-c. Size exclusion chromatography of BD1, the H4(Ac)₄ peptide, and a BD1-peptide mixture. 0.5 mL samples containing either 63 μ M BD1, 630 μ M H4(Ac)₄, or both were injected onto a S75 Superdex 10/300 (GE Healthcare) column equilibrated with 150 mM NaCl and 20 mM TRIS-HCl (pH 7.5) at 20 °C. **a.** Elution profiles. Absorbance was additionally monitored at 215 nm to detect the peptide, which contains no aromatic residues (the trace becomes saturated at the protein and peptide peaks). **b.** Fractions analyzed by denaturing gel electrophoresis (on a 17% Tris-Tricine polyacrylamide gel) showing that the peptide co-elutes with BD1. **c.**

Comparison to calibration standards show that the elution volumes of the BD1 and BD1+H4(Ac)₄ peaks are consistent with a monomeric species and a 1:1 complex, respectively.

d,e. Size exclusion chromatography and molecular mass determination by multiangle laser light scattering (MALLS) and refractometry of **(d)** δ C-sBrdt and **(e)** bromodomains BD1 (solid) and BD2 (dotted). 20 μ L of protein at 5–10 mg/mL were injected onto an **(d)** S200 Superdex (GE Healthcare) or **(e)** KW804 (Shodex) column equilibrated with 150 mM NaCl and 20 mM Tris–HCl (pH 7.5) at 20 °C. Brdt and BD1 were incubated with an 8-fold molar excess of H4(Ac)₄ peptide prior to injection. Profiles recorded in the absence of peptide were nearly identical. Online MALLS and refractive index data were recorded on a DAWN-EOS detector (Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA) using a laser emitting at 690 nm and on a RI2000 detector (Schambeck SFD), respectively. Data were analyzed using ASTRA software (Wyatt Technology Corp.) as described¹⁵. The results indicate that the proteins are monomeric in solution, in the presence and absence of peptide. **f.** Cross-linking assay. BD1 (24 μ M), the H4(Ac)₄ peptide (550 μ M), or a mixture of the two were incubated in 20mM Hepes pH 8.0, 100mM NaCl with 0 - 2.5 mM of the cross-linking agent ethylene glycol bis[sulfosuccinimidylsuccinate] (sulfo-EGS), which reacts with lysines and N-terminal amino groups. At high (≥ 1 mM) sulfo-EGS concentrations, non-specific (ns) cross-linking can be observed for the peptide (lanes 4-5) and protein-peptide mixture (lanes 14-15). At lower concentration, a species migrating at the position expected for a 1:1 complex is clearly observed (lanes 12-13). No species corresponding to a BD1 dimer is detected in either the presence or absence of peptide.



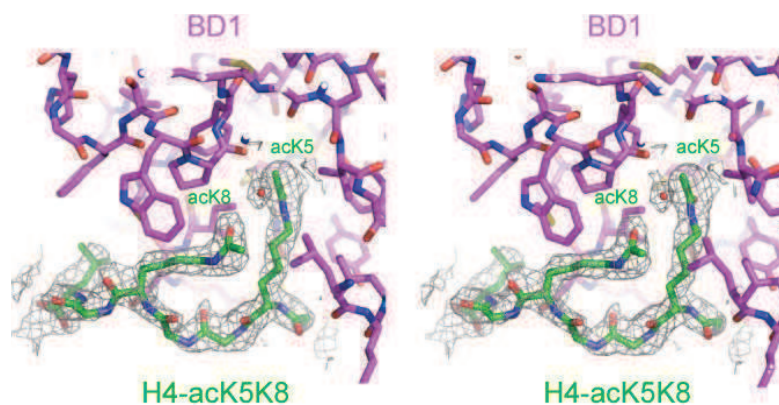
Supplementary Figure 3. Mass spectrometry analysis of histone H4 from mouse spermatogenic cells

a-e. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis was performed to identify and relatively quantify the acetylation status of histone H4 in Friend cells (a murine erythroleukemia cell line), spermatocytes and round/elongated spermatids. Histones were acid-extracted from nuclei of all three cell types, and 4x50 μg of proteins of the acid extract were separated by SDS-PAGE followed by Coomassie staining. In-gel digestion with endoproteinase Arg-C (Roche) of the bands corresponding to histone H4 was performed overnight at 37°C and the digest was analysed by nano-flow reversed-phase chromatography coupled in-line to a Q-tof MaXis mass spectrometer (Bruker, Bremen). The peptide ⁴GKGGKGLGKGGAKR¹⁷ with an increasing degree of acetylation eluted as a number of subsequent peaks in the chromatograms, which were identified by MS/MS as di-acetylated (**a**), tri-acetylated (**b** and **c**), and tetra-acetylated (**d**) ⁴GKGGKGLGKGGAKR¹⁷. Di-acetylation was identified on K5 and K16,

but additional forms cannot be excluded because not all MS/MS spectra revealed the necessary detail. Tri-acetylation was observed on K5, K8 and K16 (**b**) and on K5, K12 and K16 (**c**). For relative quantitation, peak areas in the different chromatograms were calculated for di-, tri- and tetra-acetylated forms covering all charge states of the peptides. Relative abundance of each acetylated species in Friend cells +/-TSA, spermatocytes and round/elongated spermatids was expressed relative to an unrelated H4 peptide (⁶⁸DAVTYTEHAKR⁷⁸) which served as an internal reference to correct for variation between experiments (e.g. amount of starting material, efficiency of digestion and peptide extraction, amount loaded for LC-MS/MS), but does not allow an accurate comparison between differently acetylated forms. These results (**e**) show a marked increase in tetra-acetylation in TSA-treated Friend cells vs non-treated cells, and in spermatids vs spermatocytes.

a-d. Fragmentation spectra of di-, tri-, and tetra-acetylated ⁴GKGGKGLGKGGAKR¹⁷ confirming the number and position of the acetylation sites.

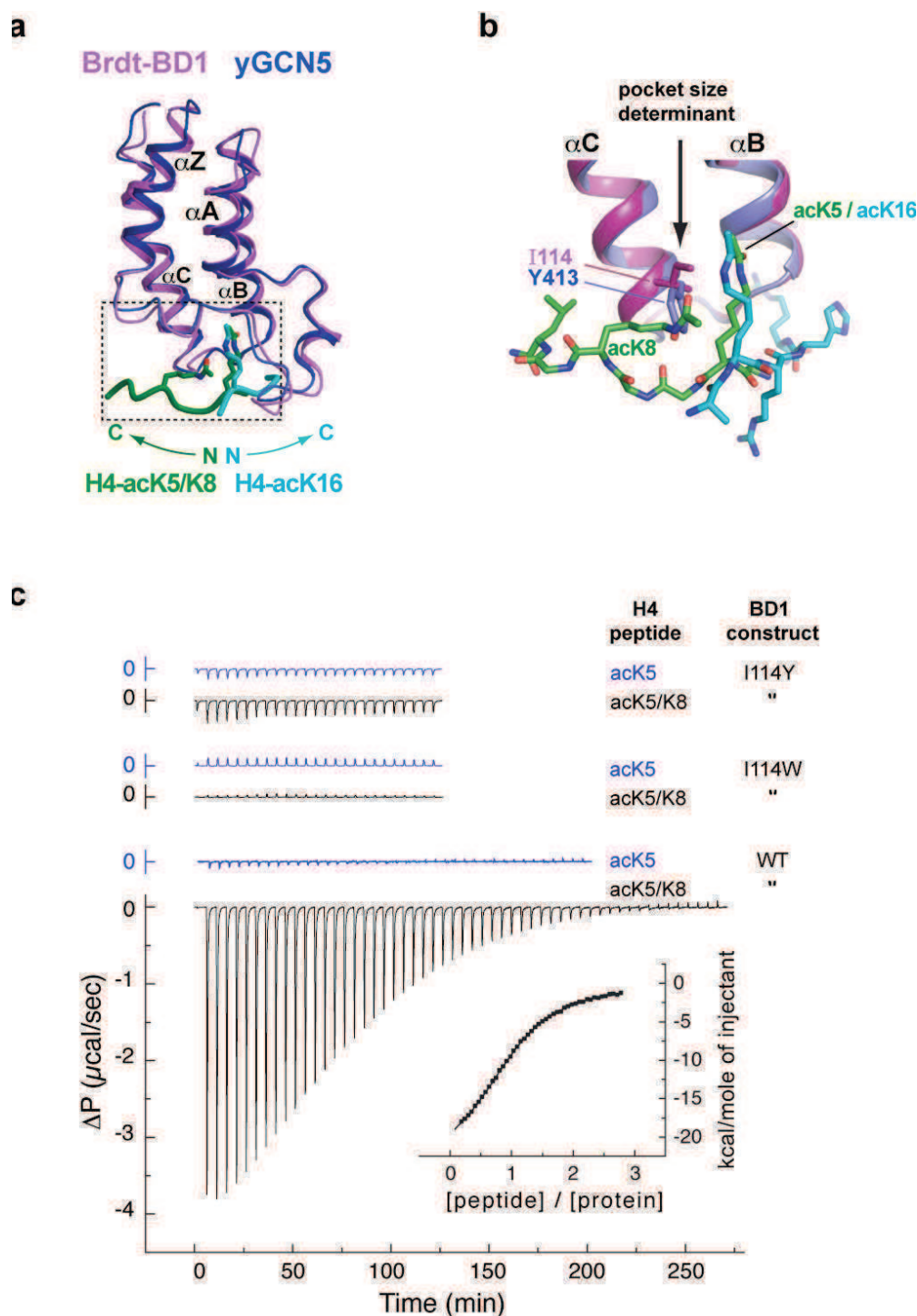
e. Relative abundance of di-, tri-, and tetra-acetylated ⁴GKGGKGLGKGGAKR¹⁷ in TSA-treated and control Friend cells, spermatocytes and spermatids.



Supplementary Figure 4. Stereo view of the peptide-binding pocket of Brdt-BD1.

Simulated-annealing $2F_o - F_c$ omit map showing the electron density for the H4-acK5/K8 peptide.

The map was calculated at 2.4 Å resolution and contoured at 1.8 σ above the mean.

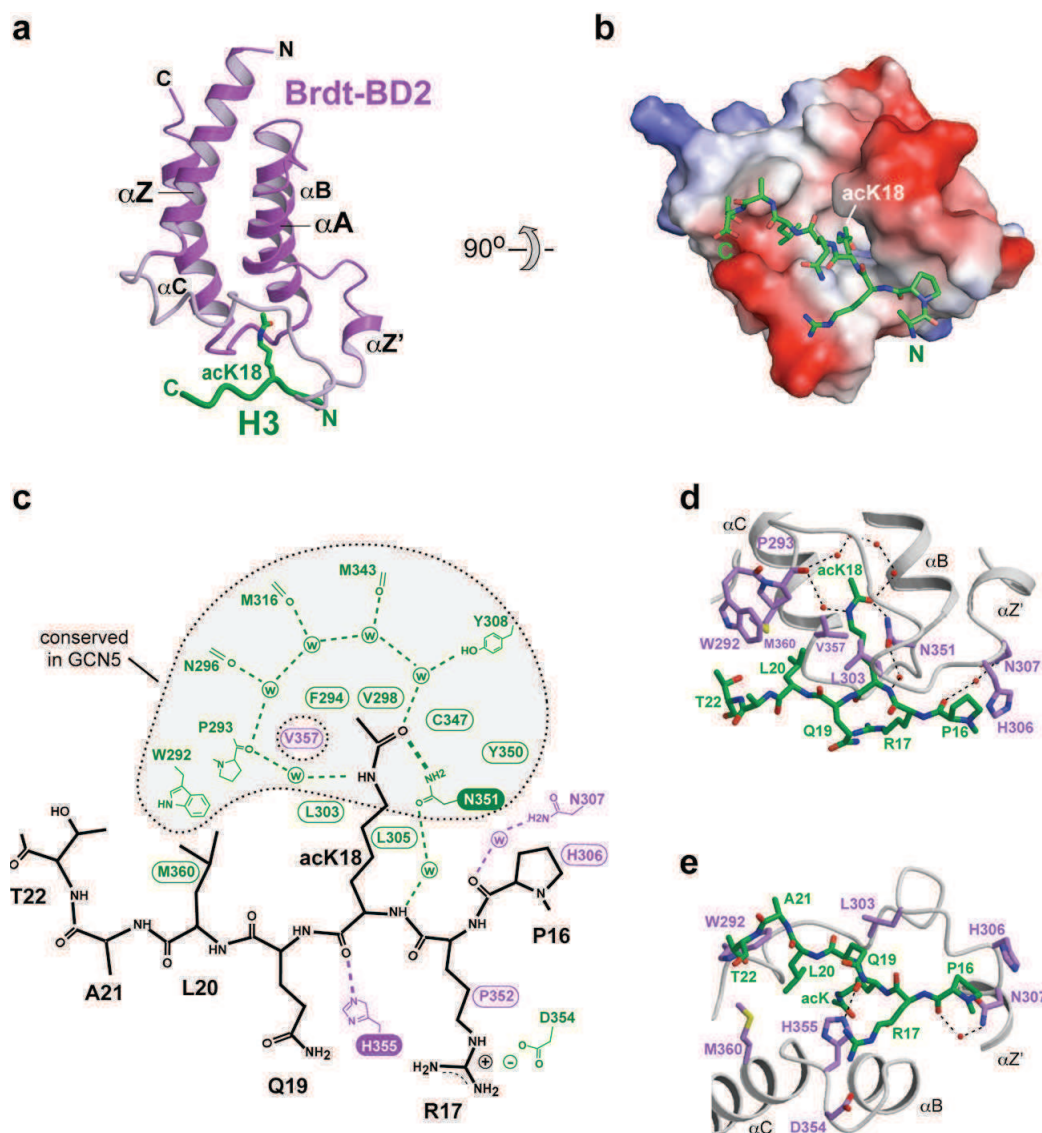


Supplementary Figure 5. Comparison of Brdt-BD1 and yGCN5 bromodomain structures.

a. Ribbon diagram showing an alignment of the Brdt-BD1 (magenta) and yGCN5 (blue) structures, with their H4 peptide ligands in green and cyan, respectively.

b. Close-up of the peptide binding site. Brdt-BD1 residue Ile114 is in van der Waals contact with H4 residue acK8. In the structural alignment, the corresponding Tyr413 residue in yGCN5 overlaps with the acK8 acetyl group, indicating that yGCN5 is sterically incompatible with the binding mode observed for H4-acK5/K8 in the Brdt-BD1 structure.

c. ITC data showing that the I114Y and I114W mutations abolish H4-acK5/K8 recognition. The mutants resemble the wildtype in being unable to bind H4-acK5. All ITC profiles are on the same scale.



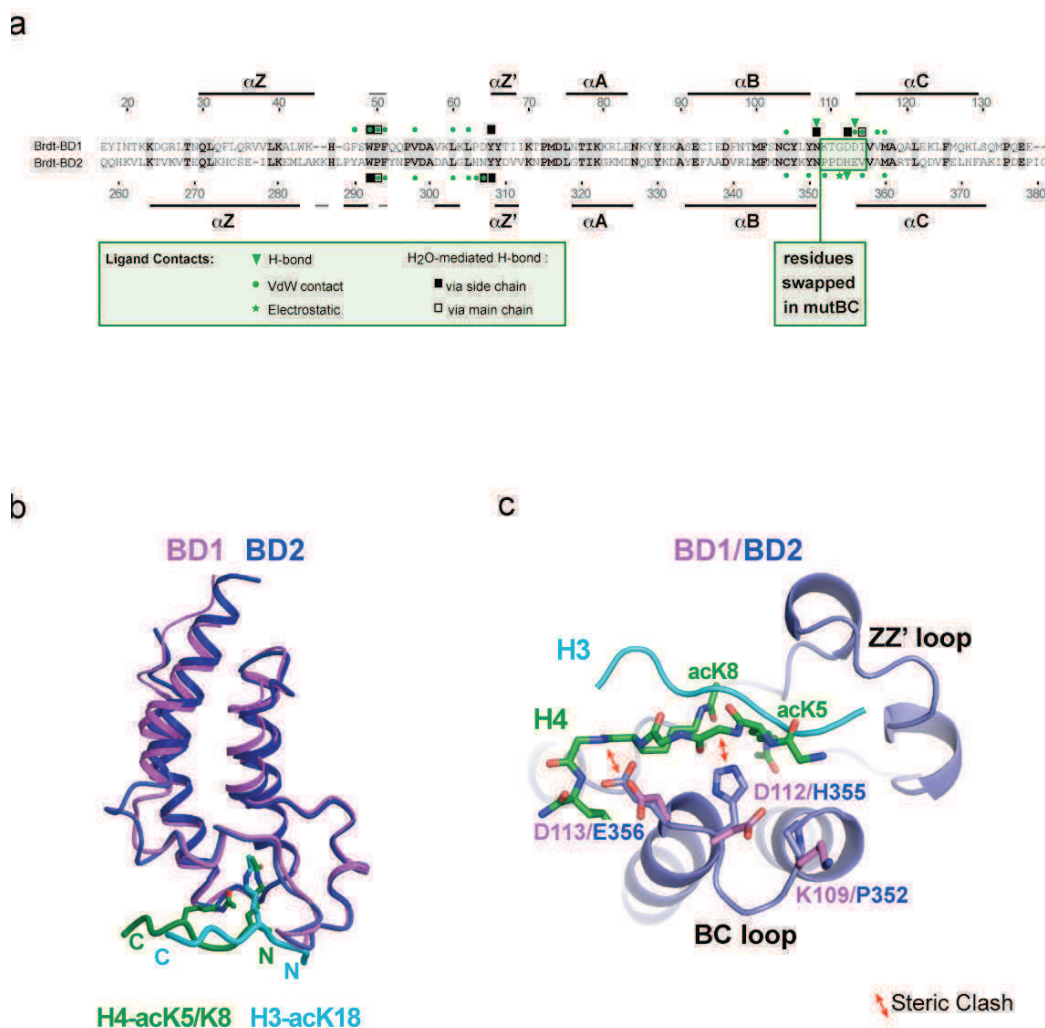
Supplementary Figure 6. Structure of Brdt-BD2 bound to an H3 tail peptide acetylated on Lys18.

a. Ribbon diagram of the BD2:H3-acK18 complex.

b. Molecular surface. The protein-peptide interface buries 560 Å² of accessible surface area (ASA), or 7% and 43% of the total protein and peptide ASAs, respectively. Regions of positive and negative electrostatic potential are shown in blue and red, respectively. The binding pocket of BD2 is more acidic than that of BD1 (compare with Fig. 2b) because the ZZ' and BC loops contain three basic residues in BD1 (Lys59, Lys61 and Lys109) not conserved in BD2, and two acidic residues in BD2 (Asp301 and Asp354) not conserved in BD1.

c. Summary of ligand contacts. Residues mediating van der Waals contacts are indicated in an oval near the peptide atom they contact; residues that directly hydrogen bond with the peptide are in inverse font. Interactions conserved in Brdt-BD1 are in green, those unique to BD2 in magenta; those conserved in the ligand-bound yGCN5 bromodomain (pdb 1E6I) are shown within the shaded envelope. Dashed lines, hydrogen bonds; "w", solvent molecule.

d and e. Orthogonal views of the peptide-binding pocket. BD2 and H3 carbon atoms are in magenta and green, respectively. The view in **d** is approximately that of **a**.



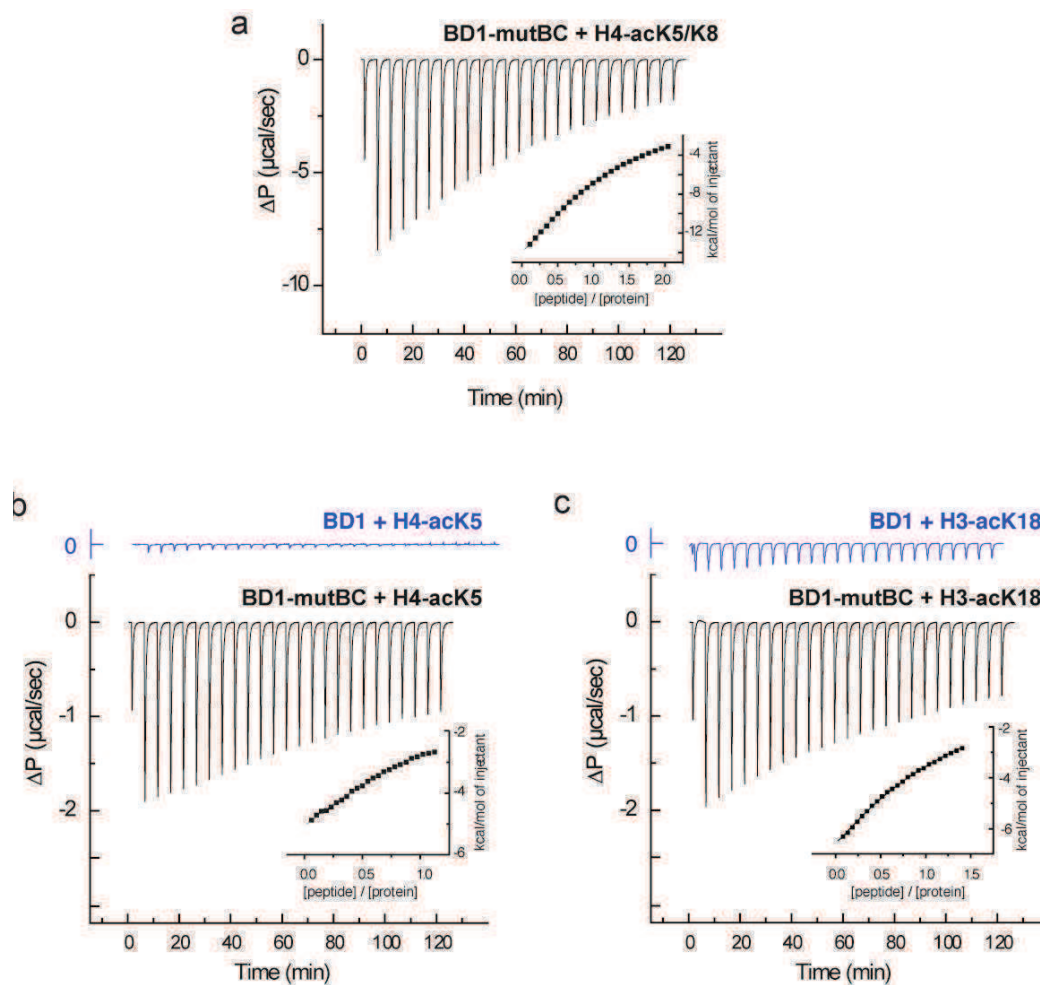
Supplementary Figure 7. Comparison of the Brdt-BD1 and -BD2 structures.

a. Sequence alignment and secondary structure. Residues altered in the mutBC mutation are highlighted in green.

b. Ribbon diagram showing an alignment of the BD1 (magenta) and BD2 (blue) structures, with their peptide ligands in green and cyan, respectively.

c. Close-up of the ligand-binding site. The BD1-bound H4-acK5/K18 (green) and BD2-bound H3-acK18 (cyan) ligands are oriented similarly but trace slightly divergent paths along the bromodomain surface, resulting in a 4 Å separation between the BD1-bound H4-acK8 and corresponding BD2-bound H3-Leu20 C α atoms. This path difference yields a steric clash between the diacetylated ligand and the BC loop of BD2 [rationalizing the low affinity of BD2 for H4(Ac)₄], and suboptimal interactions between the monoacetylated ligand and BD1 (rationalizing the low affinity of BD1 for H3-acK18). More specifically, the BD2 structure is incompatible with that of the BD1 ligand because of a steric clash (double-sided arrows) involving residues His355 and Glu356 and backbone atoms of the H4-acK5/K8 ligand; Pro352 is also implicated because it stabilizes the side chain conformation of His355. The analysis

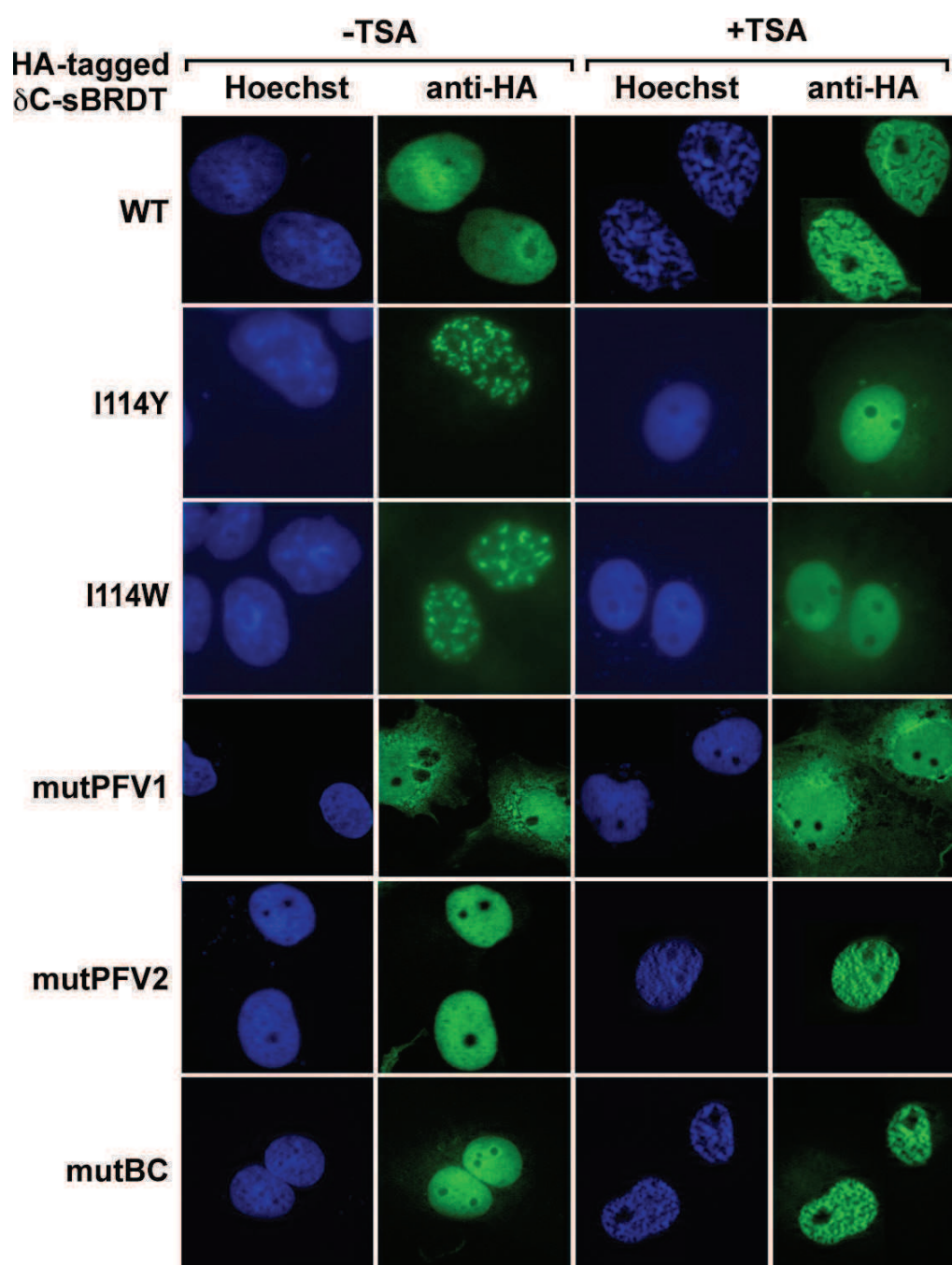
suggests that the BC loop of BD1 is an important determinant of diacetylated ligand recognition. Interactions (not shown) involving residues in the ZA loop also contribute importantly to ligand specificity, notably residues His306 and Asn307 in BD2 and Phe47 in BD1. BD1 and BD2 side chain carbon atoms are in blue and magenta, respectively. For clarity, the BD1 backbone ribbon is omitted.



Supplementary Figure 8. Ligand binding activity of BD1-mutBC.

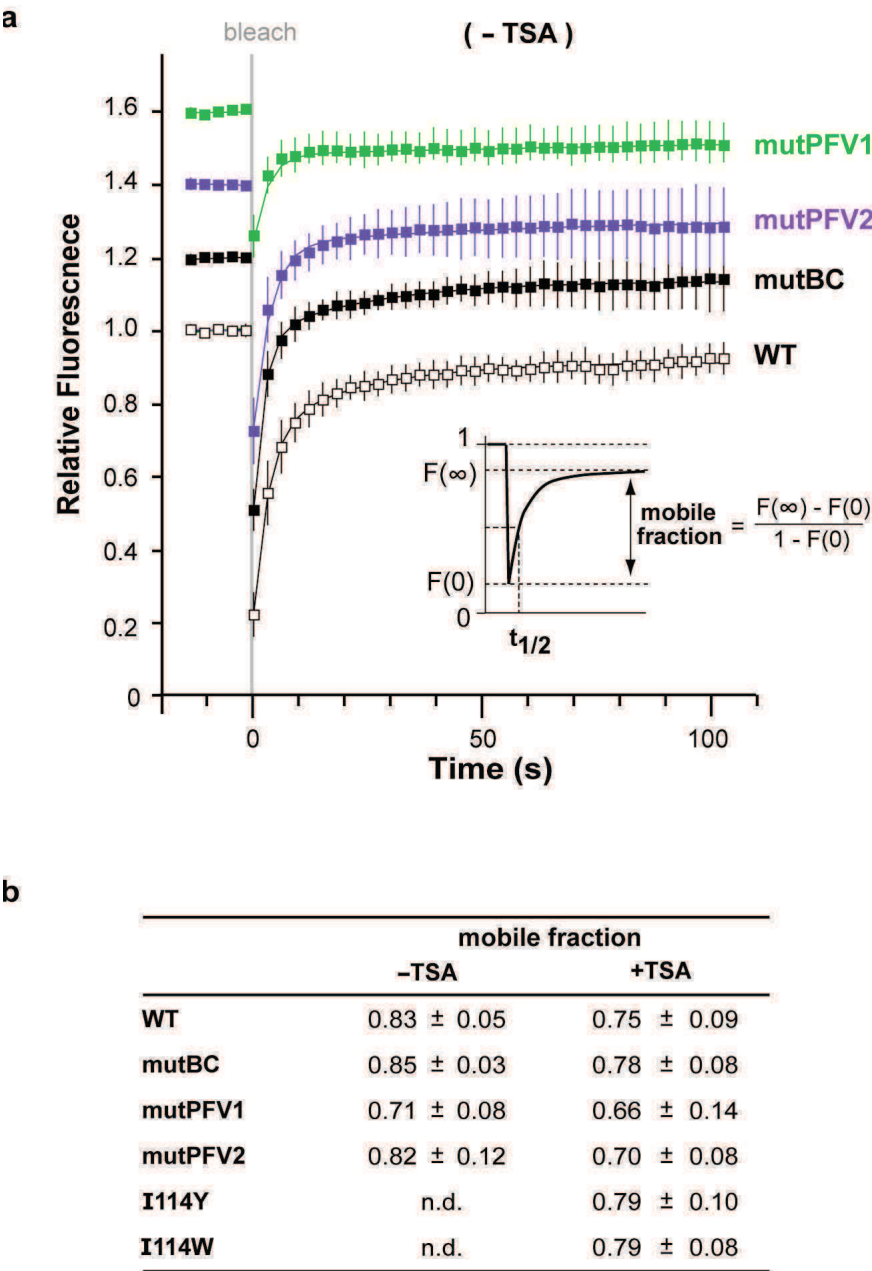
a. ITC profile showing the binding of BD1-mutBC to an H4-acK5/K8 peptide. Binding is nine times weaker compared to wildtype BD1 (see Fig. 1b).

b, c. ITC profiles showing that the mutant exhibits detectable binding to **(b)** H4-acK5 and **(c)** H3-acK18 peptides (lower traces) in contrast to the wildtype (upper traces). ITC profiles are compared on the same scale.



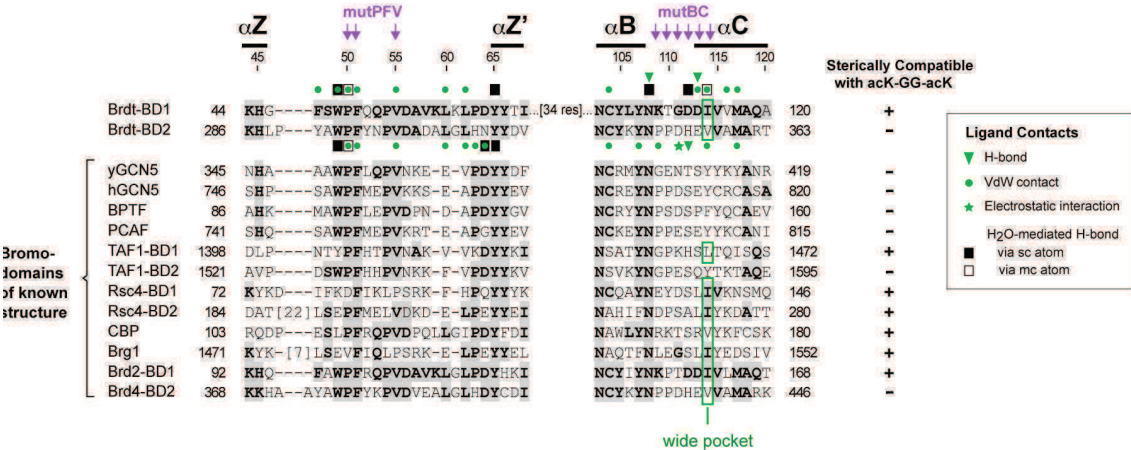
Supplementary Figure 9. Compaction of acetylated chromatin by δ C-sBrdt.

Cos7 cells were transfected with wildtype or mutated HA-tagged δ C-sBrdt, as indicated. Chromatin acetylation was induced by treating cells overnight with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA). Chromatin was visualized by Hoechst staining. In the absence of TSA, transfected cells did not show any chromatin re-organization compared to non-transfected cells (not shown). In the presence of TSA, wildtype, mutBC and PFV2 caused compaction, whereas I114Y, I114W and PFV1 did not. Curiously, in the absence (but not presence) of TSA, mutants I114Y and I114W yielded protein aggregates that did not colocalize with chromatin. The reason for this aggregation is unclear, but this phenomenon could somehow be related to compaction activity.



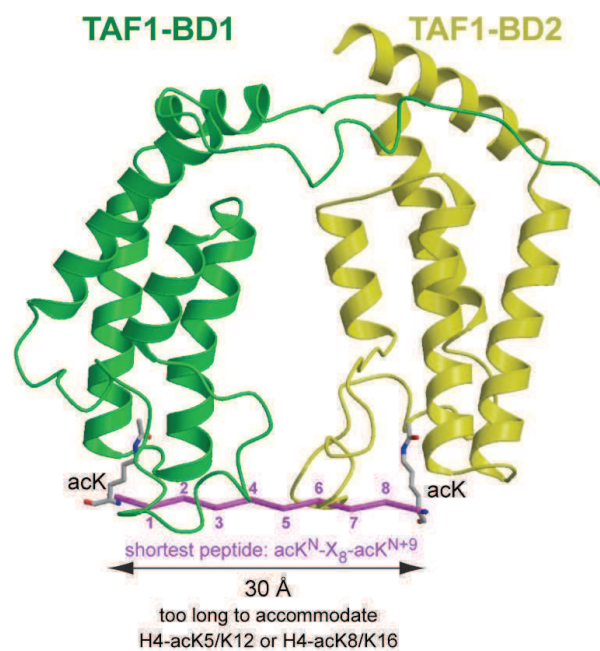
Supplementary Figure 10. FRAP assays.

- a.** FRAP curves measured in the absence of TSA. For clarity the mutBC, mutPFV2 and mutPFV1 FRAP curves are vertically offset by 0.2, 0.4 and 0.6 units, respectively.
- b.** Summary of mobile fraction values. The estimated mobile fraction varies little among the different experiments, indicating that approximately the same proportion of molecules is free to move in each case. Thus, differences in the FRAP curves observed in the presence of TSA primarily reflect different rates of mobility (as measured by $t_{1/2}$ value; Fig. 3 b, c).



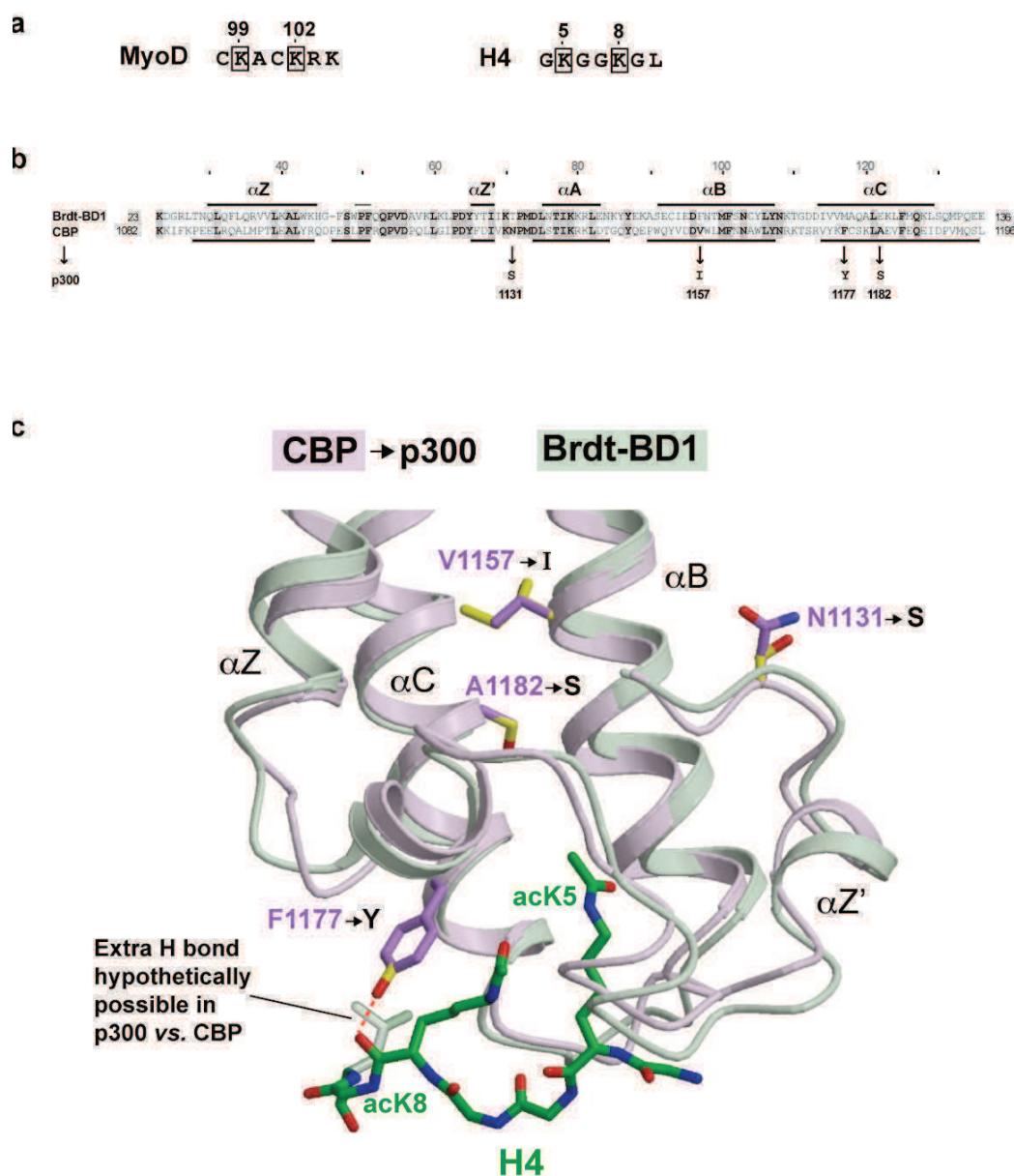
Supplementary Figure 11. Sequence alignment of ZA and BC loops.

Sequences are human except yGCN5 and Rsc4 (yeast) and Brdt (mouse). Residues identical to Brdt-BD1 are highlighted. Residues yielding a wide acK-binding pocket are boxed in green. Bromodomains exhibiting no steric clash with H4 residues acK⁵-GG-acK⁸ when superimposed on the Brdt-BD1:H4-acK5/K8 structure are indicated as sterically compatible (+). Note that a wide binding pocket does not ensure steric compatibility, and that the latter, in turn, does not ensure H4-acK5/K8 binding.



Supplementary Figure 12. Interdomain distance constraint of the TAF1 double bromodomain.

Superimposing the Brdt-BD1:H4-acK5/K8 complex onto each of the two bromodomains in TAF1 places the superimposed acK5 residues 30 Å apart (measured between C α atoms). A fully extended peptide spanning this distance would require 8 residues between the two acK residues (magenta). Because a fully extended peptide would sterically clash with TAF1 residues, Owen *et al.* have estimated that the minimal number of intervening residues is 10 (ref²). Thus, without a substantial conformational change, the two bromodomains cannot simultaneously engage the two acK residues of a histone H4 tail diacetylated on K5/K12 or K8/K16.



Supplementary Figure 13. Alignment of the Brdt-BD1 and CBP/p300 bromodomains.

a. Di-acetylated myoD and H4 peptides recognized by CBP/p300 and Brdt-BD1, respectively.

The peptides are similar in having two residues between acetylation marks (boxed).

b. Sequence alignment. Only four residues differ between the CBP and p300 bromodomains, indicated by arrows.

c. Structural alignment of Brdt-BD1 (light green) and CBP (pdb 2RNY; magenta). Of the four bromodomain residues that distinguish CBP from p300 (shown with their carbon atoms in magenta and yellow, respectively), only residue Phe1177 (Tyr1141 in p300) is in the peptide-binding site. In the structural alignment with Brdt, Tyr1141 of p300 would form an additional H-bond with the backbone carbonyl of H4-acK8. This could potentially explain why p300 specifically binds diacetylated myoD whereas CBP discriminates poorly between the mono- and di-acetylated ligands. Helix αA is omitted for clarity. The four p300 residues were modelled by homology to CBP.

Supplementary References

1. Nakamura, Y. et al. Crystal structure of the human BRD2 bromodomain: insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4. *J Biol Chem* **282**, 4193-4201 (2007).
2. Owen, D.J. et al. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J* **19**, 6141-6149 (2000).
3. Li, H. et al. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**, 91-95 (2006).
4. VanDemark, A.P. et al. Autoregulation of the rsc4 tandem bromodomain by gcn5 acetylation. *Mol Cell* **27**, 817-828 (2007).
5. Zeng, L., Zhang, Q., Gerona-Navarro, G., Moshkina, N. & Zhou, M.M. Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure* **16**, 643-652 (2008).
6. Mujtaba, S. et al. Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation. *Mol Cell* **13**, 251-263 (2004).
7. Dhalluin, C. et al. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**, 491-496 (1999).
8. Mujtaba, S. et al. Structural basis of lysine-acetylated HIV-1 Tat recognition by PCAF bromodomain. *Mol Cell* **9**, 575-586 (2002).
9. Singh, M., Popowicz, G.M., Krajewski, M. & Holak, T.A. Structural ramification for acetyl-lysine recognition by the bromodomain of human BRG1 protein, a central ATPase of the SWI/SNF remodeling complex. *Chembiochem* **8**, 1308-1316 (2007).
10. Hudson, B.P., Martinez-Yamout, M.A., Dyson, H.J. & Wright, P.E. Solution structure and acetyl-lysine binding activity of the GCN5 bromodomain. *J Mol Biol* **304**, 355-370 (2000).
11. Jacobson, R.H., Ladurner, A.G., King, D.S. & Tjian, R. Structure and function of a human TAFII250 double bromodomain module. *Science* **288**, 1422-1425 (2000).
12. Sun, H. et al. Solution structure of BRD7 bromodomain and its interaction with acetylated peptides from histone H3 and H4. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 435-441 (2007).
13. Liu, Y. et al. Structural basis and binding properties of the second bromodomain of Brd4 with acetylated histone tails. *Biochemistry* **47**, 6403-6417 (2008).
14. Zeng, L. et al. Structural insights into human KAP1 PHD finger-bromodomain and its role in gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 626-633 (2008).
15. Gerard, F.C. et al. Unphosphorylated rhabdoviridae phosphoproteins form elongated dimers in solution. *Biochemistry* **46**, 10328-10338 (2007).

3. Etude de la dynamique des MPT de H3 et H4 au cours de la gamétogenèse

- Introduction

L'acétylation de la chromatine au cours de la spermiogenèse est un phénomène conservé entre espèces. Dans cette publication, le rôle fonctionnel des modifications des histones de H3 et H4 a été caractérisé lors de la sporulation chez la levure. Pour cela, une série de substitutions des résidus modifiables de H3 et H4 a été réalisée et étudiée par nos collaborateurs. Certaines de ces modifications sont conservées au cours de l'évolution et ont ainsi pu être retrouvées au cours de la spermatogenèse murine. Bdf1, l'homologue de BRDT chez la levure, pourrait aussi avoir des fonctions similaires à BRDT lors de la vague d'acétylation au cours de la gamétogenèse.

- Principaux résultats

Certains résidus de H3 et H4 apparaissent cruciaux pour la sporulation mais pas critique pour la croissance mitotique. Nous avons ainsi identifié des modifications clés, qui marquent le processus de réorganisation de la chromatine pendant la sporulation. La phosphorylation de H3T11, nouvellement identifiée, semble être une modification clé lors de la méiose catalysée par la kinase méiotique MEK1.

D'autre part, l'acétylation de H4 sur K5, K8 et K12 permet la compaction de la chromatine chez la levure. Cette acétylation survient juste après le pic transitoire de phosphorylation de H4 sur S1 dans les étapes post-méiotiques. Cette acétylation semble essentielle pour le recrutement de BDF1 à la chromatine dans les spores matures.

Étonnamment, la présence et la succession temporelle de ces modifications de H3 et H4 sont aussi détectées lors de la spermatogenèse murine.

Mon implication personnelle a porté sur l'analyse in situ de diverses MPTs d'histones au cours de la spermatogenèse murine par immunofluorescence sur des préparations stadées de tubes séminifères, immunohistochimie sur des coupes de testicule et Western blot sur des fractions protéiques issues de cellules méiotiques et post-méiotiques. J'ai également participé à la discussion des divers résultats.

- Présentation de l'article publié

Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis

Genes and Development, publication 25 juin 2010

Jerome Govin, Jean Dorsey, Jonathan Gaucher, Sophie Rousseaux, Saadi Khochbin, & Shelley L. Berger

Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis

Jérôme Govin,¹ Jean Dorsey,¹ Jonathan Gaucher,^{2,3} Sophie Rousseaux,^{2,3} Saadi Khochbin,^{2,3} and Shelley L. Berger^{1,4,5,6}

¹Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA;

²INSERM, U823, Grenoble, Cedex 9, France; ³Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, Cedex 9, France;

⁴Department of Genetics, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA; ⁵Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, USA

Profound epigenetic differences exist between genomes derived from male and female gametes; however, the nature of these changes remains largely unknown. We undertook a systematic investigation of chromatin reorganization during gametogenesis, using the model eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* to examine sporulation, which has strong similarities with higher eukaryotic spermatogenesis. We established a mutational screen of histones H3 and H4 to uncover substitutions that reduce sporulation efficiency. We discovered two patches of residues—one on H3 and a second on H4—that are crucial for sporulation but not critical for mitotic growth, and likely comprise interactive nucleosomal surfaces. Furthermore, we identified novel histone post-translational modifications that mark the chromatin reorganization process during sporulation. First, phosphorylation of H3T11 appears to be a key modification during meiosis, and requires the meiotic-specific kinase Mek1. Second, H4 undergoes amino tail acetylation at Lys 5, Lys 8, and Lys 12, and these are synergistically important for post-meiotic chromatin compaction, occurring subsequent to the post-meiotic transient peak in phosphorylation at H4S1, and crucial for recruitment of Bdf1, a bromodomain protein, to chromatin in mature spores. Strikingly, the presence and temporal succession of the new H3 and H4 modifications are detected during mouse spermatogenesis, indicating that they are conserved through evolution. Thus, our results show that investigation of gametogenesis in yeast provides novel insights into chromatin dynamics, which are potentially relevant to epigenetic modulation of the mammalian process.

[Keywords: Histone; acetylation; phosphorylation; sporulation; gametogenesis]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received January 2, 2010; revised version accepted June 25, 2010.

More than two decades ago, now classic experiments demonstrated the nonequivalence of DNA derived from male and female gametes (McGrath and Solter 1984; Surani et al. 1984). Indeed, microinjection of nuclei derived from two gametes produced by the same sex, either both male or both female, leads to early embryonic death (McGrath and Solter 1984; Surani et al. 1984). Thus, fertilized eggs must contain two haploid genomes originating from a paternal and a maternal gamete in order to proceed through embryonic development. Because all females are born from union of a male and a female gamete, which share the same chromosome composition, it must be the nongenetic content of the male and female gametes that is required for normal development.

Epigenetic features, and specifically chromatin, are likely to be the crucial inherited nongenetic property of the male and female gametes. Twenty-five years after these pivotal observations, the epigenetic organization of gametes is only starting to be unraveled. The chromatin structure of oocytes remains obscure, beyond initial observations of hypoacetylation of histones H3 and H4 during meiosis (Kim et al. 2003). However, epigenetic changes in the male gamete have been more amenable to analysis. Following meiotic divisions and DNA recombination, dramatic chromatin remodeling occurs during maturation of spermatids, and is associated with extensive chromatin restructuring and compaction. In many species, the majority of histones are removed and replaced by a new group of chromatin-associated proteins, called protamines (Govin et al. 2004; Kimmins and Sassone-Corsi 2005; Gaucher et al. 2009). Protamines are specialized chromatin proteins only 50 amino acids long, highly

⁶Corresponding author.

E-MAIL bergers@upenn.edu; FAX (215) 746-8791.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1954910>.

basic, and exclusively detected in male gametes, where they compact >90% of the DNA (Balhorn 1982). They are critical, as mice bearing even a heterozygous protamine gene deletion are sterile, preventing transmission of the wild-type allele (Cho et al. 2001).

A recent study has provided new insights into the chromatin organization of male gametes (Hammoud et al. 2009), showing that the remaining histones in human sperm are not distributed randomly, but rather are associated with master regulators of early embryonic development, such as HOX genes, in a manner that potentially influences the developmental process. Moreover, epigenetic marks, such as the DNA and histone methylation patterns, have a specific distribution, which may also be linked to early embryonic development. Thus, the male gamete has a unique chromatin structure, likely related to its function after fertilization.

There are a number of additional alterations to chromatin in the mammalian male gamete. For example, several testis-specific histones are incorporated into chromatin at different stages of maturation (Martianov et al. 2005; Tanaka et al. 2005; Govin et al. 2007). Histone modifications are also involved in chromatin reorganization, such as histone hyperacetylation as spermatids start to elongate (Hazzouri et al. 2000). A testis-specific bromodomain protein, Brdt, binds to hyperacetylated histones and compacts the chromatin (Pivot-Pajot et al. 2003; Moriniere et al. 2009). However, it remains unknown how most histones are removed from the genome, and how certain specific regions, such as the HOX genes, are protected against histone loss and protamine deposition. Moreover, the role of post-translational modifications during the steps of this dramatic process of chromatin restructuring have not yet been addressed in a systematic analysis.

Lower eukaryotes undergo a differentiation pathway that is similar to higher eukaryotic spermatogenesis. Upon nutrient starvation, diploid yeast sporulate to generate gametes. The first step consists of meiosis, which ensures mixing of inherited genetic information. Haploid cells then differentiate into mature spores, which develop a thick spore wall providing protection from harsh environmental conditions, such as exposure to chemicals and dehydration. Similar to higher eukaryotic sperm, spore nuclei are reorganized and compacted. This spore differentiation pathway is dependent on coordination of an intricate network of events, including a transcriptional program involving >1000 genes, and other genome-wide chromatin events. Histone modifications have a role at several steps: H3 phosphorylation on Ser 10 is detected during meiosis and then disappears, followed by H4 phosphorylation on Ser 1. This latter mark helps in chromatin compaction, and is conserved through evolution, as it is also found during post-meiotic spermatogenesis (Krishnamoorthy et al. 2006). Beyond these observations, however, little is known about the chromatin transactions that occur during this process.

Our interest is to broadly assess the role of chromatin changes during gametogenesis. We took an unbiased approach, using systematic substitution mutagenesis of histones H3 and H4 in the yeast *Saccharomyces cerevi-*

siae, since technical limitations associated with gamete differentiation in higher eukaryotic organisms restrict such screening. Our analysis uncovered several novel and apparently distinct chromatin pathways involved in sporulation, and, strikingly, we find that aspects of these pathways are evolutionarily conserved during mammalian spermatogenesis.

Results

Creation of a new histone library in a yeast strain background able to synchronously and efficiently sporulate

Systematic substitution mutagenesis of histones H3 and H4 in *S. cerevisiae* has been used recently to examine effects on vegetative growth (Dai et al. 2008; Nakanishi et al. 2008). However, the strain backgrounds used for these mutant collections are not optimal for a sporulation screen. For example, the yeast genetic background strains s288c and W303 sporulate with poor efficiencies: Less than 50% of the initial vegetative cells form tetrads of spores, the cells require up to 5–6 d to reach sporulation, and individual cells proceed nonsynchronously through the process. In contrast, the genetic background SK1 is typically used for sporulation studies because the cells proceed synchronously and nearly completely, and sporulate within 24–48 h.

Therefore, we created a “histone shuffle strain” in the SK1 background by deleting both genomic genes encoding the H3 and H4 genes (*HHT1*, *HHT2*, *HHF1*, and *HHF2*), and providing the histone genes on a plasmid containing a URA3 selectable marker (Supplemental Fig. S1A). The H3 and H4 substitution mutations on a second marked plasmid were transformed, and the original wild-type plasmid was evicted (by negative selection of URA3 on 5-FOA), which ensures that the entire H3 and H4 population is expressed from the new plasmid. Examination of the new strain shows that endogenous H3 and H4 genes are absent, and can be replaced by Flag-tagged versions of either of the histones (Fig. 1A). Importantly, the doubling time (Supplemental Fig. S1B) and sporulation efficiency (Supplemental Fig. S1C) of the shuffle strain are comparable with a wild-type strain.

Next, in the new SK1 histone shuffle background, we created a collection of strains containing alanine substitution mutations at modifiable Ser, Thr, Lys, and Arg residues, using plasmids that were screened previously during vegetative growth (Nakanishi et al. 2008). Plasmids within the strain collection were recovered and sequenced to confirm the mutations. Prior to induction of sporulation, the mutants were grown in “rich” media—YPD (glucose) and then YPA (acetate) (Fig. 1B)—to eliminate any mutants showing growth defects, since these would suggest a general loss of histone function, such as histone loading or folding into the nucleosome. Indeed, in agreement with previous analyses (Dai et al. 2008; Nakanishi et al. 2008), ~5% of the substitutions resulted in lethality (Fig. 1C). Since histones H3 and H4 are highly conserved through evolution (Supplemental Fig. S2A–C),

Govin et al.

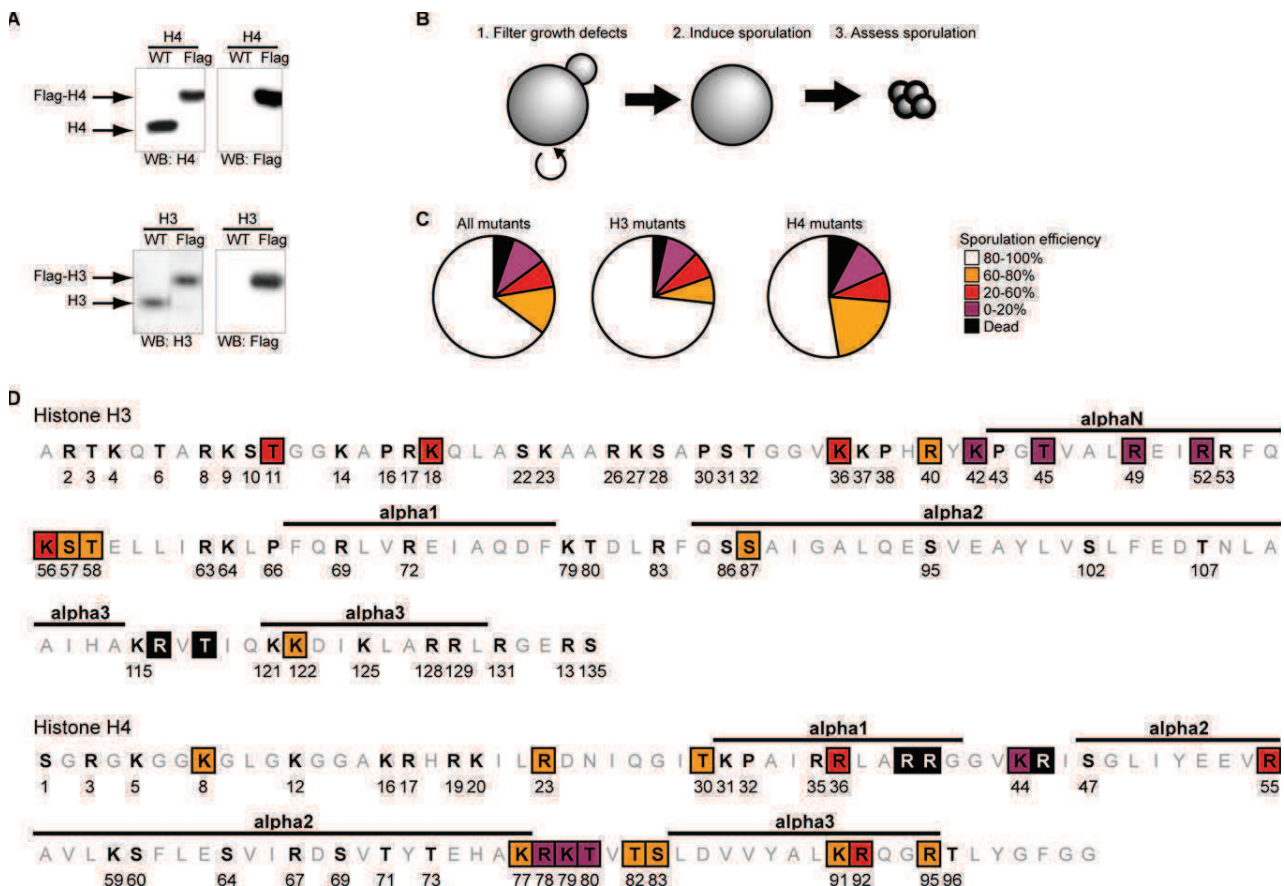


Figure 1. A systematic screen identifies H3 and H4 residues essential for sporulation completion. (A) Creation and validation of a histone shuffle strain in the SK1 background. The strain was validated by replacing a wild-type (WT) plasmid with a plasmid expressing Flag-tagged H3 or H4. Detection of H3 and H4 by Western blot confirms that neither genomic copy of the H3 and H4 genes remains, and that the entire population of H3 and H4 is expressed from the plasmid. (B) Schematic of the rationale used for the screen. More than 100 substitution mutants have been created and validated by sequencing. Several substitution mutations were lethal, and were not analyzed further. Sporulation was induced and spore formation was quantified in all other mutants. (C) Statistical analysis of the screen results. The severity of the sporulation defects is described using the following color code: a sporulation efficiency included within 0%–20%, 20%–60%, 60%–80%, and 80%–100% is represented in purple, red, orange, and white, respectively. Lethal mutations are represented in black. This same color-coding is used throughout the figures. (D) Graphic representation of the substitution mutants affected in sporulation. The histone fold is represented at the top of each histone, and is based on data from White et al. (2001).

this low lethality suggests that the integrity of each amino acid is, in general, not crucial for nucleosome function in optimal growth conditions.

Identification of two patches of substitution mutations affecting sporulation

The sporulation phenotype of each mutant was analyzed. Approximately 30% of the substitution mutants displayed lowered sporulation efficiency (Fig. 1C): Ten percent of them were severely reduced (0%–20% of wild type) (Fig. 1C, in purple), while the remainder of the substitutions were lowered to a lesser degree (20%–60% of wild type [Fig. 1C, in red]; 60%–80% of wild type [Fig. 1C, in orange]). Thus, although most individual substitution mutations in H3 and H4 are well tolerated in rich media, the integrity of numerous residues within each histone are important for spore differentiation.

The substitution mutants that are defective are localized largely in spatially accessible regions within the nucleosome (Figs. 1D, 2). That is, many are excluded from the α -helices of the globular domains, and are instead concentrated in the N-terminal and C-terminal tails, and in the loops between helices.

We found two distinct patches localized within H3 and H4 that are particularly sensitive to substitution. One patch involves a stretch of seven residues on H4 (K77–S83) (Figs. 1D, 3B), three of which are nearly blocked in spore formation (Fig. 3A), and therefore we named this patch LOS (low sporulation). The LOS patch is located on loop 2 of H4, between α -helices 2 and 3, and includes almost all residues within the loop (Figs. 1D, 2, 3B). This is especially clear when the region is enlarged (Fig. 3C), showing that the patch is localized on the edge of the nucleosome, in close proximity to contacts with DNA, as the double helix wraps around the nucleosome.

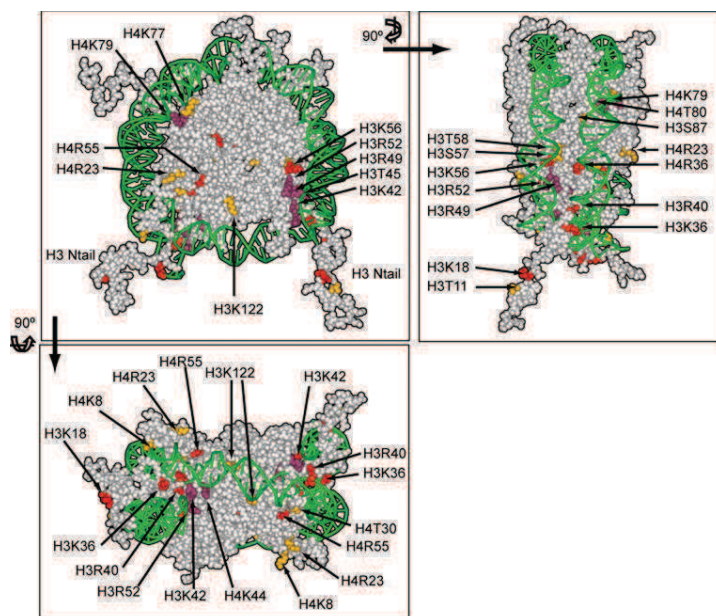


Figure 2. Representation of the nucleosome, highlighting the residues essential for completion of sporulation. The same color-coding is used as in Figure 1. Front and two different lateral views are presented. PDB file 1KX5 was used (Davey et al. 2002), and was color-coded using Accelrys Discovery Studio Visualizer 2.5.

The phenotypes of the LOS mutants were characterized more precisely. The sporulation repressor Rme1 is not derepressed by LOS mutations (data not shown), which likely excludes a general defect in silencing genes that repress sporulation. Induction of the sporulation master regulators Ime2 and Ime4 was variable in the mutants, but remained in the range of 50%–100% of their levels in wild-type cells (Supplemental Fig. S3A). In addition, DNA replication was similar to wild-type cells, as assessed by flow cytometry carried out on cells stained with propidium iodide (data not shown). Therefore, LOS mutations do not dramatically affect the induction of sporulation, or the replication of the DNA. However, using DAPI staining of DNA, we did not observe four normal meiotic products (data not shown), which suggests that LOS mutants may be defective in the meiotic process itself.

The LOS patch shares residues with a previously described patch called LRS (loss of rDNA silencing) (Park et al. 2002). However, the LRS mutants encompass residues located on both H3 and H4, and occupy a large patch (Fig. 3A,B [green arrows], C [dark green]), whereas only H4 mutants located in this region have defects in sporulation, and occupy a more restricted surface area (Fig. 3A,B [purple and orange], C [purple and orange]). It has been demonstrated recently that H3 LRS mutations disrupt recruitment of Sir3 to this nucleosomal interface, leading to silencing defects (Hyland et al. 2005; Norris et al. 2008). The H3 LRS mutants that lose Sir3 binding do not have a defect in sporulation in our study. Hence, we conclude that the new LOS patch is independent of the LRS phenotype, and LOS may define a new interface required for sporulation, whose function is unrelated to Sir3 recruitment.

A second patch required for sporulation occurs on the α -helix in the N terminus of H3, encompassing residues K42–T58 (Figs. 1D, 3E) in the region DNA enters and exits

the nucleosome (Figs. 2, 3F), and therefore we named this patch DEE (DNA entry/exit). Substitutions in residues in one region within this patch (T42–R52) cause severe reduction of sporulation, while residues in a second region (K56–T58) are less defective (Fig. 3D,E). The sporulation repressor Rme1 remained repressed (data not shown), and the induction of master regulators Ime2 and Ime4 remained similar to wild type (Supplemental Fig. S3B; data not shown). Therefore, DEE mutants do not prevent general induction of sporulation. The patch includes many residues involved in histone interaction with DNA (Figs. 2, 3), and it is thus unclear why some of these mutants are fully competent for mitotic growth, but nearly fail to form spores.

The DEE patch includes H3K56, an acetylated residue involved in nucleosome assembly during replication and DNA repair. Indeed, as shown previously (Recht et al. 2006), we detect a transient peak in H3K56ac during meiosis, with similar timing to H3S10ph (Fig. 4A,B), which also increases at that time (Wei et al. 1998; Krishnamoorthy et al. 2006). We tested several substitutions, and found that K56A and K56R both lowered sporulation efficiency, while K56Q, which mimics the neutralization of charge caused by acetylation, is closer to wild type in sporulation efficiency (Fig. 4C). This is in contrast to DNA damage conditions, where a K56Q strain is defective similarly to K56R (Schneider et al. 2006; Driscoll et al. 2007; Han et al. 2007), and thus there may be a distinct role for K56 acetylation within the entire DEE patch during sporulation.

Analysis of modifications of H3 during gametogenesis

Histone tails are modified during all major cellular processes. Surprisingly, despite an abundant literature describing the occurrence of many modifications, our data show that substitution of 70% of the known modified

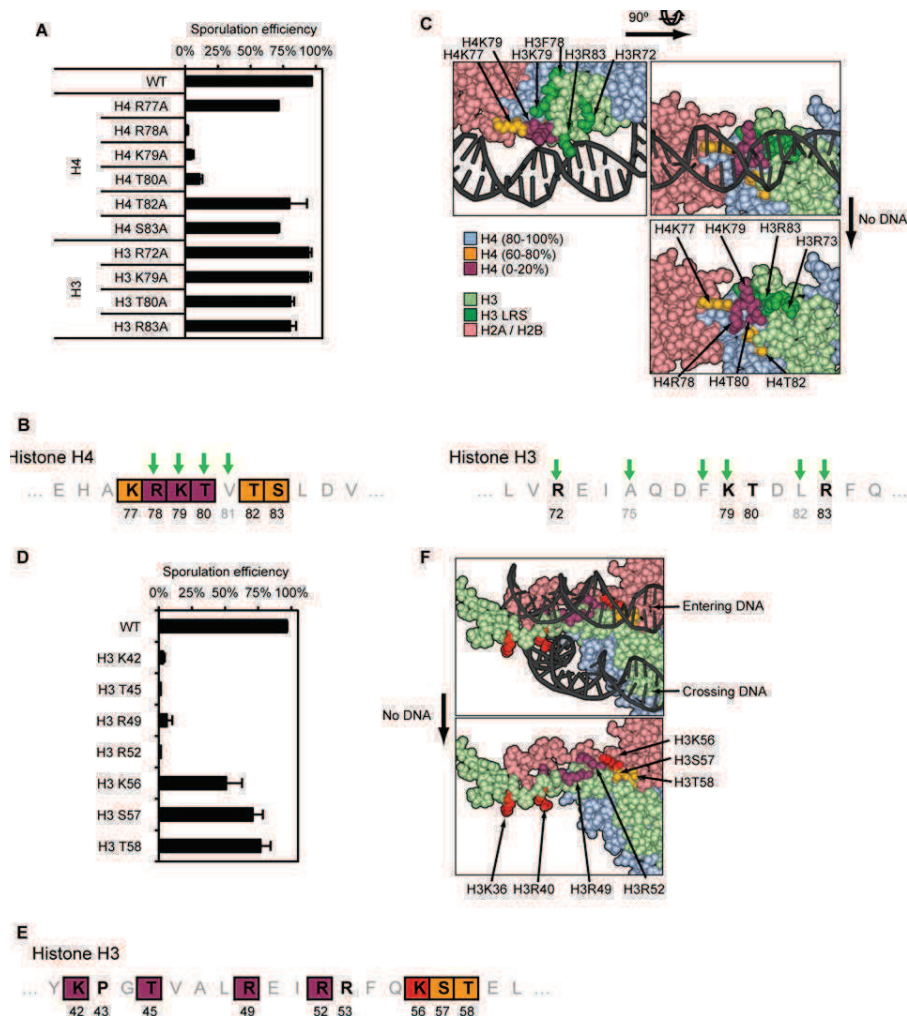


Figure 3. Detailed analysis of the LOS and DEE patches. (A) Sporulation efficiency data for the LOS substitution mutants. (B) Graphical representation of the LOS (H4) and the H3 LRS regions. Green arrows represent identified LRS mutations (Park et al. 2002). (C) Three-dimensional representation of the LOS patch. The severity of the sporulation phenotype for each substitution is represented following the same color-coding as in Figure 1C. The H3 LRS mutants are represented in dark green. H2A/H2B, H3, and H4 are represented in light pink, light green, and light blue, respectively. (D) Sporulation efficiency data for DEE mutants. (E) Graphical representation of the DEE patch. (F) Three-dimensional representation of the DEE patch. Refer to C and Figure 1C for details on the color-coding.

residues does not show defects during either vegetative growth in rich media or sporulation (Fig. 5; Dai et al. 2008; Nakanishi et al. 2008). For example, H3K4me3 is a key modification that occurs over start sites of transcription during induction (for review, see Berger 2007). In spite of its ubiquity, we detected no loss of vegetative growth or sporulation (Fig. 5) in an H3K4A strain lacking K4 methylation, and, furthermore, the level of H3K4me3 was unchanged during a sporulation time course (Fig. 4A). Thus, the absence of many individual modifications on the H3 and H4 tail does not appear to severely affect chromatin function during most of the yeast life cell cycle.

However, substitution of certain residues within the N-terminal tails does lower sporulation efficiency (Fig. 5), and we carried out further analysis of some of these sites. H3K18A and H3K36A mutations decrease sporulation

efficiency to 30% and 60%, respectively (Fig. 5A,C). This may be due to absence of H3K18ac or H3K36me; however, no clear changes were detected in the global levels of the K18ac or K36me modifications over the sporulation time course (data not shown). Moreover, a mutation of H3K18 does not significantly affect the expression of the master regulators Ime2 and Ime4 (Supplemental Fig. S3C).

Within the H3 and H4 tails, we found that H3T11A substitution had a significant effect, reducing sporulation efficiency (Fig. 5A). We tested multiple isolates of this substitution, and found that the level was ~65% of wild type (Fig. 6A). It is striking that H3S10A substitution did not reduce sporulation efficiency, and that the introduction of the double substitution (H3S10A H3T11A) did not grow more poorly than the single H3T11A substitution, suggesting that H3S10ph is not a key modification during

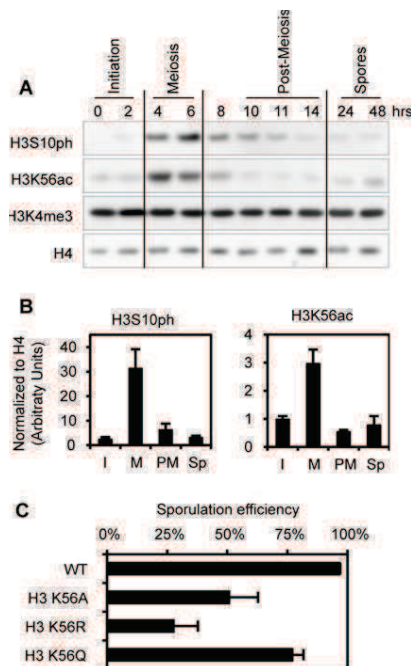


Figure 4. Dynamics of meiosis-specific histone modifications during sporulation. (A) H3S10ph and H3K56ac were detected by Western blot during sporulation. (B) Quantification of the Western blots, including images presented in A. The time course has been broken into stages, as indicated in A. (I) Initiation; (M) meiosis; (PM) post-meiosis; (Sp) spores. Quantification was performed using two to three biological independent replicates (depending on the time points). (C) Sporulation efficiency data for different H3K56 mutants. H3K56R mimics the unmodified form of H3K56, while H3K56Q mimics the acetylated form of H3K56.

sporulation. We determined that H3T11 is phosphorylated during sporulation, and, as expected, the signal is eliminated in the H3T11A strain (Fig. 6B; Supplemental Fig. S4). A H3T11D strain, as a potential mimic of phosphorylation, behaved more similarly to wild type (Fig. 6A).

The H3T11ph modification specifically increased during meiosis, with similar timing as H3S10ph and prior to post-meiotic H4S1ph, as we observed previously (Fig. 6B,C; Krishnamoorthy et al. 2006). Immunofluorescence experiments confirm this pattern, and also show a homogeneous distribution for H3S10ph and H3T11ph during meiosis (Fig. 6D).

The H3T11A substitution mutation slightly lowered both H3S10ph and H4S1ph, but quantification indicated that the decrease in H3S10ph and H4S1ph signal is commensurate with the reduction in sporulation observed in a H3T11A mutant (Supplemental Fig. S5; data not shown), indicating that these phosphorylation events are independent. Taken together, it appears that phosphorylation of H3T11 has a more important role during meiosis than phosphorylation of H3S10.

We investigated the kinase that is required for H3T11ph. Our analysis of published data identified three kinases whose transcription is specifically induced during meiosis (Fig. 6E,G,I). The first is Ipl1, the ortholog of Aurora kinase,

which phosphorylates H3S10ph during meiosis (Hsu et al. 2000). *IPL1* is an essential gene, and cannot be deleted. Thus, we used a strain in which *IPL1* is expressed under the control of the *CLB2* promoter, which is active during vegetative growth, but is rapidly repressed upon induction of sporulation (Monje-Casas et al. 2007). This allowed analysis of the abundance of H3S10ph and H3T11ph during meiosis in the absence of Ipl1. We found reduced H3S10ph, but no effect on H3T11ph (Fig. 6F), confirming that Ipl1 is responsible for H3S10ph deposition during meiosis, but excluding a role in H3T11 phosphorylation. The second potential kinase is yChk1, the ortholog of mammalian Chk1, which phosphorylates H3T11ph in mammalian cells and regulates gene activation during DNA damage-induced transcriptional repression (Shimada et al. 2008). *CHK1* is not essential, and its deletion did not decrease either H3S10ph or H3T11ph (Fig. 6H). The third potential kinase is Mek1, and, strikingly, we found that deletion of *MEK1* completely abolished H3T11ph, but had little effect on H3S10ph (Fig. 6J). These data implicate the meiotic Mek1 kinase specifically in phosphorylation of H3T11. It is interesting that H3S10 and H3T11 are adjacent residues and are both involved in meiosis, but are phosphorylated by distinct kinases.

Mek1 promotes interchromosomal recombination, and its kinase activity is required for the formation of viable spores, as *mek1Δ* spores do not germinate (Fig. 6K; Rockmill and Roeder 1991; Wan et al. 2004). We tested the viability of H3T11A mutant spores. The wild-type shuffle strain (H3 WT) germinates efficiently (>80%) (Fig. 6K); however, only 50% of H3T11A spores were able to germinate (Fig. 6K). These results suggest that the H3T11A substitution partially phenocopies the deletion of *mek1*, and that H3T11 phosphorylation is required for the maturation of fully functional spores. We found that the H3T11A spores are not affected in chromatin compaction (see below; Supplemental Fig. S5A), further suggesting that their lowered viability stems from a defect during meiosis.

H3S10 phosphorylation occurs during both yeast sporulation and mammalian gametogenesis (Wei et al. 1998; Krishnamoorthy et al. 2006). We therefore investigated whether H3T11ph similarly occurs during spermatogenesis. By immunodetection of mouse germ cells from staged tubules (Fig. 6L) and on paraffin testis sections (Fig. 6M), we found that H3S10ph and H3T11ph both occur during meiosis, and that both strongly mark condensed meiotic chromosomes of spermatocytes from stage XI and XII tubules (Fig. 6M, see arrows).

Analysis of modifications of H4 during gametogenesis

We also found, among H4 tail substitutions, a modest effect of K8A on sporulation efficiency (Fig. 5B). There is redundancy between K5, K8, and K12 acetylation during vegetative growth, in regulation of transcription and DNA repair, among other processes (Dion et al. 2005). We examined whether these H4 acetylations increase during sporulation, and found that all three (K5ac, K8ac, and K12ac) increase late in the process, after meiotic and

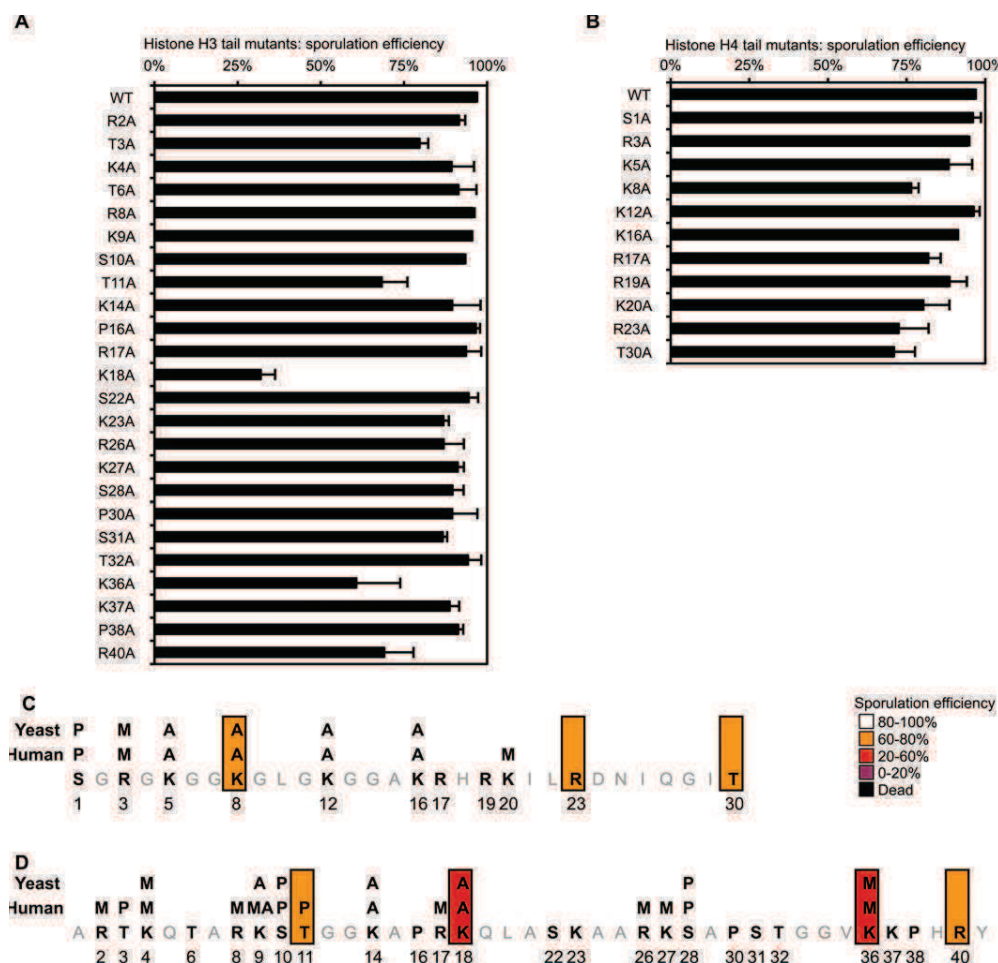


Figure 5. Analysis of mutants located in the N-terminal tails of H3 and H4. (A,B) Detailed sporulation efficiency data for histones H3 and H4. (C,D) Graphical representation of the residues essential for sporulation completion (same color-coding as in Fig. 1).

post-meiotic phosphorylation events on the H3 and H4 tails, as described above (Fig. 7A). For example, H4K5ac, H4K8ac, and H4K12ac all begin to increase at ~14 h, after H4S1ph has peaked and begun to decline (Fig. 7A,B). The acetylations then remain at this elevated level—even at the end of the process, when the spore reprogramming is complete (Fig. 7A,B). It is notable that H4K16ac, which has a distinct role in chromatin (Shogren-Knaak et al. 2006), did not change significantly over the time course (Fig. 7A,B).

Since K5ac, K8ac, and K12ac displayed similar kinetics during late sporulation, we tested whether these modifications work synergistically, via simultaneous substitution of the three residues to arginine. The triple H4K5/8/12R substitution mutant displayed <50% sporulation efficiency compared with wild-type H4 (Fig. 7C). Furthermore, the rise in acetylation on H4 follows the transient rise of post-meiotic H4S1ph (Fig. 7A), which is involved in chromatin compaction (Krishnamoorthy et al. 2006). Thus, we investigated whether elimination of the acetylation in the H4K5/8/12R strain altered compaction, using DAPI staining of DNA to measure nuclear size.

We examined a large number of spore nuclei (>200), and, as a control, confirmed that H4S1A substitution leads to a significant increase in median nuclear size, from $0.6 \mu\text{m}^2$ to $0.73 \mu\text{m}^2$ ($P < 10^{-4}$) (Fig. 7D,E; Krishnamoorthy et al. 2006). Using the same approach, we found that the H4K5/8/12R triple substitution correlates with an even larger median nuclear size, to $0.8 \mu\text{m}^2$ (t -test, $P < 10^{-11}$) (Fig. 7D; Supplemental Fig. 5). Thus, H4 modifications that increase following the end of meiosis appear to be involved in nuclear compaction.

We investigated whether H4 modifications are important for spore viability during germination. We found that H4S1A spores are viable, but spores expressing the H4K5/8/12R substitution mutant are nearly completely inviable (Fig. 7E). This suggests that H4 acetylation has an important function in the compaction of the chromatin in spores, and subsequently plays a key role during germination.

We showed previously that H4S1ph is conserved in mammalian spermatogenesis, and in fact persists later in the process relative to H3S10ph (Krishnamoorthy et al. 2006), similar to our findings during sporulation. This led us to investigate how these marks, and H4ac, behave

Histone marks during gametogenesis

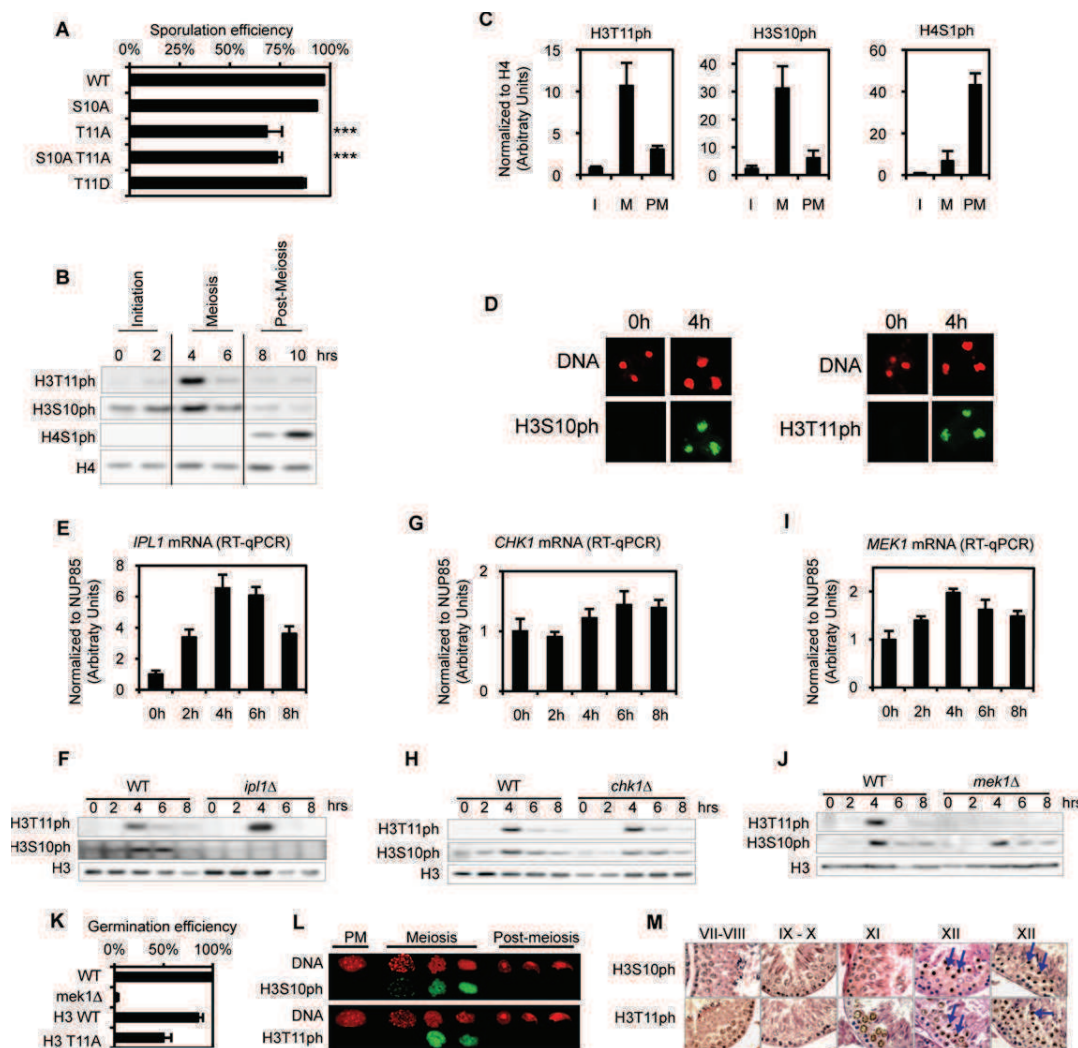


Figure 6. H3T11ph is a new meiotic mark in yeast and mammals. (A) Sporulation efficiency data for selected mutants. *P*-values are 10^{-7} and 10^{-3} for H3T11A and H3S10AT11A mutants, respectively (asterisks). (B) Detection of H3T11ph during sporulation by Western blot. (C) Quantification of the Western blots, including images presented in B. The time course has been broken into stages, as indicated in B. (I) Initiation; (M) meiosis; (PM) post-meiosis. Quantification was performed using two to three biological independent replicates (depending on the time points). (D) In situ detection of H3S10ph and H3T11ph by immunofluorescence during sporulation. (E,G,I) Quantifications of mRNA abundance of *IPL1*, *CHK1*, and *MEK1*, respectively. Data were obtained from four independent biological replicates, and normalized to NUP85 (see the Materials and Methods). (F) *Ipl1* is essential for H3S10ph deposition. Depletion of *Ipl1* during meiosis (using a conditional strain; see the text for details) leads to a loss of H3S10ph, but does not affect H3T11ph. Western blot analysis using indicated antibodies. (H) *Chk1* is not required for H3S10ph or H3T11ph deposition. Western analysis of the histone modifications in a *chk1Δ* strain compared with the wild-type strain. (J) *Mek1* is essential for H3T11ph deposition. Western analysis of the histone modifications in a *mek1Δ* strain compared with the wild-type strain. (K) Germination efficiency. Spores were dissected and then germinated on YPD plates. More than 50 spores were analyzed using two independent isolates of each strain. (L) Analyses of H3S10ph and H3T11ph during mouse spermatogenesis using immunofluorescence. (M) Immunohistochemistry using H3S10ph and H3T11ph antibodies during mouse spermatogenesis.

during spermatogenesis in the mouse. As published previously, we found, using both Western and immunofluorescence of staged sperm, that H4K5/8/12ac increases in later stages of round spermatids (Fig. 7F,G; Hazzouri et al. 2000). We then compared the hyperacetylation to the kinetics of H4S1ph, and found that the dramatic increase in acetylation occurs only following the decline of H4S1ph in early stages of round spermatids (Fig. 7E,G). It is striking

that these modifications have a similar relative temporal relationship during sporulation and mammalian spermatogenesis, suggesting that histone H4 phosphorylation and acetylation dynamics during the final differentiation stages to generate mature gametes has been conserved through evolution.

The bromodomain-containing protein Brdt has been shown to compact hyperacetylated chromatin (Pivot-Pajot

Govin et al.

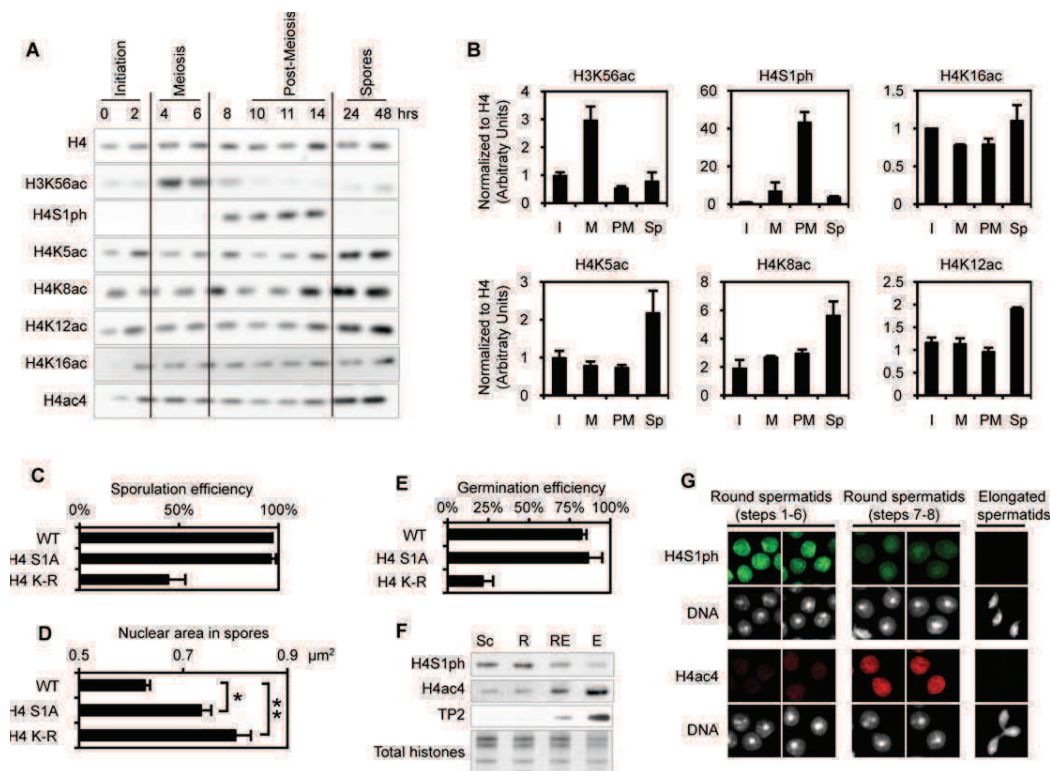


Figure 7. Dynamics of H4 modifications during post-meiotic maturation of the gamete. (A) The phosphorylation and acetylation status of H4 during sporulation analyzed by Western blot. The H3K56ac and H4S1ph pattern confirms that the cells are sporulating synchronously. (B) Quantification of the Western blots, including images presented in A. Quantification was performed using two to three biological independent replicates (depending on the time points). (C) Sporulation efficiency data for H4S1A and H4K5/8/12R mutants. (D) Average nuclear size of fully mature spores of wild-type (WT), H4S1A, and H4K5/8/12R strains. The increase in size is statistically significant for both mutants: P -values are 10^{-4} and 10^{-11} for H4S1A and H4K-R mutants, respectively (asterisks). (E) Germination efficiency. Spores were dissected and then germinated on YPD plates. More than 80 spores were analyzed using two independent isolates of each strain. (F) Phosphorylation and acetylation status of H4 during mouse spermatogenesis, analyzed by Western blot. H4S1ph is detected during post-meiosis and disappears, while H4 is hyperacetylated during spermatid elongation. (G) The phosphorylation and acetylation status of H4 during mouse spermatogenesis, analyzed by immunofluorescence on staged cells. The results confirm the data presented in E.

et al. 2003). The orthologous proteins yBdf1 and yBdf2 also bind to acetylated H4 (Ladurner et al. 2003), and we investigated whether they may have a similar function during spore maturation. First, we analyzed their relative expression levels during sporulation, by RT-qPCR. *IME2* (early sporulation, at 4 h) and *DIT2* (mid-sporulation, at 10 h) transcript levels demonstrate that the cells are synchronous (Fig. 8A). *BDF1* and *BDF2* mRNA were both induced during meiosis (4 h after induction of sporulation). However, only *BDF1* mRNA was maintained at a higher level during the remainder of the differentiation program and in fully mature spores, until germination is induced and the spores return to vegetative growth (see below; Fig. 8A,H).

Next, the level of Bdf1 was analyzed by Western blot (Chua and Roeder 1995). The specificity of the Bdf1 antibody was tested by ourselves and others (Chua and Roeder 1995; Ladurner et al. 2003): First, we found that the signal was eliminated in a *bdf1Δ* strain (Chua and Roeder 1995; Ladurner et al. 2003), and second, in a Bdf1-Flag epitope-

tagged strain, both a Flag antibody and the Bdf1 antibody immunoprecipitated the slightly larger Bdf1-Flag (Supplemental Fig. S7A). We then found, using Western blot experiments, that Bdf1 is highly expressed in fully mature spores, concurrent with the hyperacetylation of H4 (Fig. 8B; Supplemental Fig. S7B). This pattern was confirmed using the Flag-Bdf1 strain (data not shown). This increase in Bdf1 levels during late sporulation suggests that Bdf1 mediates the final compaction of the spore nuclei, similarly to the putative function of Brdt in spermatogenesis (Govin et al. 2004; Moriniere et al. 2009). It remains unclear why *BDF1* mRNA is induced during meiosis at 4 h of sporulation, whereas a dramatic increase of Bdf1 protein is observed only at the 14-h mark in the process.

The role of Bdf1 during chromatin compaction in fully mature spores could not be assessed in a *bdf1Δ* strain, because the deletion strain does not complete the sporulation program and does not form tetrads (Chua and Roeder 1995; our data). Nevertheless, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments strongly suggest an

Histone marks during gametogenesis

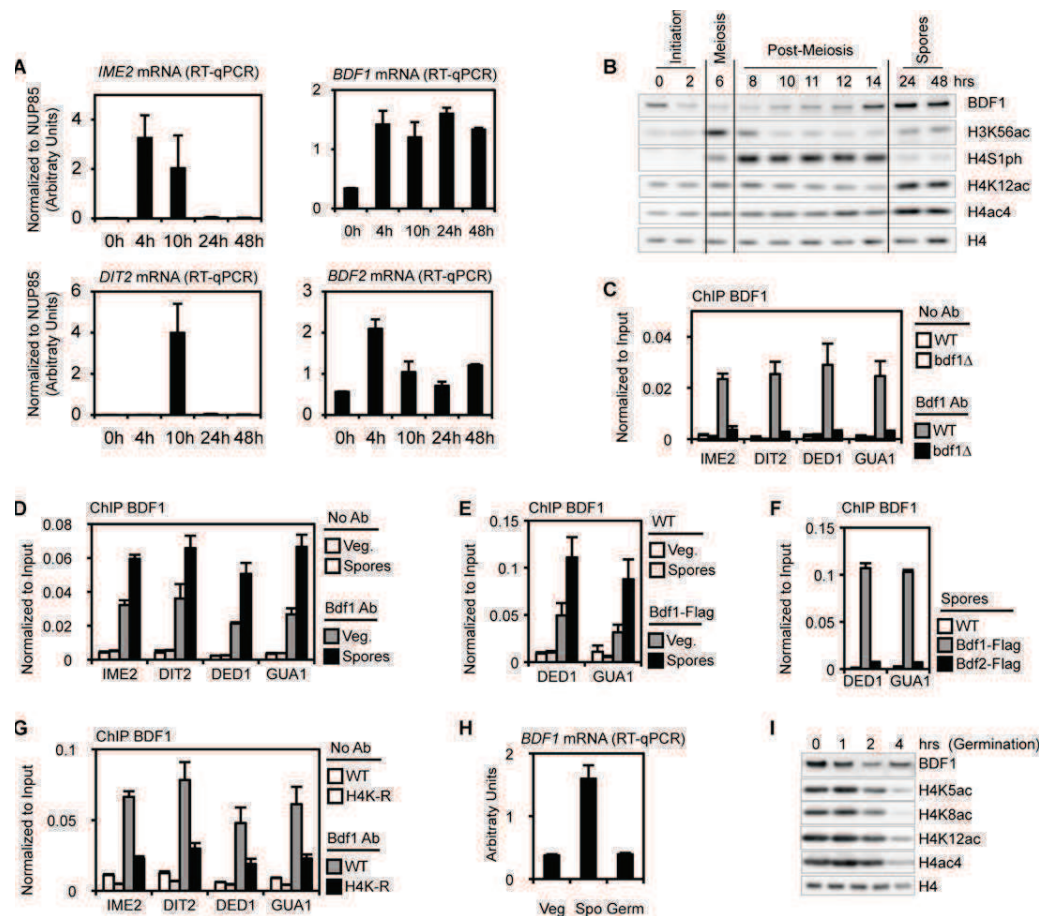


Figure 8. Bdf1 is highly expressed and enriched on acetylated chromatin in mature spores. (A) Quantifications of mRNA abundance of *IME2*, *DIT2*, *BDF1*, and *BDF2*. Data were obtained from three independent biological replicates, and were normalized to NUP85 (see the Materials and Methods). *IME2* and *DIT2* profiles confirm that the cells were sporulating synchronously. (B) Bdf1 abundance and acetylation status of H4 during sporulation analyzed by Western blot. The H3K56ac and H4S1ph pattern confirms that the cells were sporulating synchronously. Bdf1 accumulates in spores concomitantly with H4ac (quantification is presented in Supplemental Fig. 7B). (C) Bdf1 antibody is specific by ChIP. Wild-type (WT) and *bdf1Δ* cells were used to assess the specificity of Bdf1 antibody by ChIP. (D) Bdf1 is enriched on the chromatin of mature spores. ChIP was performed using the Bdf1 antibody in vegetative cells before sporulation induction (Veg.) or in mature spores (24 h after sporulation induction), and was analyzed on four different loci. (E) ChIP experiments using a Flag antibody in Bdf1-Flag strains. Results are consistent with data for Bdf1 antibody (Fig. 7D). (F) Bdf1, but not Bdf2, is recruited to the chromatin of mature spores. ChIP experiments were performed in Bdf1-Flag or Bdf2-Flag spores. (G) Bdf1 recruitment in mature spores is dependent on H4 acetylation. ChIP experiments were performed in wild-type and H4K-R strains in fully mature spores. (H) Quantification of *BDF1* mRNA in vegetative cells (before sporulation induction, Veg), in fully mature spores (48 h after induction, Spo), and during germination. The level of *BDF1* mRNA is specifically enriched in fully mature spores. (I) Bdf1 abundance analyzed by Western blot during germination. The Bdf1 level is reduced to vegetative levels 3–4 h after induction of germination. This profile is highly similar to the decrease of acetylated H4, as detected using several antibodies. The timing of this decrease corresponds to the re-entry into vegetative growth (Herman and Rine 1997; Joseph-Strauss et al. 2007; data not shown).

important role for Bdf1 in fully mature spores. First, we determined that the Bdf1 antibody was able to chromatin-immunoprecipitate the protein, as the Bdf1 Western signal was lost in a *bdf1Δ* strain (Fig. 8C). The amount of Bdf1 bound to the chromatin was then determined in vegetative cells versus mature spores at different locations. A recent study reported that Bdf1 is enriched on the 5' end of each ORF (Koerber et al. 2009); therefore, primers were designed on the +1 and +2 nucleosomes of a variety of genes having typical transcription patterns (sporulation- or germination-specific). We found Bdf1 enriched on

the chromatin of mature spores compared with vegetative cells (Fig. 8D). This result was confirmed using both the Bdf1 antibody (Fig. 8D) and a Flag antibody (Fig. 8E) in the Bdf1-Flag strain (only a selection of genes is shown in Fig. 8E). More than 15 different loci were tested, and the enrichment of Bdf1 appeared to be homogeneous and independent of the transcription status of each gene. Indeed, *IME2* and *DIT2*, which are specifically expressed during sporulation, show the same level of recruitment as *DED1* and *GUA1*, genes that are slightly or greatly induced during germination (Fig. 8A [mRNA levels], D

[ChIP data]; Supplemental Fig. S7C,D). We then attempted to chromatin-immunoprecipitate H4Kac in fully mature spores (48 h after induction), but were unable to detect the modification, although we previously detected H4ac at 11 h after induction of sporulation using ChIP (Govin et al. 2010). We therefore hypothesize that the high level of chromatin compaction at the late stage of maturation may block ChIP detection of H4ac. We also found that Bdf1, and not Bdf2, appears to have a role in late sporulation based on findings (1) of low levels of *BDF2* mRNA levels in mature spores (Fig. 8A), and (2) that Bdf2 was not recruited to the spore chromatin, using ChIP of a Flag-tagged strain (Fig. 8F).

Importantly, recruitment of Bdf1 to spore chromatin was dependent on the acetylation status of H4, because the Bdf1 ChIP signal was abolished in H4K-R mutant spores (Fig. 8G). Finally, we investigated the levels of H4ac and Bdf1 when spores return to vegetative growth; i.e., as the spores begin to germinate. *BDF1* mRNA levels drop to those detected before induction of sporulation (Fig. 8H). Bdf1 protein levels also were reduced, and concomitantly with the decrease of H4 acetylation. The timing of the decrease in both H4 acetylation and Bdf1 perfectly matches the return to growth of the cells, which divide 4 h after the induction of germination (Herman and Rine 1997; Joseph-Strauss et al. 2007; data not shown). Taken together, these data provide strong evidence for a role of H4 hyperacetylation to recruit Bdf1 to compact chromatin specifically during late sporulation.

Discussion

The yeast *S. cerevisiae* has long provided a highly informative model for chromatin mechanisms that are evolutionarily conserved. In this study, we extend the utility of the yeast model to identify numerous novel nucleosome regions and histone H3 and H4 alterations that underlie chromatin reorganization during sporulation. These include both new patches on the surfaces of the nucleosome and new post-translational modifications. We initially determined the sporulation efficiency of the substitutions relative to wild-type histones in a simple endpoint assay, and then examined the stage of the process blocked by the substitution mutations. This analysis identified a new meiotic modification, H3T11ph, and shed light on a new pattern of H4 modifications during the final stages of spore maturation. Finally, we investigated whether these modifications are conserved through evolution to spermatogenesis, a process having numerous features in common with sporulation, including ortholog proteins able to read and interpret these modifications.

Importantly, in this first large-scale mutational study, we analyzed in detail only a small number of modifications; we note that the first three modifications addressed for mechanism (H3T11ph and H4K5/8/12ac, along with H4S1ph in our previous study) (Krishnamoorthy et al. 2006) are conserved during mouse spermatogenesis. Thus, an important conclusion is that our broad analysis of yeast sporulation will usher in further discovery of specific modi-

fications and novel chromatin-modulating proteins that regulate spermatogenesis.

It has been revealed in *S. cerevisiae* that substitutions of single amino acids in histones do not, in general, have a dramatic effect on mitotic growth (Dai et al. 2008; Nakanishi et al. 2008). However, our results show that, in striking contrast, there are numerous single substitutions that have significant deleterious effects on meiosis and sporulation.

We identify two surface patches on H3 and H4, each comprising a group of substitutions that profoundly lower sporulation efficiency. These patches are likely to provide surfaces involved in protein interactions. The substitutions in the LOS patch have a strong negative effect on sporulation, affecting a stage following early steps, such as induction of the master regulators Ime1 and Ime2, and DNA synthesis. Our data suggest that the inflection point follows DNA synthesis, but is before meiotic divisions. LOS mutants do not show any mitotic defects, but cannot complete meiosis, suggesting that the main function of the LOS patch is meiotic-specific.

Interestingly, loss of telomere silencing has been linked to defects in meiosis completion in *Schizosaccharomyces pombe* (Nimmo et al. 1998), but no clear functional mechanism has been proposed. The LOS patch in H4 occurs within a larger patch including both H3 and H4, called the LRS region, which regulates heterochromatic silencing of telomeres via direct interaction with the Sir3 component of the Sir2/Sir3/Sir4 silencing complex. However, it appears highly unlikely that the LOS phenotype is directly related to a loss of Sir3 recruitment, because some of the key residues in H3 within the LRS region that interact with Sir3 are not in the LOS group of residues (Norris et al. 2008). Furthermore, a deletion of Sir3 only delays meiosis completion, but does not greatly affect sporulation efficiency (Trelles-Sticken et al. 2003). Taken together, this suggests that the LOS patch involves a new Sir3-independent pathway critical for meiosis completion.

One speculative possibility involves assembly of a telomeric cluster, called a bouquet, which forms at the beginning of meiosis and is critical for chromosomal pairing and successful meiotic divisions (Siderakis and Tarsounas 2007). The LOS patch could be involved in this process, which has been shown to be independent of Sir3 (Trelles-Sticken et al. 2003), but involves other silencing telomeric proteins (Chikashige and Hiraoka 2001).

The second patch is within the H3 amino tail region that interacts with the DNA emerging from the linker region, as the DNA initially associates with the histone octamer. This patch (the DEE) may be involved in new nucleosome assembly following replication, since the patch includes H3K56, and acetylation at this residue is thought to be involved in nucleosome assembly during both DNA replication and DNA repair. Because both K56R (mimicking loss of acetylation) and K56Q (mimicking acetylation) are defective in these latter processes, it is thought that the rapid cycling of acetylation is important for assembly (Schneider et al. 2006; Driscoll et al. 2007; Han et al. 2007). Since we find that only K56R (and K56A), but not K56Q, is defective during sporulation, it may be that acetylation provides a surface for

more stable association with an interacting protein, binding of which may also be affected by the neighboring residues in the DEE patch.

Identification of new histone modifications during sporulation

We did not detect global alteration of many well-characterized transcription-linked histone modifications during sporulation, nor did substitution mutations in the residues affect the process (e.g., H3K4me3 and H3K9/K14ac; H3K4A, H3K9A, or H3K14A). While we observed a modest defect in sporulation efficiency of the H3K36A strain, there was no global change in K36me levels during the course of sporulation. One implication is that modifications that regulate transcription of the cascade of genes during sporulation, even of the master regulators of sporulation, do not individually have a key role, and this includes H3K4me3 and H3 amino tail acetylations. A second conclusion is that the modified residues that do show a mutagenetic effect during sporulation, and that show specific temporal patterns of modification during sporulation, are likely to exert a broad functional role over the genome. These likely regulate meiotic replication and/or recombination, and stages of compaction in the post-meiotic sporulation process, as described below.

Meiotic replication and recombination Our study represents the first detailed analysis of histone post-translational modifications through the entire course of sporulation, including within fully mature spores (summarized in Fig. 9). We show one group of modifications that is specific to meiosis. H3T11ph is emblematic of these, as it is detected for the first time in *S. cerevisiae*, increases during meiosis, and has a significant phenotype as H3T11A substitution (Fig. 9). H3S10ph and H3K56ac are two other modifications that increase during meiosis (Fig. 9; Krishnamoorthy et al. 2006; Recht et al. 2006; this study). It appears that H3T11ph is carried out by the Mek1 kinase, since, of several nuclear kinase candidates that are induced during the meiotic phase (Chk1, Ipl1, and Mek1), only mutation in *MEK1* strongly reduces

H3T11ph. Mek1 is known to regulate programmed recombination during meiosis, which is critical for continuity of the sporulation process and spore viability (Rockmill and Roeder 1991; Wan et al. 2004). Prevention of H3T11 phosphorylation by introduction of an H3T11A mutation also decreases sporulation efficiency and spore viability, which suggests that H3T11ph may be directly regulating recombination downstream from Mek1.

Post-meiotic chromatin compaction We showed previously that H4S1ph increases just following the end of meiosis, and is involved in chromosome compaction (Fig. 9; Krishnamoorthy et al. 2006). In this study, we found that H4K5/8/12ac increases very late in meiosis, but, strikingly, H4K16ac does not show a similar increase (Fig. 9). Thus, it appears that the acetylation of K5/8/12 is involved in chromatin compaction, and H4K16ac, which, in contrast, is able on its own to decompact chromatin in vitro (Shogren-Knaak et al. 2006), is not similarly involved in this process. It is interesting that multiply acetylated H4 is an association surface for bromodomain proteins during mitosis (Dey et al. 2003) and spermatogenesis (Pivot-Pajot et al. 2003; Moriniere et al. 2009). Indeed, Brdt is specifically expressed during spermatogenesis, and contains two bromodomains (Moriniere et al. 2009). Moreover, Brdt has been shown to be able to compact acetylated chromatin (Pivot-Pajot et al. 2003; Moriniere et al. 2009). We show that the orthologous protein yeast Bdf1 appears to have a similar role during sporulation, to promote chromatin compaction through its specific recruitment to spore chromatin by acetylated histones.

Finally, an additional important conclusion from our study is that there is evolutionary conservation of histone post-translational modifications during the process of gametogenesis, extending from yeast sporulation to mammalian spermatogenesis (Fig. 9). Here we discovered a role of H3T11ph during meiosis, and extended these observations to meiosis during spermatogenesis; in both cases, there is a coincidence with H3S10ph. Furthermore, we found a remarkable late sporulation hyperacetylation of H4 following the decline in H4S1ph, and we demonstrate

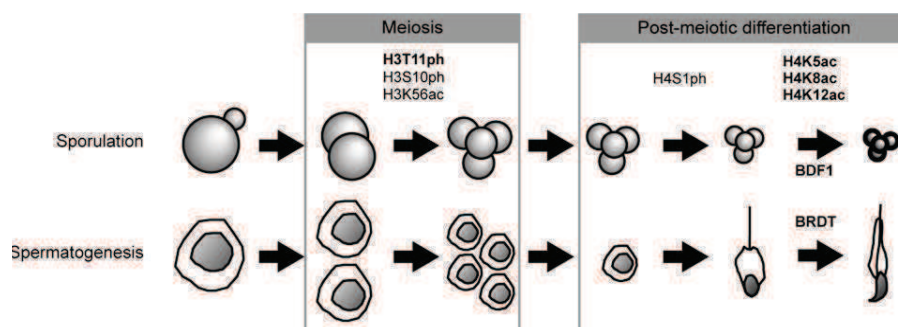


Figure 9. Summary of conserved histone modifications during sporulation and spermatogenesis. Sporulation and spermatogenesis are represented as a series of steps, including meiosis and post-meiotic differentiation. Histone marks associated with specific steps are indicated. Bold is used to emphasize histone marks and patterns identified in the present study. Bdf1 and its ortholog Brdt are involved in the final compaction of the chromatin.

a similar relationship in spermatogenesis, where H4 acetylation surges after H4S1ph levels fall (Fig. 9). Thus, our study shows that systematic, discovery-based approaches to dissect chromatin regulation during yeast sporulation can enhance understanding of orthologous processes in mammalian spermatogenesis.

Materials and methods

Antibodies

H3 and H3K4me3 antibodies were obtained from Abcam (Ab1791 lot 147540 and Ab8580 lot 151301). H4ac4, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H3K56ac, and H3T11ph antibodies were obtained from Millipore-Upstate Biotechnologies (08-866 lot 31992, 07-595 lot 30417, 07-328 lot 30399, 07-327 lot 07-595, 07-329 lot 26818, 07-677 lot 30328, and 05-789 lot 26854). H4 and H3S10ph antibodies were obtained from Active Motif (39269 lot 11908001 and 39274 lot 13008001). H4S1ph was a gift from David Allis at Rockefeller, and was described previously (Barber et al. 2004). Bdf1 antibody was a gift from Shirleen Roeder (Yale University).

Yeast strains

All strains are in the SK1 background. The yeast wild-type diploid used for sporulation has the following genotype: *MATa/MAT α leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2*.

A histone shuffling strain was created in the SK1 background by deletion of endogenous copies of the histone H3 and H4 genes using conventional deletion methods, creating the strain yJG52 (*MATa/MAT α leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2 hhf1-hht1::LEU2/hhf1-hht1::LEU2 hhf2-hht2::trp1::KanMX3/hhf2-hht2::trp1::KanMX3*). Histone genes are provided on plasmid pDM1 (HHF2-HHT2 CEN-ARS1 URA3). This pDM1 plasmid was replaced by pRM204 plasmid (HHF2-HHT2 CEN-ARS1 TRP1), allowing the introduction of desired mutations into yeast strains. Most of the mutated plasmids were provided by Ali Shilatifard (Nakanishi et al. 2008). Other mutations were introduced using QuickChange kit (Stratagene, 200518-5). The presence of the desired mutations, as well as the disappearance of the wild-type version, was verified by sequencing of the histone genes present in the new yeast strains, and, where indicated, by Western blot.

Sporulation induction and spore analysis

For sporulation, diploid yeast in the SK1 background were grown in YPA to an OD of 0.5–0.8. Growth rates were tracked for each mutant by monitoring the OD₆₀₀. Yeast were then washed in water, and transferred into sporulation media (K Acetate 2%) at OD 2 and supplemented for auxotrophic amino acids. Samples were collected at the indicated times, washed twice in water, and stored at –80°C. Sporulation efficiency was typically assessed after 24 h of induction. Sporulation efficiency is defined by the number of original cells that formed tetrads, and is usually >98% in a wild-type SK1 background.

Whole-cell extracts and Western blots were performed as described previously (Krishnamoorthy et al. 2006). Quantification of Western blot images was performed using two to three biological independent replicates, depending on the time points, even in cases in which images from only one replicate are shown. Measurements of the spore nuclei were performed as described

previously (Krishnamoorthy et al. 2006). *t*-tests were performed to determine statistical significance.

mRNA quantification

RNA was purified using Qiagen RNAeasy Purification kit according to the manufacturer's instructions. RT was performed using TaqMan Reverse Transcription (ABI). cDNA were quantified using standard procedures on a 7900HT Fast-Real-Time PCR (ABI). During sporulation, cDNA levels were normalized to NUP85, whose mRNA levels appear to be constant in three independent genome-wide transcriptome analyses (Chu et al. 1998; Primig et al. 2000; Friedlander et al. 2006). During germination (Fig. 8H; Supplemental Fig. 7C,D), cDNA levels were normalized to a combination of three different genes—MEF1, SVP26, and ATP10—whose mRNA levels appear to be constant in a genome-wide transcriptome analysis carried out during germination (Joseph-Strauss et al. 2007) using Genorm (Vandesompele et al. 2002). Primers are presented in Supplemental Table 3. Three to four independent biological replicates were analyzed.

ChIP

ChIP analyses were performed as described (Govin et al. 2010). The only minor difference is that cross-linking was done with 1% EGS for 15 min, and then 1% formaldehyde for 10 min before quenching for 5 min with 125 mM glycine.

Mouse spermatogenesis

Immunofluorescence and immunohistochemistry Immunofluorescence experiments were performed on germ cells from staged microdissected tubules, which were prepared as described by Kotaja et al. (2004). The detailed protocol for immunofluorescence was described (Govin et al. 2007). The protocol of immunohistochemistry experiments on testis paraffin sections was described (Faure et al. 2003).

Cell fractionation and analysis Cells were fractionated on a 2%–4% BSA gradient, and were analyzed as described previously (Pivot-Pajot et al. 2003).

Acknowledgments

We thank former and present members of the Berger laboratory for valuable discussions. The research in the Berger laboratory was supported by research grant GM55360 from the National Institutes of Health. J.G. has been supported by the Excellence Biomedical Program of the "Fondation pour la Recherche Médicale Française," and by the Philippe Foundation. S.K.'s laboratory is supported by ANR EpiSperm and empreinte, as well as ARC and INCa programs.

References

- Balhorn R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* **93**: 298–305.
- Barber CM, Turner FB, Wang Y, Hagstrom K, Taverna SD, Mollah S, Ueberheide B, Meyer BJ, Hunt DF, Cheung P, et al. 2004. The enhancement of histone H4 and H2A serine 1 phosphorylation during mitosis and S-phase is evolutionarily conserved. *Chromosoma* **112**: 360–371.
- Berger SL. 2007. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**: 407–412.
- Chikashige Y, Hiraoka Y. 2001. Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Curr Biol* **11**: 1618–1623.

- Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM. 2001. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**: 82–86.
- Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**: 699–705.
- Chua P, Roeder GS. 1995. Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation. *Mol Cell Biol* **15**: 3685–3696.
- Dai J, Hyland EM, Yuan DS, Huang H, Bader JS, Boeke JD. 2008. Probing nucleosome function: A highly versatile library of synthetic histone H3 and H4 mutants. *Cell* **134**: 1066–1078.
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **319**: 1097–1113.
- Dey A, Chitsaz F, Abbasi A, Misteli T, Ozato K. 2003. The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 8758–8763.
- Dion MF, Altschuler SJ, Wu LF, Rando OJ. 2005. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 5501–5506.
- Driscoll R, Hudson A, Jackson SP. 2007. Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56. *Science* **315**: 649–652.
- Faure AK, Pivot-Pajot C, Kerjean A, Hazzouri M, Pelletier R, Peoc'h M, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S. 2003. Misregulation of histone acetylation in Sertoli cell-only syndrome and testicular cancer. *Mol Hum Reprod* **9**: 757–763.
- Friedlander G, Joseph-Strauss D, Carmi M, Zenvirth D, Simchen G, Barkai N. 2006. Modulation of the transcription regulatory program in yeast cells committed to sporulation. *Genome Biol* **7**: R20. doi: 10.1186/gb-2006-7-3-r20.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. 2009. From meiosis to postmeiotic events: The secrets of histone disappearance. *FEBS J* **277**: 599–604.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* **271**: 3459–3469.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, et al. 2007. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**: 283–294.
- Govin J, Schug J, Krishnamoorthy T, Dorsey J, Khochbin S, Berger SL. 2010. Genome-wide mapping of histone H4 serine-1 phosphorylation during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkq218.
- Hammoud S, Nix D, Zhang H, Purwar J, Carrell D, Cairns B. 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**: 473–478.
- Han J, Zhou H, Horazdovsky B, Zhang K, Xu R-M, Zhang Z. 2007. Rtt109 acetylates histone H3 lysine 56 and functions in DNA replication. *Science* **315**: 653–655.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sele B, Khochbin S, Rousseaux S. 2000. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: Involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* **79**: 950–960.
- Herman PK, Rine J. 1997. Yeast spore germination: A requirement for Ras protein activity during re-entry into the cell cycle. *EMBO J* **16**: 6171–6181.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, et al. 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**: 279–291.
- Hyland EM, Cosgrove MS, Molina H, Wang D, Pandey A, Cottee RJ, Boeke JD. 2005. Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **25**: 10060–10070.
- Joseph-Strauss D, Zenvirth D, Simchen G, Barkai N. 2007. Spore germination in *Saccharomyces cerevisiae*: Global gene expression patterns and cell cycle landmarks. *Genome Biol* **8**: R241. doi: 10.1186/gb-2007-8-11-r241.
- Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. 2003. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol* **162**: 37–46.
- Kimmins S, Sassone-Corsi P. 2005. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* **434**: 583–589.
- Koerber RT, Rhee HS, Jiang C, Pugh BF. 2009. Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol Cell* **35**: 889–902.
- Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch J-L, Davidson I, Parvinen M, Sassone-Corsi P. 2004. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* **1**: 249–254.
- Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, Cheung WL, Dorsey J, Schindler K, Winter E, Allis CD, Guacci V, Khochbin S, et al. 2006. Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev* **20**: 2580–2592.
- Ladurner AG, Inouye C, Jain R, Tjian R. 2003. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**: 365–376.
- Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sassone-Corsi P, Davidson I. 2005. Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 2808–2813.
- McGrath J, Solter D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* **37**: 179–183.
- Monje-Casas F, Prabhu VR, Lee BH, Boselli M, Amon A. 2007. Kinetochore orientation during meiosis is controlled by Aurora B and the monopolin complex. *Cell* **128**: 477–490.
- Moriniere J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Curtet S, Vitte AL, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, et al. 2009. Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**: 664–668.
- Nakanishi S, Sanderson BW, Delventhal KM, Bradford WD, Staehling-Hampton K, Shilatifard A. 2008. A comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 881–888.
- Nimmo ER, Pidoux AL, Perry PE, Allshire RC. 1998. Defective meiosis in telomere-silencing mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **392**: 825–828.
- Norris A, Bianchet MA, Boeke JD. 2008. Compensatory interactions between Sir3p and the nucleosomal LRS surface imply their direct interaction. *PLoS Genet* **4**: e1000301. doi: 10.1371/journal.pgen.1000301.
- Park J-H, Cosgrove MS, Youngman E, Wolberger C, Boeke JD. 2002. A core nucleosome surface crucial for transcriptional silencing. *Nat Genet* **32**: 273–279.
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. 2003. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* **23**: 5354–5365.
- Primig M, Williams RM, Winzler EA, Tevzadze GG, Conway AR, Hwang SY, Davis RW, Esposito RE. 2000. The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* **26**: 415–423.

Govin et al.

- Recht J, Tsubota T, Tanny JC, Diaz RL, Berger JM, Zhang X, Garcia BA, Shabanowitz J, Burlingame AL, Hunt DF, et al. 2006. Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 6988–6993.
- Rockmill B, Roeder GS. 1991. A meiosis-specific protein kinase homolog required for chromosome synapsis and recombination. *Genes Dev* **5**: 2392–2404.
- Schneider J, Bajwa P, Johnson FC, Bhaumik SR, Shilatifard A. 2006. Rtt109 is required for proper H3K56 acetylation. *J Biol Chem* **281**: 37270–37274.
- Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M. 2008. Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* **132**: 221–232.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. 2006. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**: 844–847.
- Siderakis M, Tarsounas M. 2007. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res* **15**: 667–679.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548–550.
- Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, Onishi M, Masai K, Maekawa M, Toshimori K, et al. 2005. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol* **25**: 7107–7119.
- Trelles-Sticken E, Loidl J, Scherthan H. 2003. Increased ploidy and KAR3 and SIR3 disruption alter the dynamics of meiotic chromosomes and telomeres. *J Cell Sci* **116**: 2431–2442.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Wan L, De Los Santos T, Zhang C, Shokat K, Hollingsworth NM. 2004. Mek1 kinase activity functions downstream of RED1 in the regulation of meiotic double strand break repair in budding yeast. *Mol Biol Cell* **15**: 11–23.
- Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD. 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 7480–7484.
- White CL, Suto RK, Luger K. 2001. Structure of the yeast nucleosome core particle reveals fundamental changes in internucleosome interactions. *EMBO J* **20**: 5207–5218.

Supplementary Figure legends

Figure S1. Histone shuffle strain construction and characterization.

A. Schematic representing the histone shuffle strain. Both genomic copies of the H3 and H4 genes are deleted (genes *HHT1*, *HHF1*, *HHT2*, *HHF2*), and placed on a plasmid. The original plasmid has a *URA3* marker. It can be replaced by a new plasmid, containing any desired mutation, selected using a *TRP1* marker. The original *URA3* plasmid is then negatively selected using 5-FOA. All strains were validated by recovery and sequencing of the plasmid. Please note that strains used in this study are diploid, but a haploid strain has been drawn for clarity.

B. Doubling times of the strain containing the wild type histones in rich media (YPD) are not affected in the histone shuffle strain.

C. Sporulation efficiency is not affected in the wild type histone shuffle strain.

Figure S2. Histone H3 and H4 conservation through evolution.

A and B. Alignments of the histones H4 and H3 proteins, from (Hs), Mouse (Mm), drosophila (Dm), worm (Ce), budding yeast (Sc) and fission yeast (Sp).

C. Identity and similarity of H3 and H4 proteins through evolution. Data has been obtained using histone sequences from species mentioned above.

Figure S3. The master-regulators Ime2 and Im4 are induced in LOS, DEE and H3 tail mutants during sporulation initiation.

A. mRNA quantification of *IME2* and *IME4* in LOS mutants.

B. mRNA quantification of *IME2* and *IME4* in DEE mutants.

C. mRNA quantification of *IME2* and *IME4* in H3 tail mutants.

Figure S4. H3T11A mutation does not affect H3S10ph and H4S1ph patterns.

H3S10ph and H4S1ph patterns were analyzed by western blot in a H3T11A substitution mutant during sporulation. As expected, H3T11ph is lost in the H3T11A mutant. Both H3S10ph and H4S1ph signals are slightly decreased in the H3T11A mutant, however, western blot image quantification indicates that the reduction in H3 S10ph and H4S1ph

corresponds to the decrease in sporulation efficiency observed in the H3T11A mutant (not shown), and is thus likely to be an indirect effect.

Figure S5. H3S10A and H3T11A substitution mutations do not affect the compaction of the nuclei of mature spores.

Average nuclear size was determined of fully mature spores of WT, H3S10A and H3T11A strains. No significant difference between them was observed.

Figure S6. Histogram representation of Fig. 7D.

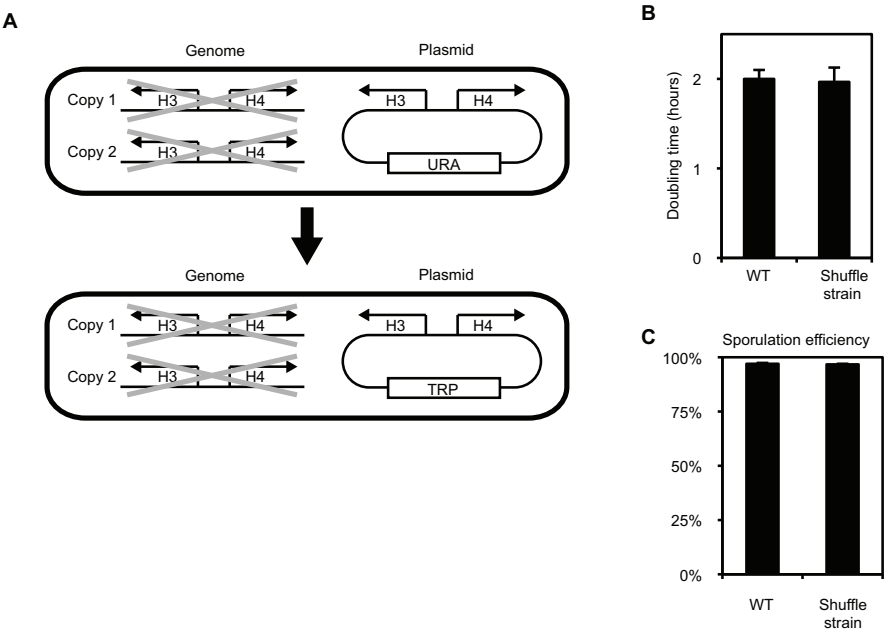
The area of the mature spore nuclei has been quantified in WT, H4S1A and H4K5/8/12R mutants. Averages are presented in Fig. 7D, and the corresponding histogram representation is shown here.

Figure S7. Control experiments associated with Fig 8.

A. Specificity of the Bdf1 antibody. Bdf1 was immunoprecipitated in a WT or Bdf1-Flag strain, using a Bdf1 antibody or a Flag antibody. Detection with Bdf1 and Flag antibodies confirmed the specificity of the Bdf1 antibody. Please note that the Flag epitope introduces a shift, noticeable using the Bdf1 antibody.

B. Quantification of the western blots detecting Bdf1 during sporulation, including images presented in Fig. 8B. The time course was divided into stages as indicated in Fig. 7A (I, Initiation; M, Meiosis; PM, Post-Meiosis; Sp, Spores). Quantification was performed using 2-3 biological independent replicates (depending on the time points).

C and D. *DED1* and *GUA1* mRNA levels in fully mature spores and after induction of germination.



A

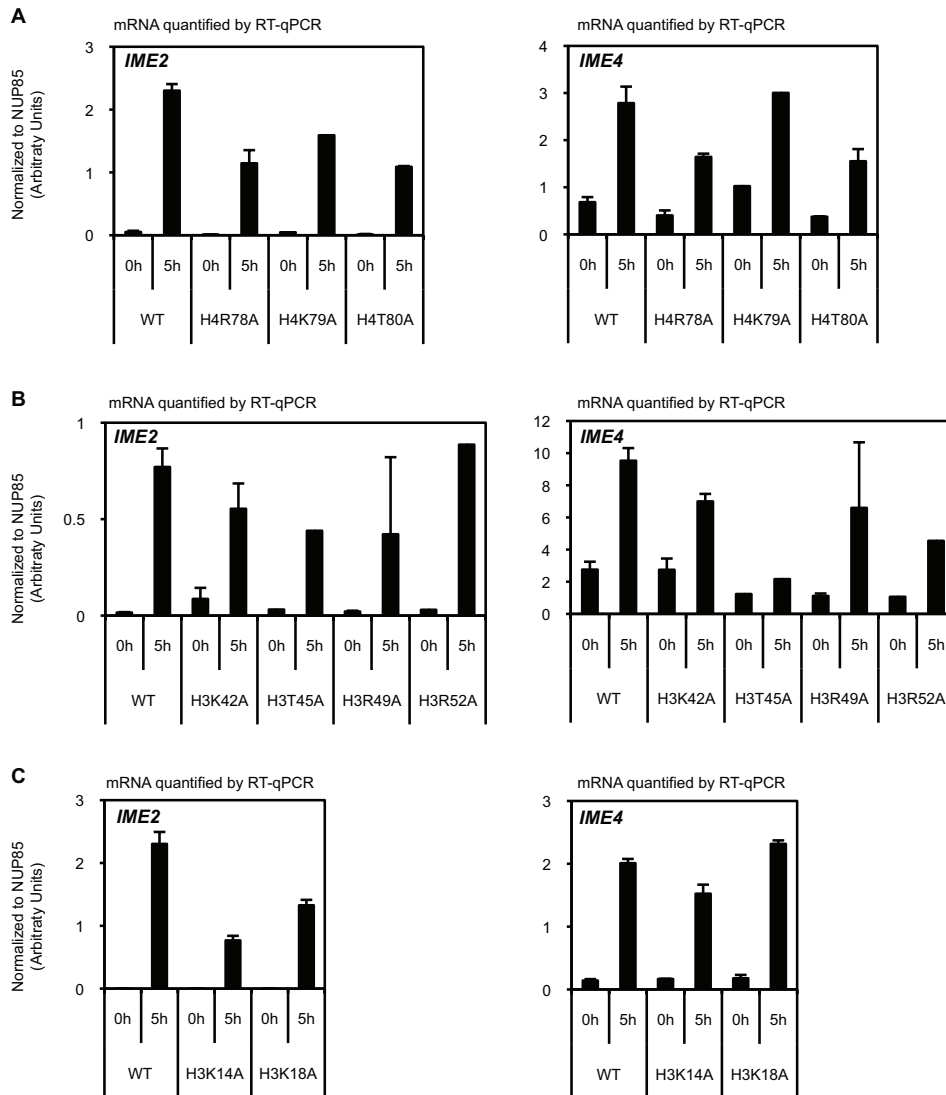
	1	10	20	30	40	50
H4_Hs	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLI					
H4_Mm	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLI					
H4_Dm	TGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLI					
H4_Ce	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLI					
H4_Sc	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISGLI					
H4_Sp	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVL RDNIQGITKPAIRRLARRGGVKRISALV					
	60	70	80	90	100	
H4_Hs	YEE TRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTYGFGG					
H4_Mm	YEE TRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTYGFGG					
H4_Dm	YEE TRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTYGFGG					
H4_Ce	YEE TRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTYGFGG					
H4_Sc	YEE TRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTYGFGG					
H4_Sp	YEE TRGV LKVFLENVIRDAVTYTEHAKRKTVTAMDVVYALKRQGRTYGFGG					

B

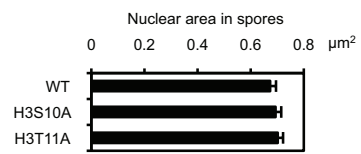
	1	10	20	30	40	50
H33_Hs	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALRE					
H33_Mm	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALRE					
H33_Dm	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALRE					
H33_Ce	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALRE					
H3_Sc	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPSTGGVKKPHRYRPGTVALRE					
H33_Sp	ARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKAAPATGGVKKPHRYRPGTVALRE					
	60	70	80	90	100	
H33_Hs	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSAIIGALQEASEAYL					
H33_Mm	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSAIIGALQEASEAYL					
H33_Dm	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSAIIGALQEASEAYL					
H33_Ce	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSAIIGALQEASEAYL					
H3_Sc	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSAIIGALQESVEAYL					
H33_Sp	IRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSAIIGALQEAVEAYL					
	110	120	130			
H33_Hs	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA					
H33_Mm	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA					
H33_Dm	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA					
H33_Ce	VGLFEDTNLCAIHAKRVTIMPKDIQLARRIRGERA					
H3_Sc	VSLFEDTNLCAIHAKRVTIQKDKIKLARRLRGERS					
H33_Sp	VSLFEDTNLCAIHAKRVTIQPKDMOLARRLRGERS					

C

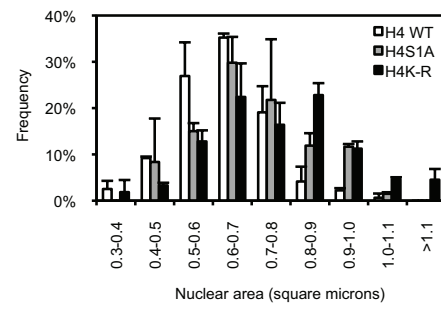
	Identity	Similarity
H4	87%	>98%
H3	87%	>98%



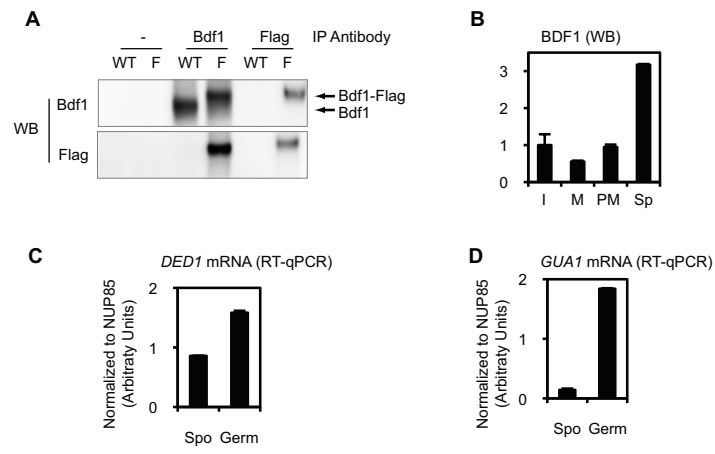
Govin_Fig S5



Govin_Fig S6



Govin_Fig S7



Supplementary Table 1: Strain lists

All the strains are in the SK1 background.
Histone mutant strains are derived from yJG52, and have not been listed here. Please refer to the plasmid list to overview mutants information.

Name	Usage	Genotype	Source
LN Y150		MATA/alpha leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2	L. Neigeborne
yJG52	Parental strain for histone screen	MATA/alpha leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2 hhf1-hht1::LEU2/hhf1-hht1::LEU2 hhf2-hht2::trp1::KanMX3/hhf2-hht2::trp1::KanMX3 Plasmid pDM9 (HHT2-HHF2 CNE ARS URA3)	This study
NK Y2694	mek1Δ	MATA/alpha leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2 arg4-Bgl/arg4-rsp his4X::LEU2-URA3/his4B::LEU2 mek1Δ::URA3/mek1Δ::URA3	MEK1 strain
10424	Ipl1 depletion during sporulation	MATA/alpha lys2::hisG/lys2::hisG ho::LYS2/ho::LYS2 ura3::hisG/ura3::hisG leu2::hisG/ leu2::hisG his3::hisG/ his3::hisG trp1::hisG/ trp1::hisG leu2::pURA3-TetR-GFP::LEU2, CENV::TetOx224::HIS3 pCLB2-3HA-IPL1::KanMX6/pCLB2-3HA-IPL1::KanMX6	Angelika Amon
yJG218	chk1Δ	MATA/alpha leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2 chk1::KANMX/ chk1::KANMX	This study
yJG231	Bdf1-Flag3x	MATA/alpha leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2 BDF1-Flag3x::KANMX/BDF1-Flag3x::KANMX	This study
yJG232	Bdf2-Flag3x	MATA/alpha leu2::hisG/leu2::hisG trp1::hisG/trp1::hisG lys2-SK1/lys2-SK1 his4-N/his4-G ura3-SK1/ura3-SK1 ho::LYS2/ho::LYS2 BDF2-Flag3x::KANMX/BDF2-Flag3x::KANMX	This study

Supplementary Table 2: Plasmids list

Parent plasmid information:

pRM204 HHF2-HHT2, CEN, ARS, TRP1

Plasmids obtained from Shima et al, JCB 2009

WT	H4 R55A	H3 R2A	H3 S31A	H3 R69A
H4 S1A	H4 K59A	H3 T3A	H3 T32A	H3 R72A
H4 R3A	H4 S60A	H3 K4A	H3 K36A	H3 K79A
H4 K5A	H4 S64A	H3 T6A	H3 K37A	H3 T80A
H4 K8A	H4 R67A	H3 R8A	H3 P38A	H3 R83A
H4 K12A	H4 S69A	H3 K9A	H3 R40A	H3 S87A
H4 K16A	H4 T71A	H3 S10A	H3 K42A	H3 S95A
H4 R17A	H4 T73A	H3 T11A	H3 P43A	H3 S102A
H4 R19A	H4 K77A	H3 K14A	H3 T45A	H3 S107A
H4 K20A	H4 R78A	H3 P16A	H3 R49A	H3 K115A
H4 R23A	H4 K79A	H3 R17A	H3 R52A	H3 K121A
H4 T30A	H4 T80A	H3 K18A	H3 R53A	H3 K122A
H4 K31A	H4 T82A	H3 S22A	H3 K56A	H3 K125A
H4 P32A	H4 S83A	H3 K23A	H3 S57A	H3 R128A
H4 R35A	H4 K91A	H3 R26A	H3 T58A	H3 R129A
H4 R36A	H4 R92A	H3 K27A	H3 R63A	H3 R131 A
H4 K44A	H4 R95A	H3 S28A	H3 K64A	H3 R134A
H4 S47A	H4 T96A	H3 P30A	H3 P66A	H3 S135A

Plasmids created in this study:

H4 K5R	H4 R78K
H4 K8R	H4K79R
H4 K12R	H3 K42R
H4 K16R	H3 K49R
H4 K5Q	H3 K56R
H4 K8Q	H3 K56Q
H4 K12Q	H4 K5R K8R K12R
H4 K16Q	

Supplementary Table 3: Primers list

Primer sequences used to introduce mutations in the histone genes will be provided upon request.

Primers used for RT-qPCR

	Forward	Reverse
IME2	CAAGCATTGATTTTTGCAGGTATAA	CTGCGGGCAATTTTGTTGA
IME4	TGGTCCAAAATATCCGCATGT	GCACTCAATTAATCCTGGGTGAT
MEK1	GATATCCTCGTTCCTGCGTTTT	CAATTGCTTGCTGGGATTCTC
IPL1	TAGATGCATGGGCTCTTGGC	GGGCACCGGTCAGTAGTTCA
CHK1	TGGCATCCTCTTGTTCTGATTG	GGTAATTCCCAAGGCGTTTGA
NUP85	CAGCAAAGAGTTTTCTGCATACGTATCAGG	ATTAAACACTCTGTCATCACCTAAATCACGG
DED1	TGGTAGATGGATCGATGGCA	GCCTTTTCGTTTCTTGAGCT
GUA1	CCAAATTTCCCAAGCCTTTG	ACACCAACGGATTTAACGGG
MEF1	GCAGAATGTGCCTTGAGCAC	GGCTCTTAATGAGGTGGCGA
SVP26	CAACGAACAACCAAGCCAAAA	CACGAGCTAACCCAACAGCC
ATP10	GCTTACGCGGATGTCCTTCT	GTTGCCATCATAGGCTTGAGG

Primers used for ChIP

	Forward	Reverse
IME2	GCCTAAAAATGGTCACCAAACTATAT	GCCACTACACCTTGTGTCTTTGTT
DIT2	TCGTCAAAATGTTGGAGCCC	TTGGAGAAACTACAGAAATGCTGTG
DED1	AAGAGATGGAGGAACGGGAAA	CCACTTGCCACCTATCACCAC
GUA1	TATGCTGAGATGTTGCCATGC	AGTCCAGCCCAACTCAGAGATC

4. Identification de facteurs impliqués dans la réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse

- Introduction

Au cours de la spermiogenèse les histones massivement acétylées sont remplacées par les protéines de transitions elles mêmes remplacées par les protamines. La machinerie de remodelage impliqué dans ces étapes demeure encore inconnue. Nous avons donc entrepris une analyse protéomique sur les spermatides de souris qui sont en cours de remodelage. De nombreux facteurs semblent coopérer lors du processus d'échange des histones par les protéines de transition. Parmi eux, des variants d'histones, des complexes de remodelages, des protéines chaperonnes d'histones, des chaperonnes des protéines de transition.

- Principaux résultats

Nous avons identifié des chaperonnes telles que Nap1L4, NPM3, HSPA2, qui pourraient jouer un rôle déterminant dans le désassemblage et l'assemblage des structures nucléosomales et non nucléosomales au cours des étapes post-méiotiques. Par exemple, la protéine HSPA2 pourrait chaperonner les protéines de transition via une interaction directe.

D'autres protéines comme les variants d'histones H2AX, H2AZ, pourraient aussi intervenir. D'une part, il est possible que ces variants participent à la déstabilisation des nucléosomes lors des étapes d'échange des histones par les protéines de transition. D'autre part, ces variants restent associés à la chromatine pendant la maturation du spermatozoïde et pourraient apporter une information épigénétique au futur zygote.

Mon implication personnelle a porté sur la validation d'interactions par immunoprécipitation des protéines endogènes (au sein du testicule). Par exemple, j'ai pu montrer une interaction directe de la protéine de transition TP2 avec sa chaperonne potentielle HSP70.2 au sein d'un extrait soluble. J'ai également participé à la discussion des divers résultats.

- Présentation de l'article publié

Proteomic strategy for the identification of critical actors in reorganization of the post-meiotic male genome

Molecular Human Reproduction, publication 5 octobre 2011

Jerome Govin; Jonathan Gaucher; Myriam Ferro; Alexandra Debernardi; Jerome Garin; Saadi Khochbin; Sophie Rousseaux.

Proteomic strategy for the identification of critical actors in reorganisation of the post-meiotic male genome

Jerome Govin^{1,2,4}; Jonathan Gaucher^{3,4}; Myriam Ferro^{1,2,4}; Alexandra Debernardi^{3,4}; Jerome Garin^{1,2,4}; Saadi Khochbin^{3,4}; Sophie Rousseaux^{3,4*}.

¹CEA, iRTSV, Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France.

²INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France.

³INSERM, U823; Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38700 France

⁴Université Joseph Fourier-Grenoble I, F-38400 France

* Corresponding author: Sophie Rousseaux (sophie.rousseaux@ujf-grenoble.fr)

Short title: Nuclear proteome of post-meiotic male germ cells

Abstract

After meiosis, during the final stages of spermatogenesis, the haploid male genome undergoes major structural changes, resulting in a shift from a nucleosome-based genome organization to the sperm-specific, highly compacted nucleoprotamine structure. Recent data support the idea that region-specific programming of the haploid male genome is of high importance for the post-fertilization events and for successful embryo development. Although these events constitute a unique and essential step in reproduction, the mechanisms by which they occur have remained completely obscure and the factors involved have mostly remained uncharacterized. Here we sought a strategy to significantly increase our understanding of proteins controlling the haploid male genome reprogramming, based on the identification of proteins in two specific pools: those with the potential to bind nucleic acids (basic proteins) and proteins capable of binding basic proteins (acidic proteins). For the identification of acidic proteins, we developed an approach involving a transition-protein (TP)-based chromatography, which has the advantage of retaining not only acidic proteins due to the charge interactions, but also potential TP-interacting factors. A second strategy, based on an in depth bioinformatic analysis of the identified proteins, was then applied to pinpoint within the lists obtained, male germ cells expressed factors relevant to the post-meiotic genome organization. This approach reveals a functional network of DNA-packaging proteins and their putative chaperones and sheds a new light on the way the critical transitions in genome organizations could take place. This work also points to a new area of research in male infertility and sperm quality assessments.

Key words: DNA binding, epigenetics, gene expression, proteomics, spermatozoa

Introduction

Despite the fact that many causes of infertility remain unknown, in most cases, it is now possible to circumvent the problem by using assisted reproductive technologies (ART). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into the egg now allows fertilization in many cases of male-related or unexplained infertility cases, when the spermatozoa would not be numerous or “fit” enough to reach and fuse with the oocyte. Although in some cases these approaches can be successful and lead to the birth of an apparently healthy baby, in many cases, the embryos do not develop to term (Hotaling et al. 2011; Maggiulli et al. 2010; Oliva et al. 2007; Palermo et al. 2009). There are of course many explanations to these failures, including female inability to support development, but it is clear that the normal constitution of the male genome, which is injected into the oocyte, is of crucial importance for the development of a healthy embryo.

The sperm genome is the result of major structural changes taking place during the final stage of spermatogenesis, in spermatids. Immediately after meiosis, round spermatids inherit a haploid genome packaged in a nucleosome-based structure, where DNA is wrapped around an octamer of core histones. During spermatids elongation and condensation, nearly all histones are removed and successively replaced by transition proteins (TPs), which are themselves later replaced by protamines (Prms) (Caron et al. 2005; Lewis et al. 2003). The resulting sperm DNA is tightly associated with these highly basic small proteins forming the nucleoprotamine structure. This compact structure is a warrant of the protection of the precious male genome, which will have to be delivered to the female oocyte, as intact as possible, after a long and risky journey.

The existence of surviving nucleosomal structures within the sperm nucleus was initially suggested by electron microscopy observations (Gatewood et al. 1987; Gusse and

Chevallier 1980; Pittoggi et al. 1999) and high performance liquid chromatography (Gatewood et al. 1990). It was estimated that nucleosomes are associated with approximately 2-4% and 15% of mouse and human sperm DNA respectively. An important question is whether the distribution of the two structures, nucleosome and nucleoprotamine, is random along the genome or whether the nucleosomal components specifically associate with specific regions of the male genome. Two pioneer studies first attempted to answer this question by mapping histones and protamines on specific genomic regions (Gardiner-Garden et al. 1998; Wykes and Krawetz 2003). The first addressed the question by examining several members of the beta-globin gene family expressed at different times in development (Gardiner-Garden et al. 1998) and the second study by focussing on the human PRM1-PRM2-TNP2 locus, several imprinted loci, as well as telomeric repetitive sequences (Wykes and Krawetz 2003). Both studies showed that several specific regions escape the genome-wide transition into nucleoprotamine structures, and that these regions could correspond to genes important for the early embryonic development.

Precise mapping of nucleosomes on the sperm genome in several species, including the human and the mouse (Arpanahi et al. 2009; Brykczynska et al. 2010; Hammoud et al. 2009) has recently been published. Although different experimental strategies were used for the mapping of nucleosome-rich regions in mature sperm, all three studies clearly demonstrate that in human and mouse sperm, genes of importance for embryo development bear nucleosomes with distinctive modifications, suggesting a specialized packaging of developmental genes in the male germline.

These observations strongly suggest that it is important that some genomic regions escape the global nucleoprotamine packaging, but the true biological significance of a specific marking of some regions or genes within the male genome remains to be discovered.

The investigations published so far have mainly focussed on a description of the mature sperm nucleus. Very few studies have investigated the molecular mechanisms involved in the global structural transitions and the region-specific genome re-organisations of the male genome. Questions such as the mechanisms involved in the disappearance (and degradation) of histones, the incorporation of transition proteins, their role and their removal, the final incorporation of protamines have remained unanswered (Gaucher et al. 2010).

Along this line of investigation, we found that, in the male germ cells before the global histone to protamine exchange, the paternally and maternally imprinting control regions (ICRs) bear differential histone modifications (Delaval et al. 2007). This observation suggests that chromatin differences could influence the way ICRs are assembled into specific structures during final sperm maturation, which would be transmitted through fertilization and influence important events during development.

Additionally, we have recently discovered a group of late-expressing histone variants synthesized and incorporated when other histones are removed. We could also show that these variants participate to a specific organization of pericentric regions (Govin et al. 2007; Wu et al. 2008). These histones and other yet unknown genome packaging proteins could also organize other important regions of the male genome. It is therefore crucial to characterize all the possible DNA-packaging structures in order to obtain a thorough description of the male epigenome. This however requires a prior identification of all the potential structural elements, which could organize the genome in post-meiotic male cells.

Here, we describe a specific approach based on the proteomic analyses of two types of essential protein pools from post-meiotic cells with regard to the issue discussed above: on the one hand, an acid soluble nuclear extract which is constituted of basic proteins potentially capable of interaction with nucleic acids, and on the other hand, acidic proteins which have

the potential of acting as chaperones for the basic genome interacting proteins. The proteomic data were then refined by confrontation with expression and functional analyses, which led not only to the establishment of a list of relevant factors involved in the post-meiotic packaging and programming of the male genome, but also into a functional relationship between them. Finally, this approach also identified potential male infertility candidate genes allowing a better characterization of male infertility in general and, in the long term, a better quality assessment of sperm cells to be used in ART.

Material and methods

Purification of germ cells

Fractions enriched in spermatogenic cells at different stages of maturation were prepared using a BSA gradient as described in (Pivot-Pajot et al. 2003). Nuclei were prepared as described previously (Govin et al. 2006).

Nuclei of spermatids at steps 12-16 were purified by sonication of testicular germ cells, as described in (Marushige and Marushige 1978). This technique takes advantage of the specific resistance to sonication of late spermatids, to eliminate the other testicular cells, and prepare pure spermatids nuclei suspension.

TP1 chromatography strategy

A TP1-expressing cDNA was cloned in a bacterial expression vector and used to produce and purify the corresponding protein (not shown). Purified TP1 (or BSA as a control) was used to coat CNBr (Cyanogen bromide) activated beads and prepare the corresponding columns. Nuclear extracts were then prepared following two methods: i/ fractionated post-meiotic germ cells enriched in round spermatids (RS) or in elongating and condensed spermatids (ECS), ii/ condensed spermatids (CS) nuclei obtained after sonication (stage 12-16 spermatid nuclei are resistant to sonication, which enables their efficient and rapid purification).

These extracts were then applied to our TP column and to the BSA-coated column (used as a control). After several washes the retained proteins were eluted and visualized on a SDS-PAGE gel (Fig. 1). The proteins were then identified using mass spectrometry as above.

TP1 production and purification

TP1 cDNA has been cloned in pET 28 vector. TP1 expression was induced by 2mM IPTG for 1h at 37°C, at an OD of 0.7.

The purification of TP1 takes advantage of the extreme basic property of this protein, which is soluble at very low pH. Acid soluble proteins are extracted directly from the cell pellet by sonication in Perchloric Acid 5%, followed by a 30 min incubation on ice. Extracts are centrifuged at 5,000 x g during 10 min at 4°C, and soluble proteins are precipitated by adding TriChloro Acetic acid (TCA) at a final concentration of 20%. An incubation of 30 min on ice is followed by a centrifugation at 5,000 x g during 10 min at 4°C. The pellet is washed in acidified acetone (acetone HCl 0.01%), and then in acetone. The pellet is quickly dried, and protein are resuspended in H₂O, aliquoted and stored at -80°C.

Preparation of the resin coated by TP1

TP1 was crosslinked to CNBr activated agarose beads (GE Healthcare) following manufacturer's instructions. Briefly, 1.5 g of dried resin is resuspended and activated with 300 mL of HCl 1mM. The resin is then washed in the coupling buffer (NaCl 0.5M NaHCO₃ 0.1M pH 8.3). Half of the resin is incubated for 2h at room temperature with a saturating amount of TP1, whereas the other half is incubated with a saturating amount of BSA. The reaction is quenched in Glycine 0.2M pH 8 for 2h at room temperature. Finally, the resin is washed extensively with 2 buffers (Buffer 1: Na Acetate 0.1M pH 4, NaCl 0.5M. Buffer 2: Tris 0.1M pH 8, NaCl 0.5M), and stored at 4°C in Tris 0.1M pH 8, NaCl 0.5M, NaN₃ 0.05%).

Preparation of nuclear extracts from sonication resistant spermatids for TP1 chromatography

Sonication resistant spermatids were resuspended in the extraction buffer 1 (EB1, Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, NP-40 1%, Deoxycholic acid 0.5%, SDS 0.1%, DTT 1mM and Protease

inhibitor Cocktail Complete [Roche]). Cells were briefly sonicated in EB1, incubated 15 min on ice, followed by a centrifugation of 10 min at 4°C at 10,000 x g. The supernatant is saved (see below) and remaining proteins are extracted from the pellet following the same procedure and using EB2 (same as EB1, except for NaCl 1.2 M). Similar extracts in EB1 and EB2 are mixed, and NaCl concentration is adjusted to 150 mM final using EB0 (similar to EB1 but no NaCl).

Preparation of nuclear extracts from sedimentation fractionated round, elongating/condensing spermatids for TP1 chromatography

Nuclear extracts from fractions enriched in spermatogenic cells were obtained by sonication of the nuclei in EB1, followed by an incubation of 15 min on ice and a centrifugation of 10 min at 10,000 x g at 4°C. Supernatant contains the soluble proteins.

Purification of TP1 interacting proteins

Resins, coated respectively with BSA or TP1, were pre-washed extensively in EB1. Protein extracts were then incubated with the resins for 2 h at 4°C under agitation. Beads were extensively washed in EB1. Bound proteins were eluted with gel loading buffer and analyzed by SDS-PAGE.

Acid extraction of proteins from elongating and condensing spermatids

Acid soluble proteins from elongating/condensing spermatids were extracted in sulfuric acid at 0.2N (as described in [Govin et al. 2006]. supp. Material).

Acid extraction

Proteins were extracted by direct sonication of spermatogenic cells in sulphuric acid (0,2 N). After 30 min on ice, acid soluble proteins were recovered by centrifugation at 20,000 g for 15 min at 4°C followed by trichloroacetic acid precipitation (at 20% final). Precipitated proteins

were washed in acetone HCl 0.05% and then in acetone, and resolubilized in H₂O, trichostatinA (TSA) 300nM and antiprotease cocktail Complete (Roche). The quality of extraction was controlled by SDS-PAGE gel stained with Coomassie.

Protein identification by mass spectrometry (as described in (Govin et al. 2006) supp. Material).

Protein identification by mass spectrometry

After separation by SDS-PAGE, discrete bands were excised from the Coomassie blue-stained gel. The in-gel digestion was carried out and gel pieces were then sequentially extracted with 5% [v/v] formic acid solution, acetonitrile 50%, formic acid 5% [v/v] and acetonitrile.

For MALDI-TOF-MS analyses, a 0.5µL aliquot of peptide mixture was mixed with 0.5µL matrix solution (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid at half saturation in 60% acetonitrile / 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v)). The resulting solution was automatically spotted on the target plate. After drying, the sample was rinsed with 2µL of 0.1% TFA.

Peptides mixtures were then analysed with a MALDI-ToF mass spectrometer (Autoflex, Bruker Daltonik, Germany) in reflector/delayed extraction mode over a mass range of 0 - 4200 Da. For each sample, the spectrum acquisition was performed after an external calibration using a mixture of four synthetic peptides (Angiotensin II, m/z 1046.54 Da; Substance P, m/z 1347.74 Da; Bombesin, m/z 1619.82 Da and ACTH clip18-39, m/z 2465.20 Da). Spectra displaying the best peak intensities and resolutions were automatically saved and subsequently annotated (XMass software, Bruker Daltonik). All peptide masses were assumed to be monoisotopic and $[M+H]^+$ (protonated molecular ions). For Mascot database searching the maximum number of missed cleavages was set to 1 and the mass tolerance was limited to ± 100 ppm. In most cases, proteins showing a score higher than 70 and an average

coverage of 20% were automatically validated. When proteins exhibited scores lower than 70 and coverage lower than 20%, a manual inspection of the data was needed: if no or unclear identification is obtained after a MALDI-ToF analysis, the sample was submitted to a nano-LC-MS/MS analysis.

For LC-MS/MS analyses, after drying, tryptic peptides were resuspended in 0.5% aqueous trifluoroacetic acid. The samples were injected into a CapLC (Waters) nanoLC system and first preconcentrated on a 300µm X 5 mm PepMap C18 precolumn. The peptides were then eluted onto a C18 column (75 µm X 150mm). The chromatographic separation used a gradient from solution A (2% acetonitrile: 98% water: 0.1% formic acid) to solution B (80% acetonitrile: 20% water: 0.08% formic acid) over 35 or 60 min at a flow rate of 200 nL/min. The LC system was directly coupled to a QTOF Ultima mass spectrometer (Waters). MS and MS/MS data were acquired and processed automatically using MassLynx 4.0 software. Mascot was used for database searching and proteins, which were identified with at least 2 peptides showing both a score higher than 40, were validated without any manual validation. For proteins identified by only 1 peptide having a score higher than 40, the peptide sequence was checked manually. Peptides, with scores higher than 20 and lower than 40, were systematically checked and/or interpreted manually to confirm or cancel the MASCOT suggestion.

For both MALDI and LC-MS/MS data, database searching was carried out using the MASCOT 2.0 program available intranet. Two databases were used: a home-made list of well-known contaminants (keratins and trypsin) and an updated compilation of SwissProt and Trembl databases (ftp://us.expasy.org/databases/sp_tr_nrdb/) specifying Mus as the species. For searching the Mus database the variable modifications allowed were: acetyl lysine, N-ter acetylation, dimethyl lysine, methyl lysine, protein N-acetylation, methionine oxidation, serine and threonine phosphorylation, methionine sulphone and cysteic acid.

TP2 immunoprecipitation (IP) from testis soluble protein extract

TP2 was immunoprecipitated using anti TP2 goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) from whole testis extract (C57BL/6). Immunoprecipitation and wash were performed with buffer HEPES 50mM pH8, MgCl₂ 3mM, KCl 500mM, Glycérol 20%, NP40 1%, Complete Protease inhibitor Roche. Bound proteins were resolved on 4-12% Bis-Tris SDS PAGE (NuPAGE Precast gel, Invitrogen), transferred on nitrocellulose membrane (Hybond C extra, GE), and probed with anti TP2 goat polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology) and HSP70.2 (gift from Dr Eddy). Immunoprecipitation with goat serum served as control.

Results

Purification of new potential genome-packaging proteins from post-meiotic male germ cells and their putative chaperones

In order to tackle the issue of the comprehensive identification of proteins relevant to the final packing of the male genome and the establishment of its associated epigenome, we sought a strategy based on the identification and characterization of two pools of proteins from male mouse post-meiotic germ cells (outlined in Fig 1).

First, we focussed our attention on an acid soluble fraction from post-meiotic cells at different stages. Acid extracts contain all the DNA-packaging proteins such as histones and sperm-specific non-histone proteins such as TPs and Prms (Govin et al. 2006). This fraction is therefore susceptible to contain additional yet uncharacterized DNA-packaging proteins.

The second pool of interest is that of acidic proteins, which could encompass chaperones involved in the assembly or disassembly of the genome-organizing proteins. An ion-exchange chromatography is normally used to retain and fractionate acidic proteins from an extract. In our case, we designed a new chromatography strategy to combine both the ion-exchange principle and that of affinity purification, by preparing a column filled with TP-coated beads. TPs' highly basic charge is enough to retain major acidic proteins and act as a cation-exchange support, and additionally, it also allows the retention of proteins in the extract with particular affinity for TPs.

In total, seventy proteins were found as the result of the proteomic identifications carried out in the extracts, including 46 found in the acid soluble extract of elongating/condensing spermatids and 29 in the TP1 chromatography experiments (listed in Table 1, complementary information in Supp. Tables S1, S2 and S3, respectively detailing, for each factor, the

identification approach (Supp. Table S1), the peptide sequences and Mascot scores (LC MSMS, Supp. Table S2), and the sequences peptides (MALDI, Supp. Table S3)). Five proteins were found in both the acid soluble extracts as well as in the TP1 chromatography experiments (indicated in red in Table 1).

Identification of male germline expressed proteins involved in post-meiotic genome organizations

Because of the very unique nature of genome reorganizations taking place in the post-meiotic phases of spermatogenesis, we wished to focus our attention on the testis-expressed proteins of our list. We have consequently set up a strategy to rapidly assess the expression pattern of factors based on the analysis of the expression of the corresponding genes in normal adult mouse tissues. For this purpose, we exploited transcriptomic data for normal mouse tissues available in GEO (Gene Expression Omnibus: GSE10744 and GSE9954). Transcriptomic data were available for 65 genes, of which 11 had levels of expression similar in all tissues, but 54 had a predominant expression in one particular tissue. Twenty-two genes showed a predominant expression in testis, and for 16 of them only testis ESTs were found, suggesting a restricted expression in testis. Another 10 genes were predominantly expressed in Embryonic Stem (ES) cells (Fig 2a).

Because our candidate factors of interest are expected to act more specifically during post-meiotic phases, we have also considered the stage-specific pattern of their expression to identify the ones, which are predominantly expressed in haploid cells. This time transcriptomic data (GSE21749 and GSE4193) from male germinal cells taken at different stages of spermatogenesis, including spermatogonia, spermatocytes and spermatids were analysed in the same way as above. The data obtained show that a majority of the genes of the

lists are predominantly expressed in post-meiotic cells, particularly the testis genes of which $\frac{3}{4}$ are post meiotic genes (Fig 2b).

Table 1 shows the detailed results of the expression analysis of our list of proteins, which pinpoints a group of proteins of high interest regarding their possible function in the post-meiotic male genome reorganization.

Functional annotations of the identified proteins

We completed the assessment of our protein list by defining functional categories using the gene ontology terms available for these factors (Fig 3a). As expected, a large majority of the factors identified in the acid soluble extract belonged to the histone family or non-histone small basic proteins, whereas the most represented proteins in the TP1 pull down extracts are chaperones or stress related factors.

Interestingly the identity of eleven proteins, including 2 shared by both experiments the H₂SO₄ soluble extract and the TP1 column, revealed that they belong to the chaperone functional category. HSPA.2, a testis-specific member of heat shock protein, was found in both preparations. Previously we had identified HSPA.2 as an acidic protein, which was systematically solubilized with TPs in acid solutions and proposed that it could act as a chaperone for TPs (Govin et al. 2006). Here we also found HSPA.2 as a protein retained on our TP-chromatography column highlighting the fact that, independent of its negative charge, the proteins may present a specific affinity for TPs. Since we now have access to a very good anti-TP2 antibody, we decided to prepare soluble testis extracts containing in principle non assembled TPs and to use it for an immunoprecipitation to definitely show that HSPA.2 is actually chaperoning soluble TP2. Figure 3b shows the efficient co-immunoprecipitation of HSPA.2 with TP2 in the soluble extracts while only background signal was observed when the same amount of an irrelevant antibody was used. This experiment also suggests that all

TP2 is not associated with HSPA2, since the latter is not visible on the Coomassie gel while TP2 can clearly be identified.

It is of note that, like HSPA.2, other stress factors identified here may in fact also be chaperones for the very basic DNA-packaging proteins expressed in the post-meiotic phases and therefore could generalize the role of the stress chaperones in the assembly of genome organizing structures.

Assessment of known and putative functions reveals a network of proteins involved in the haploid male genome packaging structures and their assembly

In order to unravel a functional hierarchy between the post-meiotic proteins of interest, a search for networks using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software was performed. IPA enables an integrated analysis of the data of the literature of genes and proteins of three species, including human, mouse and rat, as well as of various molecules, for a given list of factors/molecules. Based on these data, it classifies them into functional categories, finds links between them and establishes networks and pathways. Interestingly the network, which came out with the highest significance, is named “Cellular Development, Reproductive System Development and Function, Organismal Development” and is linking the histone and histone-like proteins with the chaperones present in the extracts (Fig 4). This observation highlights and confirms that, at this stage of our knowledge, many of the factors identified are indeed very excellent candidates for being either the structural proteins or their chaperones involved in the male genome post-meiotic re-structuration.

Discussion

Four chaperones, NASP, Nap1L4, HSPA.2 and NPM3 appear to constitute a central node in the assembly of post-meiotic nucleosomal and non-nucleosomal DNA-packaging structures. Our previous work had previously indicated a role for HSPA.2 in chaperoning TPs ((Govin et al. 2006), see Fig4 interaction #14). Here we could not only confirm this finding but also place other important chaperones in the heart of these genomic organizations. For instance, an interaction between cofilin1 (Cfl1), identified in our study among the TP1 binding post meiotic proteins, and H2A.X, present in the acido-soluble fraction of post-meiotic spermatids, has been reported in hepato-carcinoma cells (Fig 4: interaction #13, (Yang et al. 2010)), suggesting that cofilin1 could also interact with H2A.X in post-meiotic cells and probably other histone and non-histone DNA-packaging proteins. Moreover, the presence of acidic chaperones in the acido-soluble fraction, such as hspa.2 (pi=5.5), Tcp1 (pi=5.8), cct3 (pi=6.3) and npm3 (pi=4.7), in post-meiotic cells suggests a strong interaction between them and some of the basic proteins. It is interesting to note that at the stages considered no replication coupled chromatin assembly takes place and that the chaperon identified are either involved in the assembly of nucleosomes with particular histone variants expressed in these cells or involved in the genome-wide nucleosome disassembly.

Hence this work reveals that the major constituents of the nuclear proteome of post-meiotic cells include:

- (i) A variety of DNA binding proteins, responsible for the heterogeneous nature of the sperm genome, and which provide a molecular basis of the male epigenome establishment conveying the epigenetic information which will be transmitted to the embryo

- (ii) Factors interacting with these proteins, which could play a major role in the incorporation of specific DNA binding proteins to specific regions of the male genome, among which a large proportion of factors with known chaperone activity.

This work also opens the possibility that these chaperones ensure new functions in post-meiotic cells, similar to HSPA2 (Govin et al. 2006; Quenet et al. 2008), by chaperoning testis-specific DNA-packaging proteins. Indeed, the proteins with known and putative chaperone activity identified in this study represent new candidate factors, which could play a central role in the post-meiotic histone to protamine transitions as well as in targeting histone variants and non-histone proteins to specific genomic regions. They could therefore be considered as important new “fertility genes”.

Interestingly several of the factors identified here in mouse elongating/condensing spermatids are the mouse homologs to proteins recently identified in the human sperm proteome by (de Mateo et al. 2011) (as shown in the last column of Table 1), supporting the relevance of this list of important constituents of the mature sperm nucleus and potential human fertility factors. However, it should be stressed that the factors of our list whose homologs were not found in proteomic analyses of the mature human sperm probably also have human homologs playing important roles during post-meiotic genome re-organizations, but disappearing before the completion of spermiogenesis. This is for instance the case for transition proteins, which are normally absent from mature spermatozoa.

Altogether the identified factors constitute a new source of male fertility factors, which are involved not only in producing mature spermatozoa but also in shaping and organizing the paternal genome, an essential step required for successful embryo development after fertilization. Therefore a defect in one or several of these factors not only could cause male

infertility but could also be associated with early development failure after ICSI. Investigating their function and their potential contribution to successful development would significantly enhance our capability of understanding and circumventing male infertility.

Authors contributions

J. Govin performed all the purification experiments and contributed to the analyses and validation experiments. J. Gaucher contributed to validation experiments. MF designed and performed the proteomic analyses, in J. Garin's laboratory. AD performed the expression data analyses. SK and SR initiated the project, designed and supervised the experimental strategy, and wrote the manuscript. SR supervised the expression analyses, performed the gene ontology analyses.

Acknowledgements

J. Govin has been supported by programs Excellence Biomédicale and Espoirs de la Recherche from "Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)" and his research received an Agence Nationale pour la Recherche (ANR) funding; J. Gaucher received grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and Region Rhone-Alpes; SK and J. Garin labs research is supported by INCa-DHOS funding, and SK's research by ANR "Episperm 1&2" and ARC.

References

- Alekseev OM, Richardson RT, O'Rand MG (2009) Linker histones stimulate HSPA2 ATPase activity through NASP binding and inhibit CDC2/Cyclin B1 complex formation during meiosis in the mouse. *Biol Reprod* 81: 739-48
- Alekseev OM, Widgren EE, Richardson RT, O'Rand M G (2004) Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: Stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *J Biol Chem*
- Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D (2009) Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res* 19: 1338-49
- Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schubeler D, Stadler MB, Peters AH (2010) Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 17: 679-87
- Caron C, Govin J, Rousseaux S, Khochbin S (2005) How to pack the genome for a safe trip. *Prog Mol Subcell Biol* 38: 65-89
- de Mateo S, Castillo J, Estanyol JM, Ballesca JL, Oliva R (2011) Proteomic characterization of the human sperm nucleus. *Proteomics* 11: 2714-26
- Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *Embo J* 26: 720-9
- Gardiner-Garden M, Ballesteros M, Gordon M, Tam PP (1998) Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Mol Cell Biol* 18: 3350-6.
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW (1987) Sequence-specific

- packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236: 962-4
- Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM (1990) Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem* 265: 20662-6
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S (2010) From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 277: 599-604
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, Eddy EM, Garin J, Khochbin S (2006) Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 281: 37888-92
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, et al. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 176: 283-94
- Gusse M, Chevaillier P (1980) Electron microscope evidence for the presence of globular structures in different sperm chromatins. *J Cell Biol* 87: 280-4
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460: 473-8
- Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, Muller CH, Walsh TJ (2011) The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 95: 1141-5
- Lewis JD, Abbott DW, Ausio J (2003) A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 81: 131-40
- Maggiulli R, Neri QV, Monahan D, Hu J, Takeuchi T, Rosenwaks Z, Palermo GD (2010)

- What to do when ICSI fails. *Syst Biol Reprod Med* 56: 376-87
- Marushige Y, Marushige K (1978) Methods for isolation of nuclei from spermatozoa. *Methods Cell Biol* 17: 59-73
- Oliva R, Martinez-Heredia J, de Mateo S, Gazquez C, Oriola J, Estanyo JM, Guimera M, Balasch J, Ballesca JL (2007) Proteomics of human spermatozoa, protamine content and assisted reproduction outcome. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65: 527-30
- Osakabe A, Tachiwana H, Matsunaga T, Shiga T, Nozawa RS, Obuse C, Kurumizaka H (2010) Nucleosome formation activity of human somatic nuclear autoantigenic sperm protein (sNASP). *J Biol Chem* 285: 11913-21
- Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z (2009) ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med* 27: 191-201
- Pittoggi C, Renzi L, Zaccagnini G, Cimini D, Degraffi F, Giordano R, Magnano AR, Lorenzini R, Lavia P, Spadafora C (1999) A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J Cell Sci* 112: 3537-3548
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S (2003) Acetylation-Dependent Chromatin Reorganization by BRDT, a Testis-Specific Bromodomain-Containing Protein. *Mol Cell Biol* 23: 5354-65
- Pradeepa MM, Nikhil G, Hari Kishore A, Bharath GN, Kundu TK, Rao MR (2009) Acetylation of transition protein 2 (TP2) by KAT3B (p300) alters its DNA condensation property and interaction with putative histone chaperone NPM3. *J Biol Chem* 284: 29956-67
- Quenet D, Gasser V, Fouillen L, Cammas F, Sanglier-Cianferani S, Losson R, Dantzer F (2008) The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor

- TIF1beta and the heterochromatin protein HP1alpha. *FASEB J* 22: 3853-65
- Richardson RT, Batova IN, Widgren EE, Zheng LX, Whitfield M, Marzluff WF, O'Rand MG (2000) Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *J Biol Chem* 275: 30378-86.
- Rodriguez P, Munroe D, Prawitt D, Chu LL, Bric E, Kim J, Reid LH, Davies C, Nakagama H, Loebbert R, et al. (1997) Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics* 44: 253-65
- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, et al. (2005) Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 437: 1173-8
- Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116: 51-61
- Wu F, Caron C, De Robertis C, Khochbin S, Rousseaux S (2008) Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *J Reprod Dev* 54: 413-7
- Wykes SM, Krawetz SA (2003) The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 278: 29471-7
- Yang J, Medvedev S, Reddi PP, Schultz RM, Hecht NB (2005) The DNA/RNA-binding protein MSY2 marks specific transcripts for cytoplasmic storage in mouse male germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1513-8
- Yang X, Zou P, Yao J, Yun D, Bao H, Du R, Long J, Chen X (2010) Proteomic dissection of cell type-specific H2AX-interacting protein complex associated with hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 9: 1402-15

Figure Legends

Fig. 1 Identification of factors involved in post-meiotic male genome re-organization by proteomic analysis: outline of the strategy

Cells at different stages of spermatogenesis were processed on two complementary pipelines. First, acid soluble proteins were purified and analyzed by mass spectrometry (MS). Second, nuclear extracts were loaded on a chromatography column, coated with TP1 protein (TP). A control column coated with BSA was used as a control (Ct). Proteins specifically bound to TP1 were eluted, and analyzed by SDS PAGE (see gel). They were identified by mass spectrometry. Identification results from the two approaches were pooled, and the corresponding factors were assessed for i/ their pattern of expression in normal tissues to identify those with a predominant or restricted expression in male germ cells and those highly expressed in post-meiotic cells ii/ functional categories and network using Ingenuity pathways analysis (IPA). This information was used to generate maps of a functional network of proteins involved in the reorganization of chromatin during the post meiotic differentiation of sperm.

Fig.2 Expression of the identified factors in normal somatic and germinal tissues: results of a meta-analysis of transcriptomic data available online show the pattern of expression of the corresponding genes in normal mouse tissues (a: histogram and c: heatmap) and during spermatogenesis (b: histogram and d: heatmap); in a: “ES” = embryonic stem cells, “NS” = no predominant expression; in b: gonias = spermatogonia, Spc = spermatocytes, RS = round spermatids.

Fig.3 Nature of the identified proteins : the nuclear proteome of post-meiotic cells identifies histones and non-histone DNA binding proteins and other factors, including chaperone proteins. (a) functional categories of the identified genes defined using the Gene Ontology

terms; HMG = High Mobility Group, TP = transition proteins, Prm = protamines; (b) TP2 immunoprecipitation (IP) from testis soluble protein extract: showing an interaction between HSP70.2 and TP2. Coomassie shows TP2 protein, Ig Heavy Chains (H) and Low Chains (L).

Fig4. Interaction networks based on Ingenuity pathway analysis:

Known and putative interactions between histones and non-histone DNA binding proteins on the one hand (right side of the diagram), and factors with chaperone activities on the other hand (left side of the diagram). This representation was based on an Ingenuity Pathways analysis (showing the most significant network obtained when Ingenuity was interrogated with the total list of 72 genes obtained from our experiments, entitled “Cellular Development, Reproductive System Development and Function, Organismal Development”) and completed by our own bibliographic and functional data knowledge.

Left side of the diagram: the chaperones and chaperone-like factors are represented in the orange dotted rectangle.

Right side of the diagram: the linker and core histones are represented respectively within bright and dark green rectangles, high mobility group (HMG) factors are in a grey rectangle and testis-specific basic proteins are grouped in the blue rectangle.

Lines of different colours between factors represent several types of interactions described in the literature, and listed below. The numbers in brackets correspond to those associated with the links between factors on the figure and below the words in *italics* are the names of the experimental techniques which have enabled discovering the interactions.

1- Protein-Protein interactions detected by Ingenuity analysis between proteins of the chaperone categories and DNA binding proteins (linker or core histones, HMG family and testis specific basic proteins) (red lines)

(1) (3) (5) (6) (7) (Richardson et al. 2000): *Pull down, anti bait coimmunoprecipitation, reverse-phase high pressure liquid chromatography (RP HPLC)*

(2) (Rual et al. 2005): *two-hybrid assay*; (2) (Osakabe et al. 2010): *pull down*.

(4) (Alekseev et al. 2004): *Immunoblot*

(8) (9) (10) (11) (Rodriguez et al. 1997): *pulldown assays*

(12) (Pradeepa et al. 2009): *affinity chromatography; pulldown assay*

(13) (Yang et al. 2010): *anti tag coimmunoprecipitation*

2- Protein-Protein interactions found in the literature between proteins of the chaperone categories and DNA binding proteins (histones or testis specific basic proteins); two interactions were added to the IPA network (purple lines):

(14) (Govin et al. 2006): interaction between the chaperone HSPA70.2 and transition protein TP2 in male germ cells; this interaction is also shown in the *immunoprecipitation* experiments of Fig 3b

(15) (Tagami et al. 2004): NASP belongs to CAF1 and HIRA complexes respectively interacting with the core histones H3.1 and H3.3.

3- Interactions detected by Ingenuity analysis between proteins of the chaperone categories and RNA of testis specific basic proteins (grey arrows)

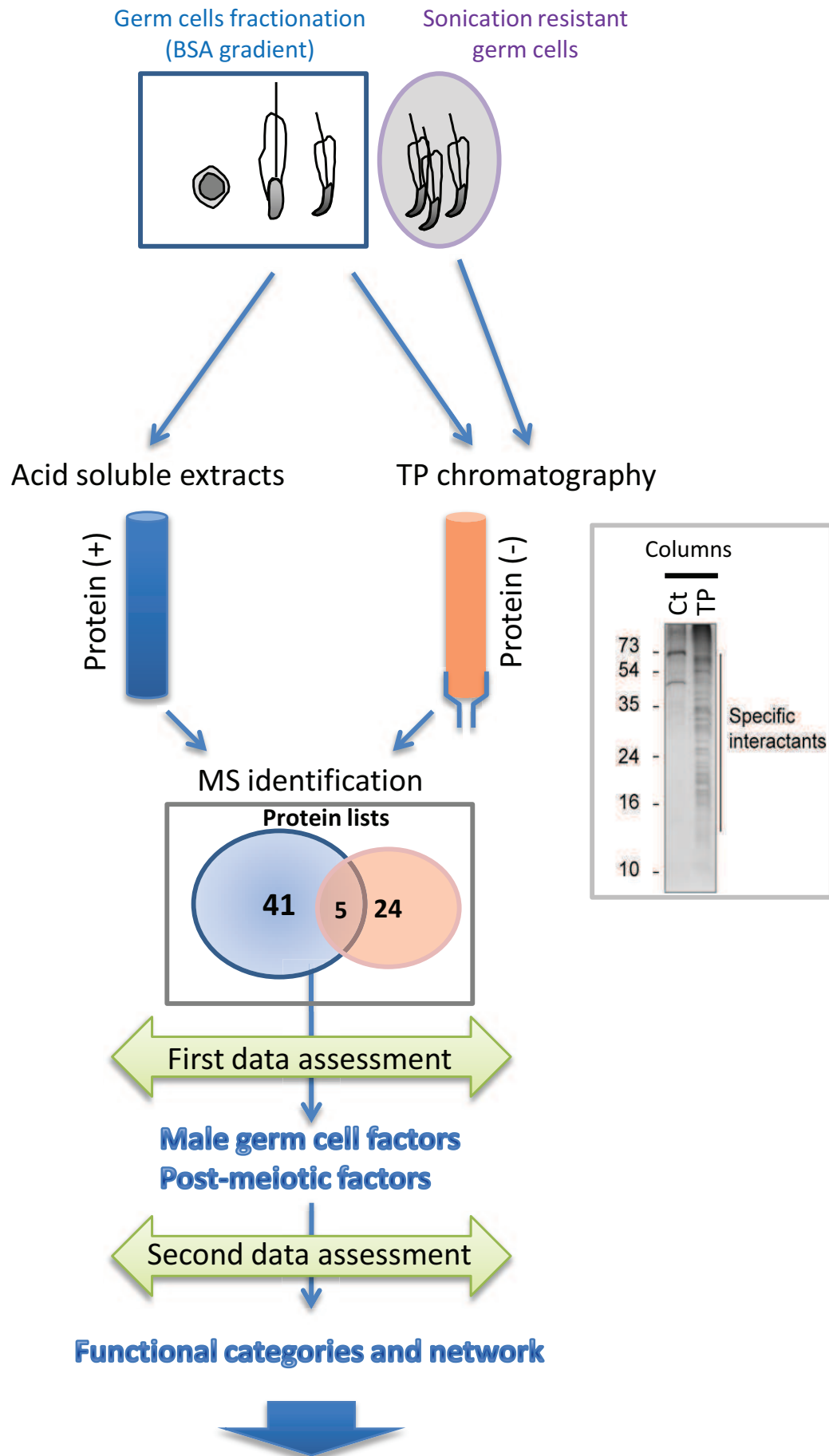
(16) (17) (Yang et al. 2005): *Immunoprecipitation and suppression subtractive hybridization*

4- Interaction detected by Ingenuity analysis between chaperone proteins Hspa.2 and Nasp (dark blue line)

(18) (Alekseev et al. 2009): *affinity chromatography and pull down assays*

The dotted red lines represent putative interactions, which remain to be investigated.

Fig1



Functional interactions in post meiotic cells

Fig2

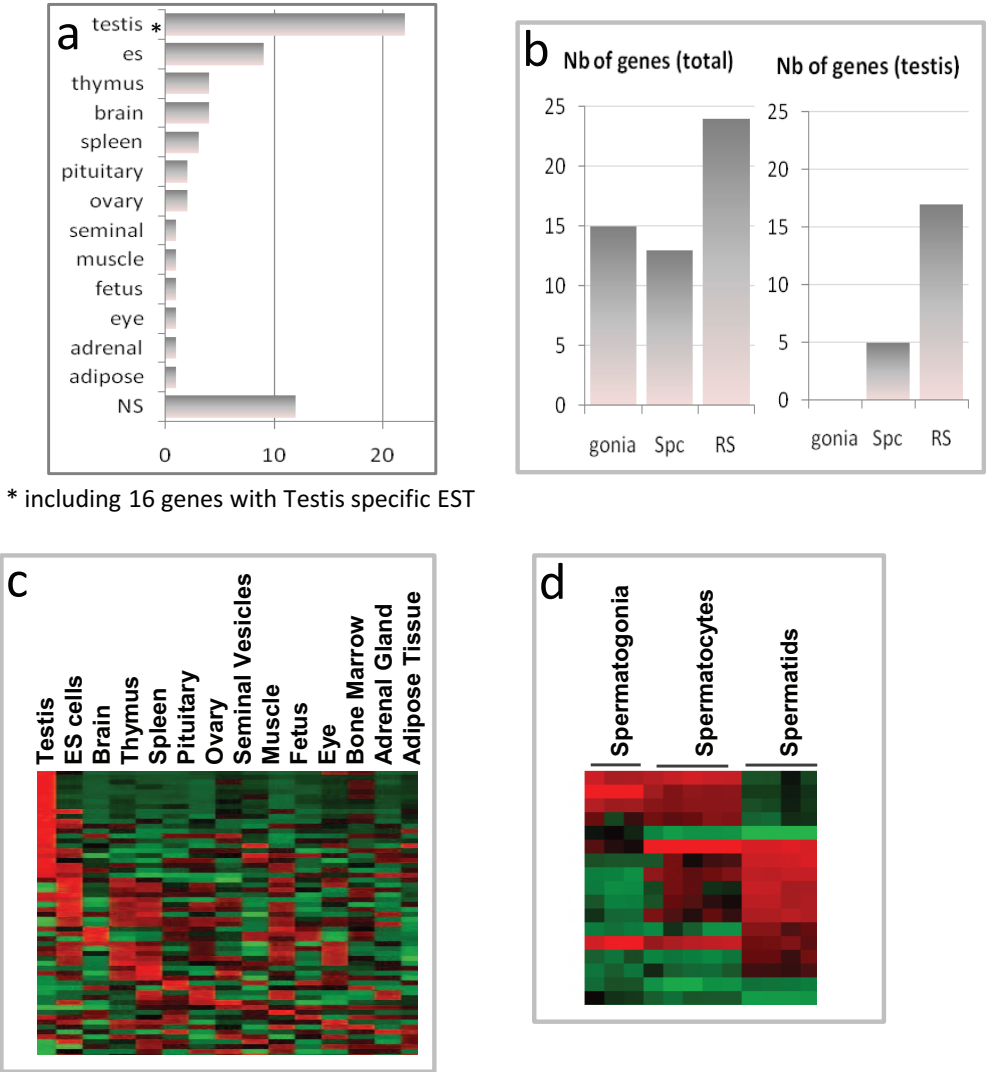


Fig3

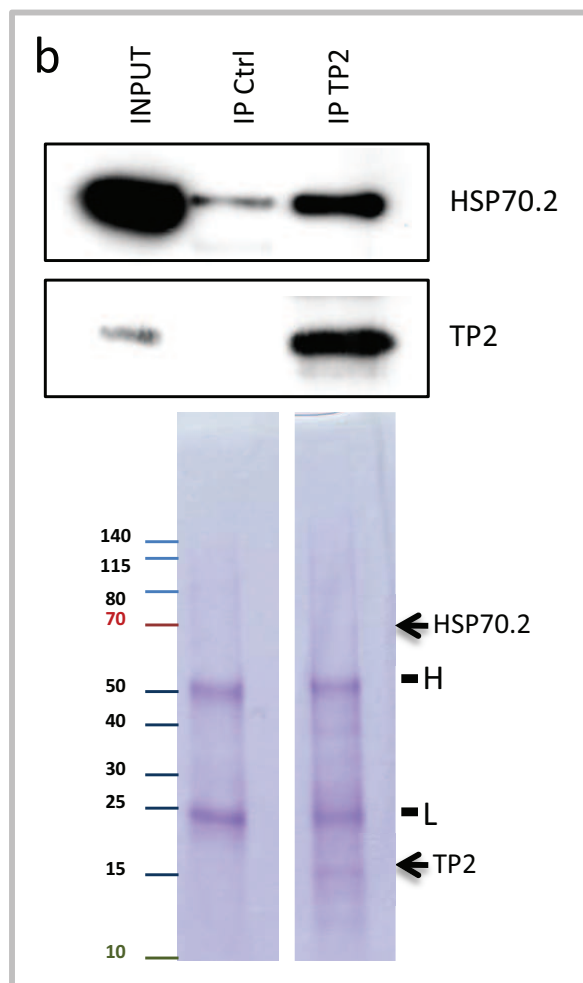
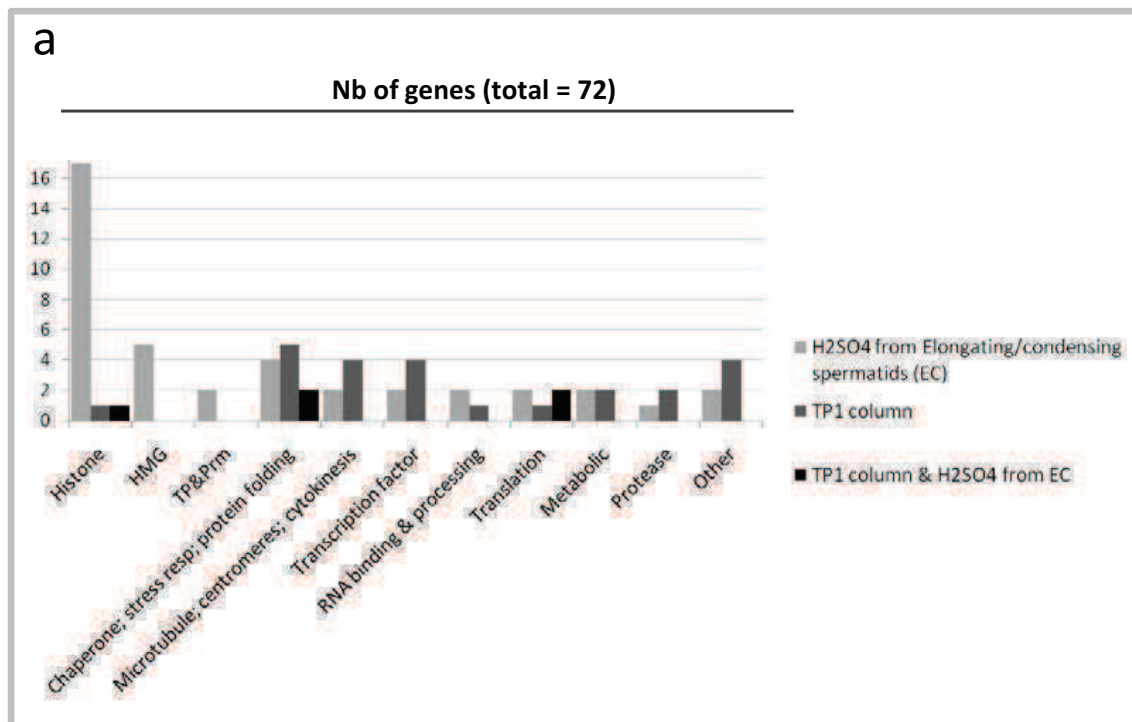


Fig4

Ingenuity 1st network: Cellular Development, Reproductive System Development and Function, Organismal Development

PDNetwork 1

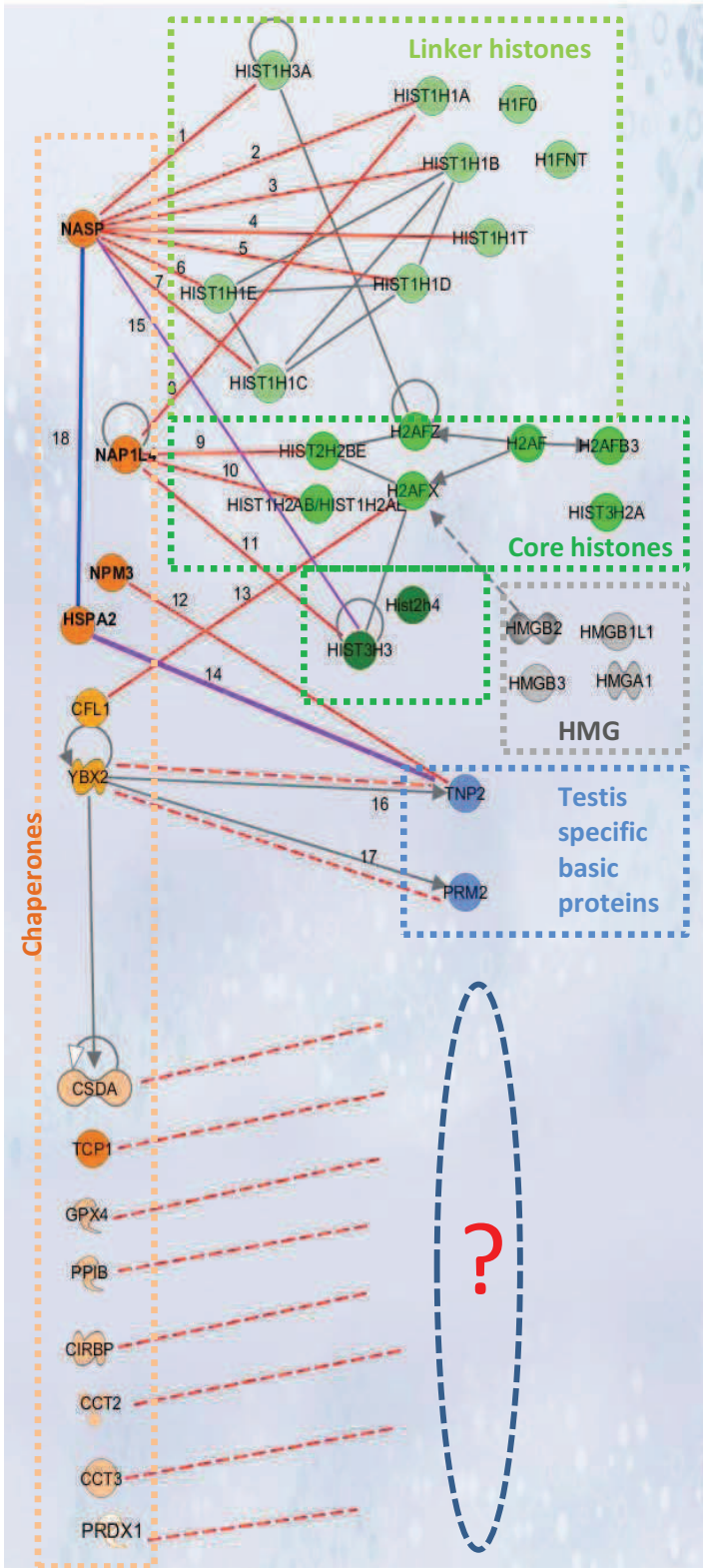


Table 1: List of proteins identified by proteomic analysis of acid soluble extracts from elongating and condensing spermatids (H2SO4 from EC) and/or transition proteins chromatography (TP1 column)

Approach for purification	Swissprot/Trembl	Entrez Gene ID	Gene Symbol_ID	Chromosome	Site of predominant expression	Testis specific EST	Maximum expression during spermatogenesis	MW (kDa)	Isoelectric point	Functional categories (Gene Ontology terms)	
										Networks_IPA	Symbol_IPA
TP1 column_&H2SO4 from EC	Q99KD7	15512	Hspa2	chr12	testis	yes	Meiotic	69.60	5.5	Chaperone; stress resp; protein folding	1 HSPA2
TP1 column	TBA3	22144	Tuba3a	chr6	testis	yes	Meiotic	49.93	5.0	Microtubule; centrosome	2 TUBA3C/TUBA3D
TP1 column	Q9Z2C8	53422	Ybx2	chr11	testis	yes	Meiotic	38.25	11.0	Cytokinesis Transcription factor	1 YBX2
H2SO4 from EC	Q9CWH6	73677	PsmA8	chr18	testis	yes	Meiotic	27.87	8.8	Protease	3 PSMA8
H2SO4 from EC	P00342	16833	Ldhc	chr7	testis	yes	Post-Meiotic	35.78	8.4	Metabolic	2 LDHC
H2SO4 from EC	P07978	19119	Prm2	chr16	testis	yes	Post-Meiotic	13.64	12.1	TP&Prm	1 PRM2
H2SO4 from EC	P11378	21959	Tnp2	chr16	testis	yes	Post-Meiotic	13.13	11.8	TP&Prm	1 TNP2
TP1 column	TBA8	53857	Tuba8	chr6	testis	yes	Post-Meiotic	50.02	5.0	Microtubule; centrosome	2 TUBA8
H2SO4 from EC	NP_083864	68231	1700113017Rik	chr2	testis	yes	Post-Meiotic	12.10	10.5	Cytokinesis Histone	1700012104Rik
H2SO4 from EC	Q9DAR4	69317	Hmgb4	chr4	testis	yes	Post-Meiotic	21.63	9.9	HMG	
H2SO4 from EC	Q9D9Z7	69382	1700024P04Rik	chr13	testis	yes	Post-Meiotic	14.00	10.3	Histone	

H2SO4 from EC	Q9DA62	69423	1700019M22Rik	chr12	testis	yes	Post-Meiotic	13.15	10.5	Other	2	1700019M22Rik/RP23-438H3.2
H2SO4 from EC	Q8CJ4	70069	H1fnt	chr15	testis	yes	Post-Meiotic	44.38	11.7	Histone		H1FNT
H2SO4 from EC	Q9CX54	73139	Cenpv	chr11	testis	yes	Post-Meiotic	27.48	9.9	Microtubule, centromere	2	CENPV
TP1 column	Q9DCR1	227613	Tubb2c	chr2	testis	yes	Post-Meiotic	34.12	4.8	Microtubule, cytokinesis	2	TUBB2C
H2SO4 from EC	Q8C1R9	100042663	1700003E24Rik	chrX	testis	yes	Post-Meiotic	8.70	10.4	Microtubule, cytokinesis		
TP1 column_&H2SO4 from EC	TCP2	21454	Tcp1	chr17	testis	no	Meiotic	60.41	5.8	Chaperone; stress resp; protein folding	2	TCP1
TP1 column	Q99MD9	50927	Nasp	chr4	testis	no	Post-Meiotic	83.77	4.4	Chaperone; stress resp; protein folding	1	NASP
TP1 column	Q80WG4	56449	Csda	chr6	testis	no	Post-Meiotic	38.79	9.7	Transcription factor	1	CSDA
TP1 column	NRDC	230598	Nrd1	chr4	testis	no	Post-Meiotic	132.80	4.8	Protease	3	NRD1
TP1 column	Q88FU2	319162	Hist3h2a	chr11	testis	no	Post-Meiotic	14.12	11.1	Histone	3	HIST3H2A
TP1 column	Q91XR9	625249	Gpx4	chr10	testis	no	Post-Meiotic	29.25	10.2	Chaperone; stress resp; protein folding	1	GPX4
H2SO4 from EC	P27661	15270	H2afx	chr9	thymus	no	Meiotic	15.01	10.7	Histone	1	H2AFX
H2SO4 from EC	P17317	51788	H2afz	chr3	thymus	no	Meiotic	13.50	10.6	Histone	1	H2AFZ
H2SO4 from EC	P63158	15289	Hmgb1	chr5	thymus	no	Pre-meiotic	24.76	5.6	HMG	4	HMGBl1
H2SO4 from EC	P30681	97165	Hmgb2	chr8	thymus	no	Pre-meiotic	24.16	6.9	HMG	1	HMGb2
TP1 column	Q9CPN9	67373	2210010C04Rik	chr6	spleen	no	Post-Meiotic	26.41	8.2	Protease	5	2210010C04Rik

H2SO4 from EC	AAN10051	319150	Hist1h3b	chr13	spleen	no	Post-Meiotic	15.00	11.1	Histone	1	HIST1H3A
TP1 column_&H2SO4 from EC	Q91V99	14109	Fau	chr19	spleen	no	Pre-meiotic	14.78	10.1	Translation	4	FAU
TP1 column_&H2SO4 from EC	Q9D8N0	67160	Eef1g	chr19	seminal	no	Post-Meiotic	50.06	6.3	Translation	3	EEF1G
TP1 column	Q99LF6	14827	Pdia3	chr2	pituitary	no	Meiotic	56.64	5.9	Other	4	PDIA3
H2SO4 from EC	P43274	50709	Hist1h1e	chr13	pituitary	no	Meiotic	51.85	11.1	Histone	1	HIST1H1E
TP1 column	Q88Q46	70439	Taf15	chr11	ovary	no	Pre-meiotic	58.60	8.5	Transcription factor	4	TAF15
TP1 column	Q8CFQ9	233908	Fus	chr7	ovary	no	Pre-meiotic	52.57	9.4	Transcription factor	3	FUS
TP1 column	DOPD	13202	Ddt	chr10	NS	no	Meiotic	12.94	6.2	Metabolic	3	DDT
TP1 column	O88701	17955	Nap1l4	chr7	NS	no	Meiotic	42.65	4.6	Chaperone; stress resp; protein folding	1	NAP1L4
H2SO4 from EC	Q9CQ70	624957	H2afb3	chrX	NS	no	Meiotic	12.80	11.0	Histone	1	H2AFB3
H2SO4 from EC	P40630	21780	Tfam	chr10	NS	no	Post-Meiotic	27.99	9.7	Transcription factor	1	TFAM
H2SO4 from EC	Q07133	107970	Hist1h1t	chr13	NS	no	Post-Meiotic	21.51	11.7	Histone	1	HIST1H1T
H2SO4 from EC	Q9D0C9	100041230	Hist1h4a	chr13	NS	no	Post-Meiotic	11.00	11.2	Histone	2	Hist2h4
TP1 column	ATPA	11946	Atp5a1	chr18	NS	no	Pre-meiotic	59.72	9.2	Metabolic	2	ATP5A1
H2SO4 from EC	P10126	13627	Eef1a1	chr9	NS	no	Pre-meiotic	50.16	9.1	Translation	2	Eef1a1
H2SO4 from EC	P10922	14958	H1f0	chr15	NS	no	Pre-meiotic	20.73	10.9	Histone	1	H1FO
TP1 column	HBB1	15129	Hbb-b1	chr7	NS	no	Pre-meiotic	15.70	7.3	Other	1	HBB
H2SO4 from EC	P35700	18477	Prdx1	chr4	NS	no	Pre-meiotic	22.18	8.3	Chaperone; stress resp; protein folding	1	PRDX1
H2SO4 from EC	P24369	19035	Ppib	chr9	NS	no	Pre-meiotic	22.71	9.5	Chaperone; stress resp; protein folding	4	PPIB
H2SO4 from EC	P43277	14957	Hist1h1d	na	na	no	na	22.00	11.3	Histone	1	HIST1H1D

H2SO4 from EC	P43276	56702	Hist1h1b	na	na	no	na	22.40	10.9	Histone	1	HIST1H1B
H2SO4 from EC	P43275	80838	Hist1h1a	na	na	no	na	21.65	10.9	Histone	1	HIST1H1A
H2SO4 from EC	P22752	319172	Hist1h2ab	na	na	no	na	14.05	11.5	Histone	1	HIST1H2AB/HIST1H2AE
H2SO4 from EC	P70696	319177	Hist1h2ba	na	na	no	na	14.00	10.3	Histone	4	Hist1h2ba
TP1 column_&H2SO4 from EC	P10853	319180	Hist1h2bf; Hist4h4	chr4; chr6	na	no	na	14.00	10.3	Histone	1	HIST2H2BE
H2SO4 from EC	P62897	672195	Cycs/Gm10053	na	na	no	na	11.47	9.6	Metabolic	1	Cycs/Gm10053
H2SO4 from EC	P15864	50708	Hist1h1c	chr13	muscle	no	Pre-meiotic	21.14	11.0	Histone	1	HIST1H1C
TP1 column	CIRP	12696	Cirbp	chr10	eye	no	Pre-meiotic	18.60	9.6	Chaperone; stress resp; protein folding	4	CIRBP
H2SO4 from EC	P80318	12462	Cct3	chr3	ES cells	no	Meiotic	60.63	6.3	Chaperone; stress resp; protein folding	2	CCT3
TP1 column	P80314	12461	Cct2	chr10	ES cells	no	Post-Meiotic	57.48	6.0	Chaperone; stress resp; protein folding	2	CCT2
H2SO4 from EC	Q9CPP0	18150	Npm3	chr19	ES cells	no	Post-Meiotic	19.02	4.7	Chaperone; stress resp; protein folding	1	NPM3
TP1 column	P25388	14694	Gnb2l1	chr11	ES cells	no	Pre-meiotic	35.08	7.6	Other	4	GNB2L1
H2SO4 from EC	Q924L8	15361	Hmga1	chr17	ES cells	no	Pre-meiotic	11.54	10.4	HMG	4	HMGAI
TP1 column	Q8R081	15388	Hnrnp1	chr7	ES cells	no	Pre-meiotic	60.09	6.7	RNA binding & processing	3	HNRNP1
H2SO4 from EC	P09405	17975	Ncl	chr1	ES cells	no	Pre-meiotic	76.59	4.7	RNA binding & processing	2	Ncl
H2SO4 from EC	O70251	55949	Eef1b2	chr1	ES cells	no	Pre-meiotic	24.58	4.5	processing Translation	3	EEF1B2
TP1 column	Q8C2K0	269261	Rpl12	chr2	ES cells	no	Pre-meiotic	17.80	9.6	Translation	3	Rpl12
H2SO4 from EC	Q9D6G4	12313	Calm1	chr12	brain	no	Meiotic	16.85	4.1	Microtubule; centromeres;	3	Calm1

H2SO4 from EC	P70372	15568	Elavl1	chr8	brain	no	Meiotic	36.07	9.2	RNA binding & processing Transcription factor	4	ELAVL1
H2SO4 from EC	P11031	20024	Sub1	chr15	brain	no	Meiotic	14.30	9.6		1	SUB1
TP1 column	COF1	12631	Cfl1	chr19	brain	no	Pre-meiotic	18.55	8.2	Microtubule; centromere	1	CFL1
H2SO4 from EC	O54879	15354	Hmgb3	chrX	adrenal	no	Pre-meiotic	22.88	8.5	cytokinesis HMG	3	HMGB3
TP1 column	RS18	330267	Thsd7a	chr6	adipose	no	Post-Meiotic	17.71	11.0	Other	4	THSD7A

NS=no predominant expression

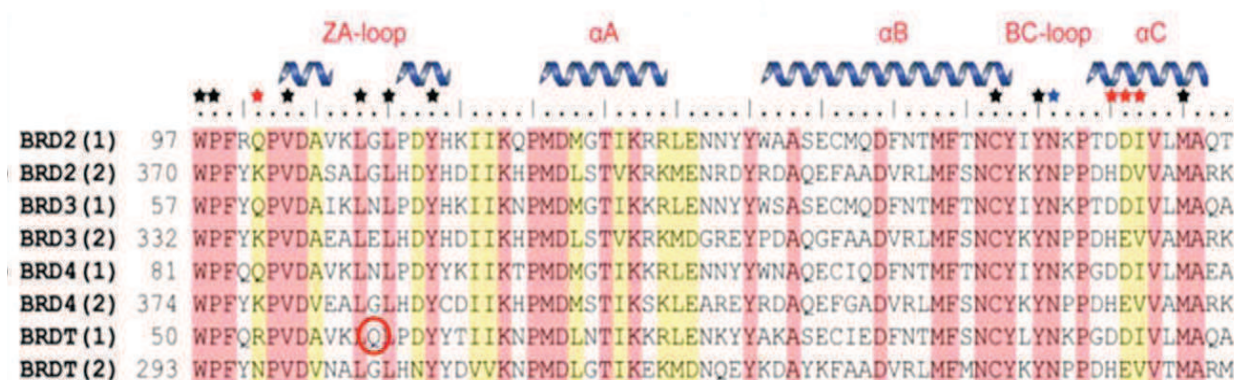
na= data not available

5. BRDT et l'infertilité humaine

- Présentation des recherches en cours

Les études que nous avons menées chez la souris, nous montrent que BRDT joue un rôle essentiel au cours de la spermatogenèse. La perte du premier bromodomaine de cette protéine entraîne une stérilité mâle accompagnée de sévères altérations de la réorganisation post-méiotique de la chromatine. BRDT est très conservée au cours de l'évolution et nous nous sommes demandé si elle pouvait également intervenir dans la fertilité humaine. Pour cela, nous avons recherché des polymorphismes du gène *Brd* parmi une cohorte d'hommes infertiles. Plusieurs variations ont été détectées spécifiquement chez les hommes infertiles. L'une d'entre elles est présente à l'état homozygote chez un patient. Ce polymorphisme est associé à un acide aminé situé à proximité du premier bromodomaine de BRDT. Cependant, cette mutation de la lysine 62 en glutamine (K62Q) n'entraîne pas de changement majeur dans les propriétés d'association et les spécificités des bromodomains de BRDT avec les histones H3 et H4. On note même une légère augmentation globale de l'affinité par rapport au domaine sauvage. Cette protéine compacte également la chromatine de façon comparable à la protéine sauvage. Des études fonctionnelles sont en cours afin de déterminer comment cette mutation pourrait potentiellement altérer les fonctions de BRDT.

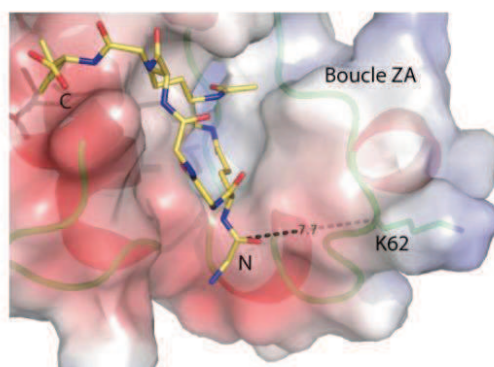
Alignement des séquences protéiques des bromodomains de la famille BET humaine (d'après Filippakopoulos et al., 2010). La mutation K62Q sur le premier bromodomaine de BRDT (1) est entourée en rouge. La structure en hélices alpha (α) et les domaines boucles (loop) des bromodomains sont représentées en bleu.



Comparaison des affinités du premier bromodomaine sauvage et mutant K61Q. (ITC, données Jeanne Morinière)

	BD1 WT (Kd)	BD1-K61Q (Kd)
H4-4ac	28,0 μ M	15,7 μ M
H4-K5/K8ac	21,9 μ M	14,9 μ M
H3-4ac	389 μ M	275 μ M

Position de la lysine K62 sur le premier bromodomaine de BRDT. Structure du premier bromodomaine de BRDT en complexe avec un peptide H4K5acK8ac (données personnelles Jeanne Morinière).



Bromodomain-dependent male infertility

Sophie Rousseaux ^{1,2 *}, Julien Thevenon ^{1,2,3}, Cécile Caron ^{1,2}, Edwige Col ^{1,2}, Anne-Laure Vitte ^{1,2}, Sandrine Curtet ^{1,2}, Jonathan Gaucher ^{1,2}, Sylviane Hennebicq ^{1,2,3}, Anne-Karen Faure ^{1,2,3}, Joel Lunardi ^{2,3}, Pierre-Simon Jouk ^{2,3}, Pierre F. Ray ^{2,3}, Christine Cans ^{2,4}, Rachel Levy ⁵, Isabelle Aknin-Seifer ⁵, Celia Ravel ⁶, Jean-Pierre Siffroi ⁶, Ken Mc Elreavey ⁷, Hervé Lejeune ⁸, Clément Jimenez ⁹, Jeanne Morinière ¹⁰, Christoph Muller ¹⁰, Debra J. Wolgemuth ¹¹, Saadi Khochbin ^{1,2 *}

1- INSERM, U823, Grenoble, F-38706 France.

2- Université Joseph Fourier, Institut Albert Bonniot, Grenoble, F-38706 France

3- Genetics and Procreation Department, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

4 – Service d'Information et d'Informatique Médicale, Grenoble University Hospital, Grenoble, F-38043 France

5 – Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Service de Génétique Moléculaire, CHU-Hopital Nord, Saint Etienne, France ; RL new address: Reproductive Biology lab, Hopital Jean Verdier, 93 143 Bondy, France

6- Université Pierre et Marie Curie Paris-6, EA1533, AP-HP, Hopital Tenon, Paris, France ; JPS new address: Trousseau Hospital, 75 571 Paris Cedex 12, France

7- Reproduction, Fertility and Populations, Institut Pasteur, Paris, France.

8- Service de Médecine de la Reproduction, Hôpital Femme-Mère-Enfant, Bron, F-69677 France

9- Laboratoire de Biologie de la Reproduction, Dijon University Hospital, Dijon, F-21000 France

10- EMBL, 69012 Heidelberg, Germany

11 - Dept. of Genetics and Development and Obstetrics and Gynecology, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA

* Corresponding authors:

Mail : sophie.rousseaux@ujf-grenoble.fr; khochbin@ujf-grenoble.fr

Tel : (33) 4 76 54 95 82/83 ; Fax : (33) 4 76 54 95 95

A deleterious single amino acid change in the first bromodomain of testis-specific double bromodomain factor, BRDT, a critical regulator of post-meiotic acetylation-dependent genome organization, causes human male infertility.

Abstract

BRDT (“BRomodomain Testis-Specific”) is a double bromodomain-containing protein specifically expressed in male germ cells. Functional and mouse genetic studies show that it plays a critical role in the post-meiotic genome organization that follows the massive histone acetylation in elongating spermatids, and that its first bromodomain (BD1) is crucial for this function, since its deletion in mice induces male infertility with severe post-meiotic defects.

Here, a systematic screening of the entire *BRDT* coding sequence in infertile males revealed that a specific sequence polymorphism (A->C), affecting a conserved lysine localized in BD1 (K62Q), was homozygous only in infertile males and not in men with proven fertility.

Functional studies showed that the replacement of the critical K in BD1 by a Q affects the stability of BRDT binding to acetylated chromatin. This is the first recessive autosomal genetic defect found in infertile men, which directly alters the function of an important post-meiotic chromatin re-organizer.

Text

About one in six couples attempting pregnancy encounter fertility problems, and defective sperm parameters demonstrate a male contribution in half of them. However, a specific cause is often not found, and so far only very few genes were proven directly involved in male infertility ((1-4), for review see (5-8)).

During spermiogenesis, post-meiotic male germ cells undergo a formidable re-organisation of their genome, where most histones are globally acetylated and then replaced by sperm-specific basic proteins that compact the genome into the highly structured sperm nucleus (9-11).

Despite the fundamental nature of this process, almost nothing is known about the regulatory factors and the underlying mechanisms. Assuming a critical role in genome reorganization for the massive post-meiotic histone acetylation, we focused our attention on testis specific bromodomain-containing proteins as candidate factors mediating the acetylation-dependent events. Accordingly, the testis-specific double bromodomain factor, Brdt, was selected for further studies (12). Brdt belongs to the BET (“Bromodomain Extra-Terminal”) family of double bromodomain-containing factors (13), which in the mouse includes Brd2, Brd3 and Brd4, all expressed in the testis, but of which Brdt is the only testis-specific member (14, 15). Our functional studies have demonstrated that Brdt, via its bromodomains, can bind acetylated histones, is co-detected with acetylated chromatin in male germinal post-meiotic cells, and possesses the unique property of re-organizing acetylated chromatin when expressed in somatic cells and in vitro on purified nuclei (12, 16).

These observations pointed to Brdt as an important factor controlling the male post-meiotic acetylation-dependent genome re-organization. This hypothesis is now strongly supported by the recent data obtained by Wolgemuth and collaborators, who produced a mouse deleted for the first bromodomain (BD1) of *Brdt* ($\Delta BD1$ mice) (17).

Spermatogenesis in these mice appears to be normal in pre-meiotic and meiotic stages but elongating and condensing spermatids are profoundly aberrant ((17) and unpublished data).

Together these data suggested that BRDT is a key factor involved in the post-meiotic maturation of male germ cells and that BD1 is a particularly important functional domain of this protein.

Variations in the coding sequence of the *BRDT* gene (localised on chromosome 1) were systematically searched for in 94 infertile males with defective spermatogenesis, combining denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC) and sequencing of all variations.

This initial screening led to the discovery of an infertile man with a homozygous variation (A->C), designated as the “C” allele, which produces a change in the amino-acid sequence (K62->Q) within BD1 (Fig. 1a; Table 1).

To extend these investigations and assess the genetic status of the K62->Q polymorphism in additional individuals, two genetic tests were then developed. The first was based on the specific PCR amplification of either the common or the variant allelic form of the gene. The second test took advantage of the appearance of a restriction site (Bfm I) specifically in the sequence of the C allele.

The allele-specific PCR approach was used to study the genotype of the family of the homozygous C/C patient, showing that this infertile man had inherited the C allele from his heterozygous A/C parents, that his two fertile brothers were A/A and his fertile sister was homozygous C/C (Fig. 1b). These genetic data not only confirmed that the two fertile

brothers did not have a C/C genotype, but also suggested that the C/C genotype was not associated with female infertility. The latter observation is in agreement with the phenotype of the *ABDI* mice, in which the females are fertile (17).

The genetic study specifically targeting the specific A->C (K62->Q) genetic alteration was then extended to two other populations of infertile men, of French and North African origin respectively, and their matching fertile controls. Allele-specific amplifications were performed and the results were confirmed either by sequencing or restriction analysis.

The data (Table 2) revealed that the homozygous variant genotype (C/C) was present in several infertile patients, whereas this genotype was absent from fertile males. Indeed, five additional men (1/96 French, and 4/189 North African infertile patients) were found to be homozygous C/C among this new series of 283 infertile men, bringing the total frequency of the homozygous polymorphism among infertile men to 1.6% (6/377), whereas none of the 438 fertile men were identified with the homozygous genotype C/C ($p < 0.03$).

All infertile men included in the study presented spermatogenesis defects with various degrees of severity. More detailed clinical and biological parameters were available for five of the six infertile C/C males. One was azoospermic with high FSH levels. The other four patients were oligozoospermic with respective sperm counts of 0.4, 1.6, 3.1 and 11.5 $\times 10^6$ /ml. Their sperm parameters also revealed a moderate (3 patients) to severe (1 patient) asthenozoospermia, as well as teratozoospermia in three of the patients (respective atypical morphology rates of 77%, 95% and 96%). Moreover, in the latter two

patients, malformed acrosomes and abnormal sperm head shapes (mainly macrocephaly) were noticed.

Therefore, this mutation could be considered as a potential cause of infertility in the studied populations.

We then wondered what molecular impact the K62Q mutation could have on the function of the protein. K62 is a conserved residue in the first bromodomain of BRDT proteins from human, mouse and rat (corresponding to K61 in the mouse), which is absent from the second bromodomain. Additionally, this particular lysine also seems to distinguish the testis-specific members of the BET family, since neither BRD2, nor BRD3, or BRD4 possesses a lysine at this position (see supplementary Fig.1 online), and may confer a specific conserved function to the BD1 of BRDT. Accordingly the post-meiotic functions of Brdt BD1 are unique, since despite the expression of other members of BET family in testis (15), none of them can compensate for defects in Brdt function (17).

A series of experiments were therefore designed to reveal the function of this specific residue in the activities of the first bromodomain of Brdt.

Brdt specifically interacts with acetylated histones and co-localizes with acetylated chromatin in somatic cells ectopically expressing Brdt treated by the histone deacetylase inhibitor Trichostatine A (TSA), or during spermiogenesis (12, 16). In order to evaluate the functional impact of K->Q replacement we compared the stability of in vivo association of WT or Q61Brdt with chromatin, using fluorescence recovery after photo bleaching (FRAP), after their ectopic expression in Cos cells, left untreated or after TSA treatment. For these experiments a truncated version of Brdt, (called ∂ C-sBrdt, lacking a

portion of its C-terminal region) with stronger in vivo action on acetylated chromatin (12), fused to GFP was used.

In the absence of TSA treatment, it was not possible to distinguish between the in vivo turnover of the 61K and 61Q versions of Brdt (Fig. 2 left panels). After TSA treatment, while the recovery time increased for both Brdts demonstrating their mobilization by acetylated chromatin, that of 61Q Brdt was significantly faster (Fig. 2, right panels), showing that the association of the mutant protein (Q61) with acetylated chromatin was significantly less stable than that of the wt protein (K61).

In the context of spermatogenesis, the stage-specific and genome-wide histone acetylation induces an efficient recruitment of Brdt to chromatin followed by the global re-organization of the haploid genome (12, 16). It is therefore very likely that an unstable association of BRDT with acetylated chromatin jeopardizes its subsequent activities such as the recruitment of additional factors and hence may dramatically hinder chromatin acetylation-dependent events in elongating spermatids.

Combining our genetic and functional data, we propose that the spermatogenesis defects observed in the mutated males could result from a dysfunction of BRDT BD1 which could severely impair the events following the general histone acetylation in elongating spermatids. In agreement with this hypothesis, in *ABDI* mice, although the initial increase of histone acetylation seems to take place, the number of condensed spermatids dramatically decreases and their morphology is severely altered ((17) and data not shown).

This is the first time that a recessive autosomal genetic defect found in infertile men is demonstrated to directly alter the function of a factor important in post-meiotic chromatin remodelling.

References

1. T. Kuroda-Kawaguchi *et al.*, *Nat Genet* **29**, 279-86 (2001).
2. T. Miyamoto *et al.*, *Lancet* **362**, 1714-9 (2003).
3. A. H. Dam *et al.*, *Am J Hum Genet* **81**, 813-20 (2007).
4. K. Dieterich *et al.*, *Nat Genet* **39**, 661-5 (2007).
5. C. Foresta, E. Moro, A. Ferlin, *Endocr Rev* **22**, 226-39. (2001).
6. M. M. Matzuk, D. J. Lamb, *Nat Cell Biol* **4**, s41-9. (2002).
7. Y. Nishimune, H. Tanaka, *J Androl* **27**, 326-34 (2006).
8. C. Krausz, C. Giachini, *Arch Androl* **53**, 125-33 (2007).
9. J. Govin, C. Caron, C. Lestrat, S. Rousseaux, S. Khochbin, *Eur J Biochem* **271**, 3459-69 (2004).
10. C. Caron, J. Govin, S. Rousseaux, S. Khochbin, *Prog Mol Subcell Biol* **38**, 65-89 (2005).
11. S. Rousseaux *et al.*, *Gene* **345**, 139-53 (2005).
12. C. Pivot-Pajot *et al.*, *Mol Cell Biol* **23**, 5354-65 (2003).
13. B. Florence, D. V. Faller, *Front Biosci* **6**, D1008-18. (2001).
14. M. H. Jones, M. Numata, M. Shimane, *Genomics* **45**, 529-34 (1997).
15. E. Shang *et al.*, *Gene Expr Patterns* **4**, 513-9 (2004).
16. J. Govin *et al.*, in *The Histone Code and Beyond* S. L. Berger, O. Nakanishi, B. Haendler, Eds. (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2006) pp. 155-172.
17. E. Shang, H. D. Nickerson, D. Wen, X. Wang, D. J. Wolgemuth, *Development* **134**, 3507-15 (2007).
18. The authors wish to thank C. Petosa (EMBL, Grenoble France) and Karin Sadoul (UJF, Grenoble, France) for useful discussions and C. DeRobertis for technical assistance, and acknowledge the help of A. Grichine (microscopy platform, Albert Bonniot Institute, Grenoble). A large part of this work was performed within Grenoble EPIMED platform of U823 INSERM. We gratefully acknowledge support from PHRC (Clinical research project "Infertilité et microdélétion du chromosome Y", coordinator R. Levy, CHU St Etienne France), from Grenoble DRC (Clinical Research program, Grenoble CHU, France) funding, Organon (FARO program), Agence Nationale de la Recherche (ANR, "Regulome" & "Episperm" programs) and Région Rhone Alpes ("CIBLE" program).

Table 1

Nature of the coding sequence variations within *BRDT* identified in our populations of 94 infertile males and 94 fertile matched controls. The consensus and variant forms of each codon and corresponding amino-acid (AA) are shown. Note that variations in exons 2, 6 and 8 are known polymorphisms.

Exon	position	consensus		variant	
		codon	AA	codon	AA
2	62	AAG	K	CAG	Q
6	238	AAA	K	AAC	N
8	410	AAC	N	AAG	K
17	804	GCA	A	GTA	V

Table 2- Frequencies of rs10783071 genotypes in the fertile control and infertile males within the populations of the present study

* The significance of the differences in genotype frequencies between the total populations of fertile versus infertile males was tested using Pearson's chi-squared distribution, $p=0,02968849$ (two-tailed, testing the distributions of all genotypes A/A, A/C and C/C); $p=0,00804907$ (one-tailed, testing the distributions of C/C genotypes and other genotypes).

Control	A/A	A/C	C/C	TOTAL	
First population (mix of French and North African males)					
nb	82	12	0	94	
%	87%	13%	0%	100%	
French males					
nb	189	59	0	248	
%	76%	24%	0%	100%	
North African males					
nb	70	26	0	96	
%	73%	27%	0%	100%	
TOTAL					
nb	341	97	0	438	p<0.03*
%	78%	22%	0%	100%	
Infertile	A/A	A/C	C/C		
First population (mix of French and North African males)					
nb	81	12	1	94	
%	86%	13%	1%	100%	
French males					
nb	72	21	1	94	
%	77%	22%	1%	100%	
North African males					
nb	137	48	4	189	
%	72%	25%	2%	100%	
TOTAL					
nb	290	81	6	377	p<0.03*
%	77%	21%	2%	100%	

Figure legends

Fig. 1 Four variations/polymorphisms were detected within the BRDT gene

1a- Schematic representation of the encoded sequence of the BRDT protein, with its exons (from 2 to 19) and its bromodomains (BD1 and BD2 = respectively first and second bromodomains). Grey arrows represent the positions of known polymorphisms, which were not found in our populations. Black arrowheads indicate the four variations of the amino-acid sequence found in our population. The numbers of individuals of each genotype in the two populations of 94 infertile and 94 fertile control men are given on the left. Empty boxes represent consensus sequences, dashed boxes heterozygous and black boxes homozygous genotypes for the respective variations.

*This man also presented a homozygous genotype for the variation in exon 6 (A->C, resulting in K238->N). Since K238 is not a conserved amino-acid and does not lie within a known functional domain of the protein, we considered that it was unlikely to have a functional impact.

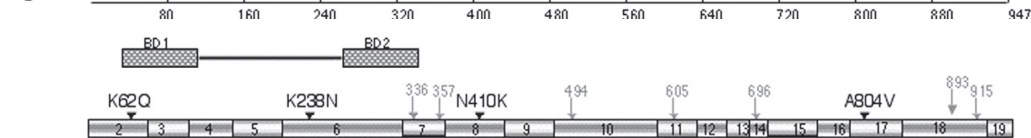
1b- Genotyping (by allele-specific PCR) of the family members of the infertile man with a CC genotype resulting in the K62Q mutation. The A allele is the common one, whereas the C allele is the variant.

Fig. 2 FRAP experiments showing that the association of BrdtQ61 with acetylated chromatin is not as strong as that of wt Brdt.

Upper panels: GFP fluorescence of cos cells transfected with *GFP- ∂ C-sBrdt* (WT) or *GFP- ∂ C-sBrdtQ61* (Q61), untreated (-TSA, upper left panel) or treated with TSA (+TSA, upper right panel) for 6 hours, before photobleaching (t_0 = bleach) and at several time-points after photobleaching (shown in seconds). Middle panels: magnification of the series of photos of the upper panel. Lower panels: fluorescence intensity recovery in the same cells untreated (TSA-, lower left) treated with TSA (TSA+, lower right panel). The blue curve is that of cos cells transfected with *GFP- ∂ C-sBrdt* (WT) and the pink curve corresponds to *GFP- ∂ C-sBrdtQ61* (Q61) transfected cells. Deviations were calculated from 5 individual measurements.

Figures

Fig.1a



Genotypes (94 infertile / 94 control)

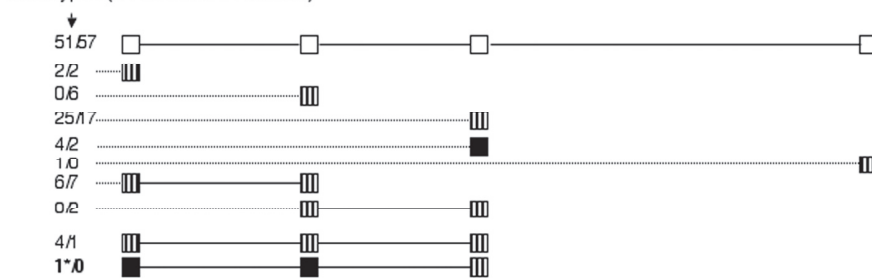


Fig.1b

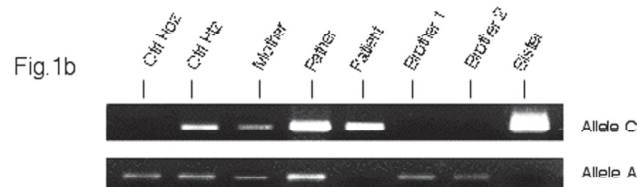
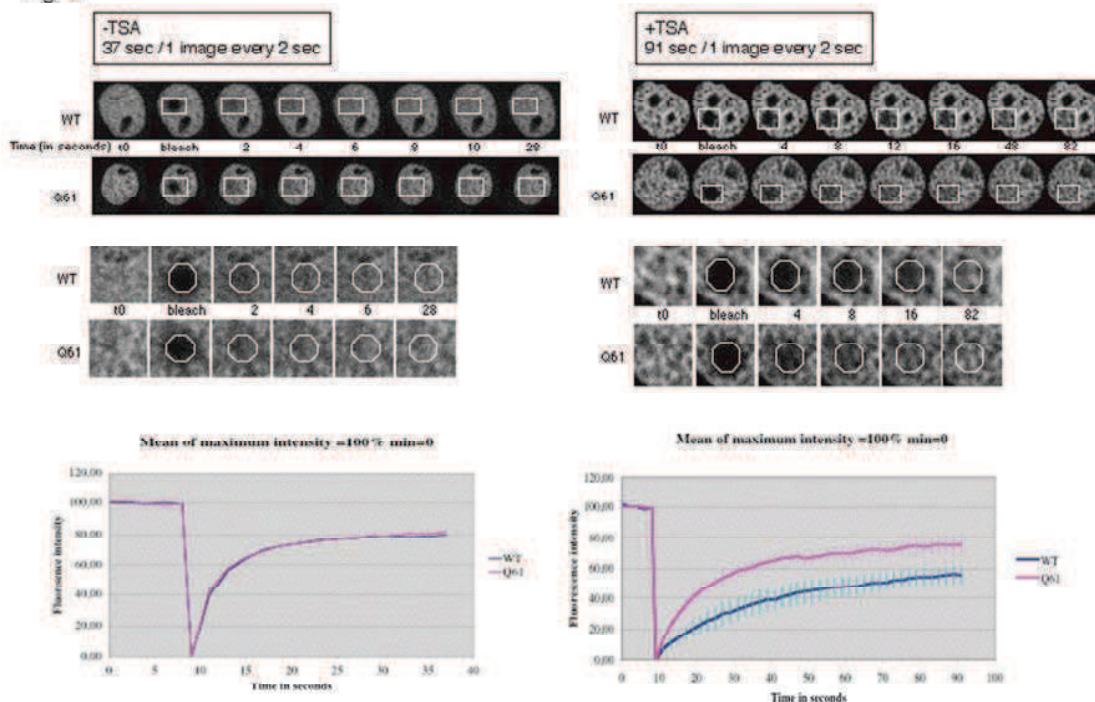
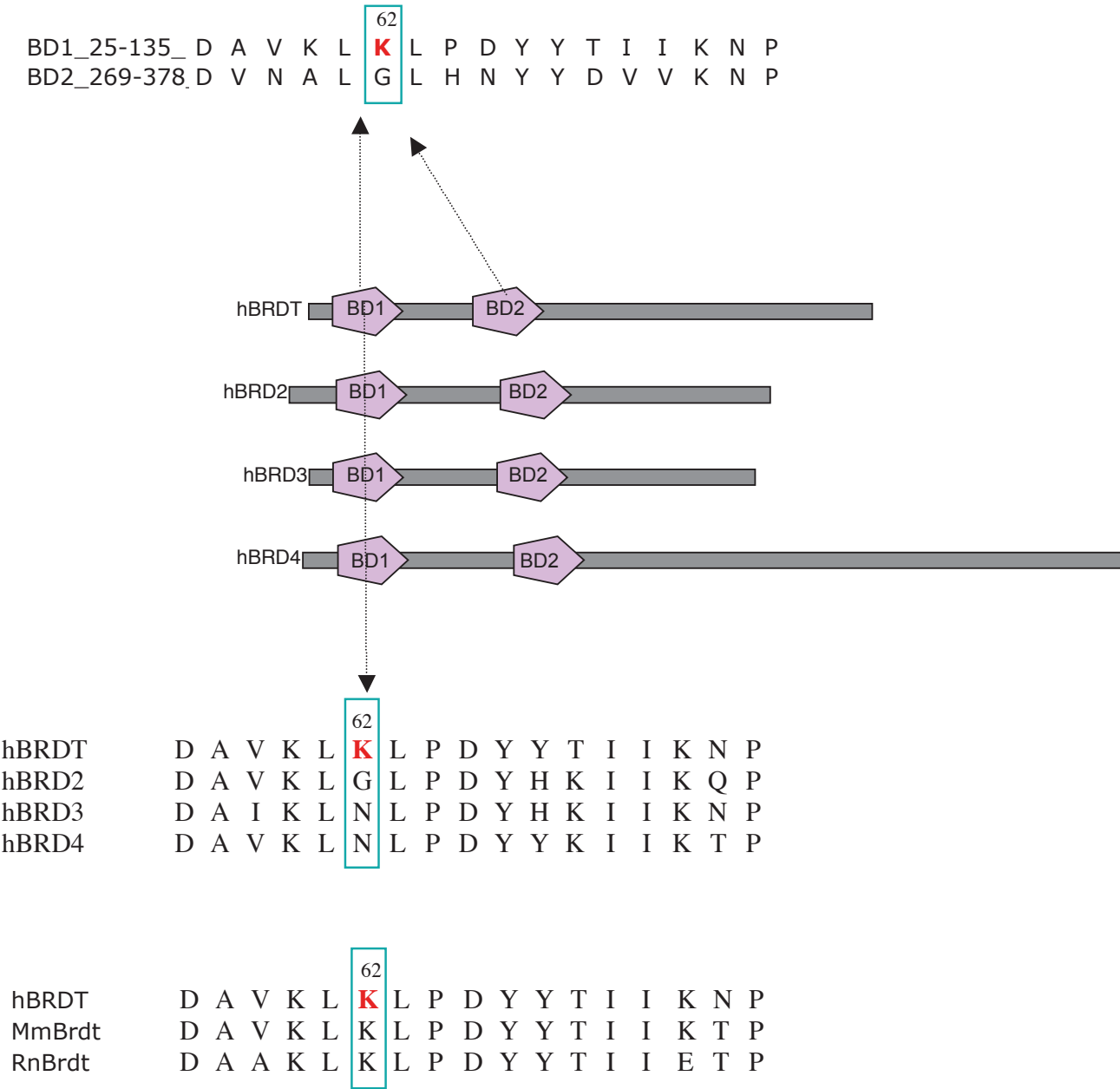


Fig. 2



Supplementary Fig.1: K62 in hBRDT is an aminoacid which is specific to BRDT and conserved in the rat and mouse Brdt proteins.

Partial alignments of a stretch of amino-acids in the region including K62 in the first bromodomain (BD1) of hBRDT with the corresponding stretches of amino-acids of 1a/the second bromodomain of hBRDT (BD2), 1b/ the different human BET proteins (hBRD2, hBRD3 and hBRD4, also shown in a schematic representation showing the positions of their bromodomains), and 1c/ the mouse and rat Brdt proteins.



Supplementary Methods

Infertile patients and control fertile men

A total of 377 infertile patients presenting a non-obstructive severe oligozoospermia or azoospermia were recruited in clinical research projects on male infertility: 94 were recruited from a National Projet Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) coordinated by the CHU of Saint Etienne, and the other 283 patients were treated for infertility at Tenon Hospital in Paris. A control population was constituted of 438 men with proven fertility, unrelated to one another. Relatives of one of the mutated patient also took part of the present study. All patients signed an informed consent for molecular investigation, and ethical approval was given by the relevant local ethics committees in France. For each individual, a 10 ml blood sample was collected, from which the DNA was extracted using a standard protocol, then stored at -20°C.

Mutation screening of the *BRDT* gene by dHPLC and sequencing

A systematic screening for mutations/variations was undertaken in the *BRDT* gene of 94 infertile men and 94 fertile males.

Exon amplifications:

Each one of the 19 exons of *BRDT* was amplified independently. In a final volume of 50 µL, 50ng of matrix is mixed with the PCR TaqGOLD buffer (Roche®), 1,5mM of MgCl₂, 10pmol of each primer (primer sequences, amplifications and DHPLC conditions are detailed in supplementary table 1 online), 10mM dNTP and 5 µL Taq GOLD (Roche®). After 10 minutes at 95°C, a 35 cycle program comprising 5'' at 94°C, 30'' at hybridizing temperature and 1'30 of elongation allowed the amplification of each exon. Each PCR product was then checked and semi-quantified on a 2% agarose gel.

Denaturing High Performance Liquid Chromatography (dHPLC):

In order to allow the formation of heteroduplexes, the amplified fragments were denatured by heat for 10' at 95°C, then slowly re-annealed by decreasing the temperature by 1°C every 30''. In each reaction the DNA samples were coupled 2 by 2 in identical amounts, so that homozygous variations could be detected. For each exon, the optimal column temperature and acetonitrile gradient were calculated by the software given by Transgenomics®. When heteroduplexes were found, their identification required a second analysis of each of the two DNA with a control DNA, homozygous for the wild-type sequence. The heterozygous frequencies suggested that the chances of pooling two homozygous mutated DNA were very low.

Sequencing:

All the variations detected by dHPLC approach were then identified by the automatic sequencing machine ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems®) and the previously used primers.

Screening for the exon 2 A->C mutation by allele-specific PCR amplification

Another 283 infertile patients and 344 fertile males were screened specifically for the exon 2 A->C mutation, by allele-specific PCR amplification and sequencing.

Primers were designed (3' [common]: ACAGCTATTATTGTTAACCC, 5' [wild-type]: GACATACATACAGGCAAGTT, 5'[variant]: GACATACATACAGGCAAGTG). PCR reactions were performed in 50 μ L with 50ng matrix DNA, PCR TaqGOLD Buffer (Roche®), 1,5mM MgCl₂, 10pmol of each primer, 2mM dNTP and 5 μ L Taq GOLD (Roche®). After 10 minutes at 95°C, a 35 cycle program including 5'' at 94°C, 30'' at 55°C and 30'' at elongation temperature (72°C), allowed the specific amplification of the A (wild-type) or C (variant) allele, depending on the chosen 5' primer. Les PCR products were checked on 2% agarose gels. Unclear results and all variant alleles were all sequenced.

Screening for the exon 2 A->C mutation by restriction analysis

Exon 2 was amplified from approximately 200 ng of matrix DNA in a final volume of 30 μ l using the same primers as for dHPLC (sequence in supplementary file) and the "Fast start Taq DNA polymerase" kit from Roche®. The PCR conditions were as follow 8 minutes at 95°C, a 45 cycle program including 30'' at 95°C, 30'' at 56°C and 1' at elongation temperature (72°C), followed by a final extension at 72°C for 7 minutes. 3 μ l of the PCR product (1/10e) were then digested overnight at 37°C by 2.5 units of BfmI in a final volume of 5 μ l of Tango Buffer (1x final). The digested DNA was then visualized on a 1% Agarose gel.

Functional characterization of the corresponding K61Q Brdt mutant in the mouse

Mouse *Brdt* wt and mutants:

The *Mm brdt* construct GFP- ∂ C-sBRDT was available in the lab (12) *GFP- ∂ C-sBRDTK61Q* was created by mutagenesis using a Stratagene® Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit.

Acetylated chromatin remodelling assay and FRAP experiments:

Cos 7 cells grown on labtek glass coverslips, were transfected with 2 μ g of *GFP- ∂ C-sBRDT* or *GFP- ∂ C-sBRDTK61Q* using lipofectamine and then treated with 50 ng/ml of TSA and incubated at 37C 5%CO₂. Cells were submitted to Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments six hours after TSA (or mock) treatment. For this purpose, GFP intensity was measured before and every 2 seconds after photobleaching during 37 (cells without TSA) or 91 seconds (cells with TSA).

Ref

Supplementary Table 1: List of primers and conditions of PCR amplification and DHPLC

	Primers	amplicon (bp)	Hybridiz. temp.	DHPLC temp(in °C)	T _m (in °C)
	F:GCATTTTAAGAATCATAATAGTTCA				62
exon 1	R:CTAAAACTCCCCTTACACTAAGA	128	56°C	53 - 55,3	64
	F:CCTAAAGTGCTTCTGAAGTACTC				66
exon 2	R : TTTTGTGAACTAACATAGTTGAA	303	56°C	56.6 - 57.1	58
	F:TTTAGAATTTGTTCAAAACCATA				56
exon 3	R : GGCAAAGAATTAGCAAGTATAA	200	56°C	52.5 - 54	58
	F:ATTTAAAACATTTGGTACAGTGA				58
exon 4	R : CCTTTGAGGGATTTACACA	263	52 °C	53-56-57	54
	F:ATATTTGATTCTGGCTCATACTT				58
exon 5	R : GCAATGATTTAAAACTACAACA	232	52 °C	57.5 - 60	58
	F:ATATTTTTGTTGTTGAATTGTTT				56
exon 6	R : AGTTCTTCCTTTTAAGGCAA	409	52 °C	56-56.8	54
	F : TGAAGTATTTGTGAATCCTGTAG			54.5 - 56.8 -	62
exon 7	R : GTTCAGAGGAAAAACACCTT	195	56°C	59	56
	F:CAGAAAACCATAACAACTAATTT				58
exon 8	F : AGCAGCTCATAGATTATCAAAA	268	56°C	56.9 - 58.8	58
	F:GACATGAATGTTTACAGATTTT				56
exon 9	R : TATTGTCTTAATAAGCTATCATAATAA	188	52°C	56 - 56.8	64
exon 10	F:AGACAATAACGATAAGTTGGACTA				64
	R:CAACATAAATACCAAACCGAT	378	52°C	55.2 - 56.5	56
exon 11	F:GTTGGTTTTTGGTTATACTCACT			53 - 56.5 -	62
	R:CAAGACCCTGTCTCTACATACAT	221	50°C	58.3	66
exon 12	F:CTTCTGGCATTTTAATATGTTTC				60
	R:CAACAGAGGTACATTTAAGGG	159	58°C	52.5 - 55	60
exon 13	F:ATGGAAAAATTATAACTTGGTATT				58
	R:AAAGCTACTACTATACCCATGAGT	202	57°C	53 - 54.5	66
exon 14	F:TGGTTAAGAGATAATATGATTAATG				62
	R:CCCTGTTCTTTAAAACACAT	133	54°C	53 - 55	54
exon 15	F:TGGTTAAAACTAAGTGATAACTTTG			53 - 55.5 -	64
	R:TTCTCAATAACAGTTGTTTACTTGT	247	57°C	58.3	64
exon 16	F:CAAATTCTGGGTAAGTAGGATGA			51.7 - 54.3 -	64
	R:CACTTCCAAACCCAATTTT	226	56°C	58.8	54
exon 17	F:TGTAGACATAGACTGAACCAAAT			53.3 - 55.8 -	62
	R:CCAAACCCTCCTTTAATC	271	56°C	57.5	52
exon 18	F:AACCTACTTTGAGCTATACTTTT				60
	R:TCCCTTGTTAAATTAGATTAGT	257	54°C	54.8 - 58.5	58

exon	F:AGTAATATTAAAATTTTCTGCTTTT				58
19	R:CCTTTGAATTATGTCGTTTA	294	54°C	53.7 - 54.9	52

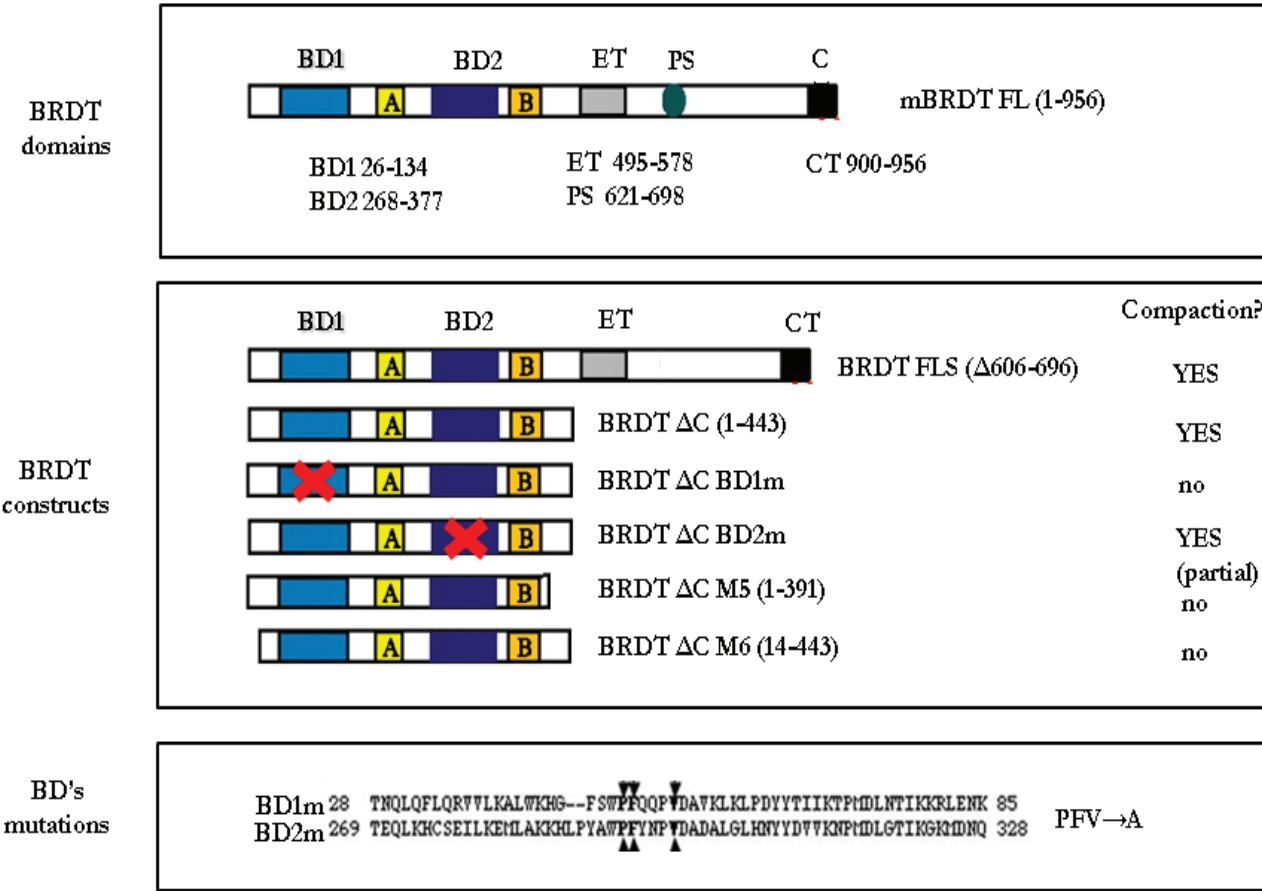
6. BRDT et le remodelage de la chromatine acétylée

- Présentation des recherches en cours

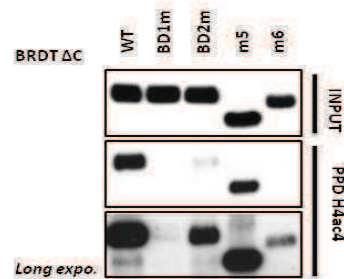
La protéine BRDT appartient à la famille BET très conservée au cours de l'évolution. Ces protéines possèdent deux bromodomaines BD1 et BD2 et une partie C terminale avec des fonctions peu connues. Nous avons étudiée la capacité des bromodomaines et des parties adjacentes aux bromodomaines à lier la chromatine acétylée (Pivot-Pajot et al., 2003).

Nous avons pu montrer que le premier bromodomaine de BRDT est crucial pour lier et remodeler la chromatine acétylée. D'autre part une quinzaine d'acides aminés de la partie N-terminale de BRDT est aussi cruciale pour cette activité. Il est possible que cette séquence (qui n'appartient au pas au bromodomaine) participe à l'organisation spatiale de la protéine BRDT et en particulier celle de son premier bromodomaine.

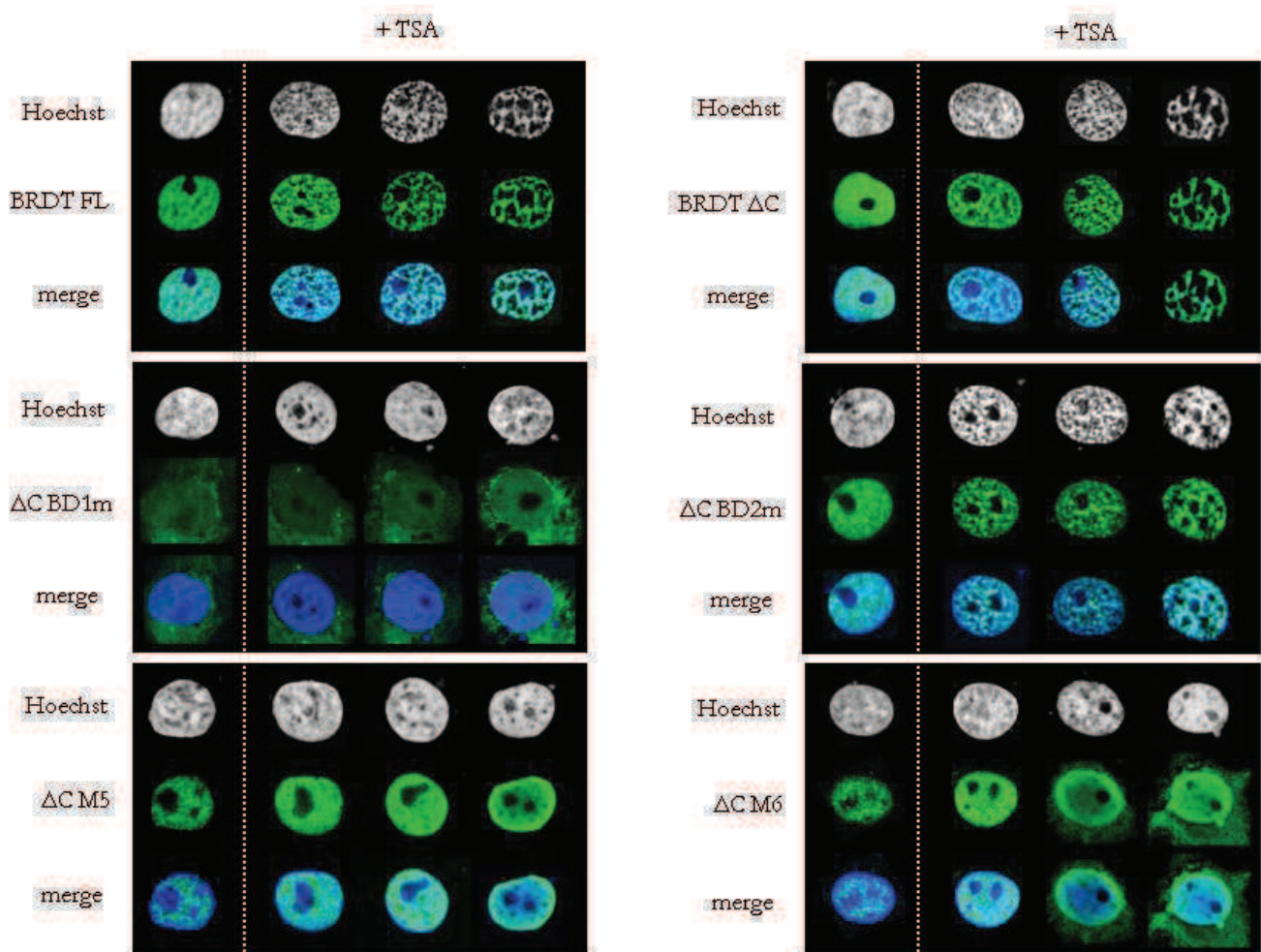
La protéine BRDT. Les différents domaines de la protéine BRDT de souris. Mutations réalisées sur la protéine. Conservation du domaine carboxy-terminal chez les membres de la famille BET (d'après Bisgrove et al., 2007 et Florence et Faller, 2004).



Importance des domaines de BRDT dans la liaison à un peptide acétylé. Les différents mutants des domaines de BRDT sont testés pour leur affinité pour un peptide de la queue amino-terminale de H4 acétylée sur K5, K8, K12, K16 (H4ac4). Expérience de peptide pull down (PPD).



Importance des domaines de BRDT dans la compaction de la chromatine. Les différents domaines de la protéine BRDT sont transfectées dans les cellules COS puis une hyperacétylation des histones est induite par un traitement à la TSA. Les formes sauvages de BRDT ainsi que la forme mutée dans son deuxième bromodomaine (BD2m) sont capables de compacter la chromatine.



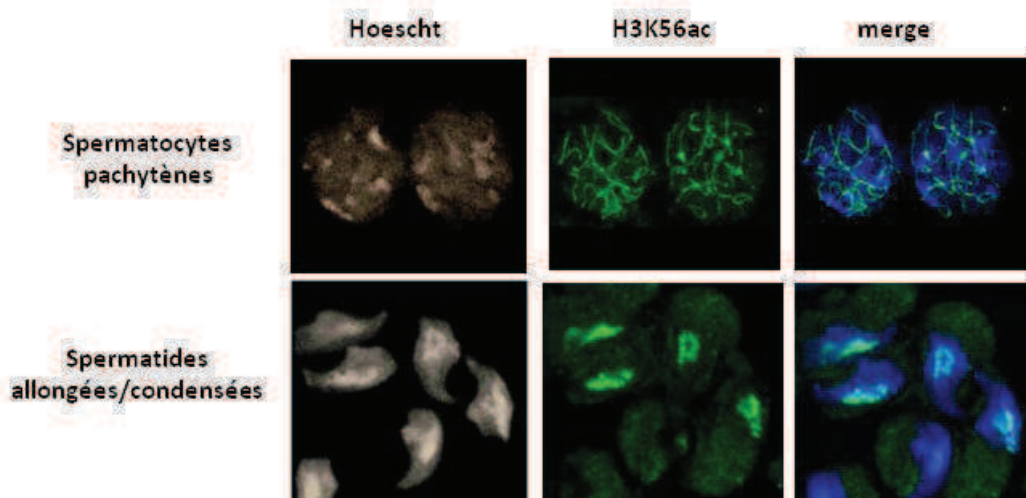
7. L'acétylation de H3K56 au cours de la spermatogenèse

- Présentation des recherches en cours

L'acétylation du résidu H3K56, localisé dans le cœur du nucléosome, est associée à l'échange des histones chez la levure. Peu d'études existent sur le rôle physiologique de cette modification chez les mammifères. Nous avons pu montrer que cette modification apparaît au cours de la spermatogenèse dans les spermatocytes et les spermatides allongées/condensées au moment de l'enlèvement des histones (données d'immunohistochimie sur coupe de testicule non montrés). L'analyse par immunofluorescence montre une localisation de cette modification au niveau des complexes synaptonéaux dans les spermatocytes pachytènes et un enrichissement dans les zones d'hétérochromatine des spermatides allongées/condensées. Il est possible que cette modification soit aussi associée au mouvement des nucléosomes dans les cellules germinales mâles.

D'autre part, nous avons pu montrer que BRDT interagît avec cette modification grâce à son premier bromodomaine (par peptide pull-down et microcalorimétrie).

Localisation de H3K56ac au cours de la spermatogenèse. H3K56 est acétylé dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides allongées /condensées. Au stade pachytène H3K56ac colocalise avec les complexes synaptonéaux. Dans les spermatides allongées /condensées, H3K56ac est localisé au niveau des zones d'hétérochromatine (denses en Hoechst).



Interaction de BRDT avec le peptide H3K56ac. Différents mutants des domaines de BRDT sont testés pour leur affinité pour un peptide H3K56ac par PPD (peptide pull-down). L'affinité des bromodomains pour les peptides H3K56ac ou non sont testées par ITC (Isothermal Calorimetry) (données ITC de Carlo Petosa).

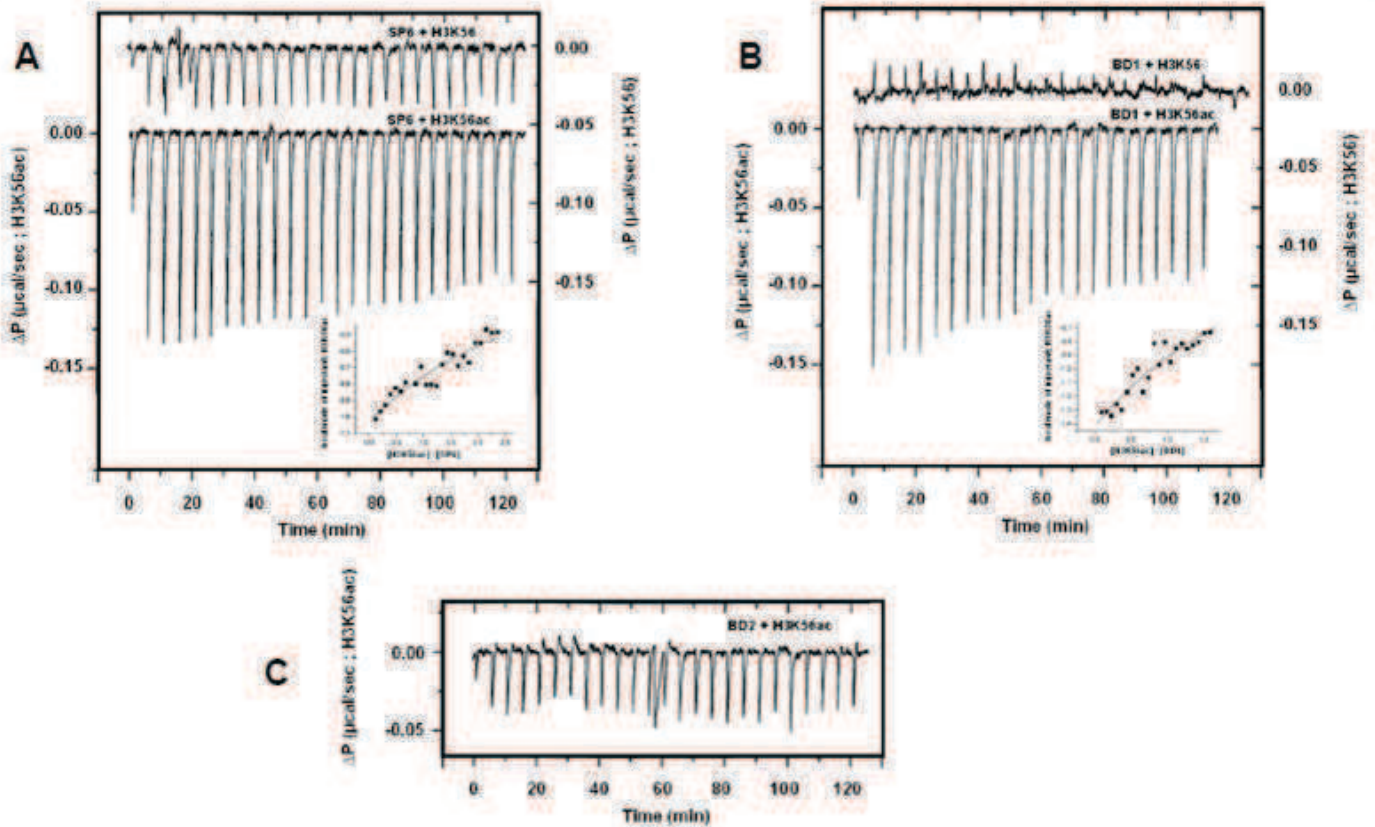
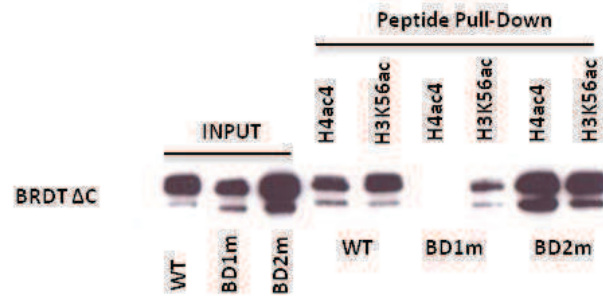


Figure A: SP8 binds H3K56ac (45-64) with an affinity of $\sim 290\mu\text{M} \pm 70\mu\text{M}$ if assuming a 1:1 stoichiometry. SP8 does not bind non-acetylated H3K56 (45-64) (upper graph)

Figure B: BD1 binds H3K56ac (45-64) with an affinity of $\sim 210\mu\text{M} \pm 60\mu\text{M}$, assuming a 1:1 stoichiometry. BD1 does not bind non-acetylated H3K56 (45-64) (upper graph).

Figure C: BD2 does not bind H3K56ac (45-64).

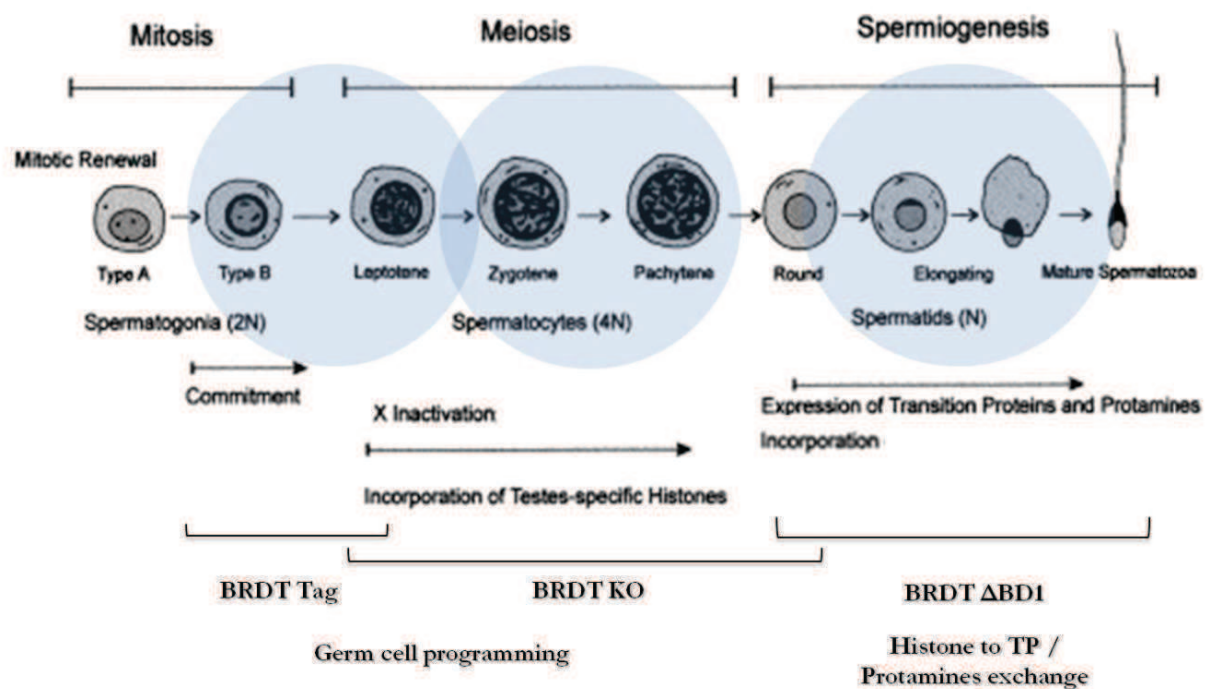
All titrations are shown in same scale

8. Les multiples rôles de BRDT au cours de la spermatogenèse

- Présentation des recherches en cours

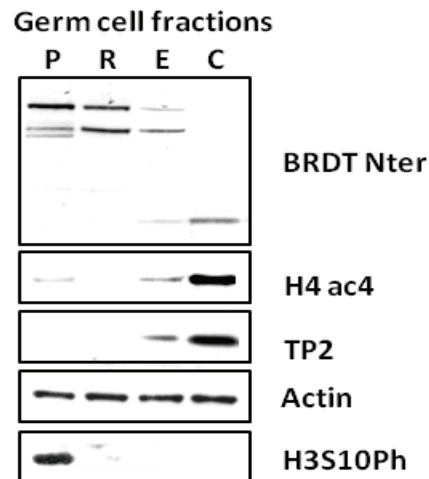
Les études menées chez la souris montrent que BRDT est impliqué tout au long de la spermatogenèse. Les diverses fonctions de cette protéine sont rattachées à différents domaines de BRDT. Le premier bromodomaine de BRDT est impliqué dans l'échange des histones par les protéines de transition et les protamines. Les autres domaines sont impliqués dans la régulation des programmes d'expression au cours de la méiose.

Les différentes fonctions de BRDT pendant la spermatogenèse (schéma bilan).



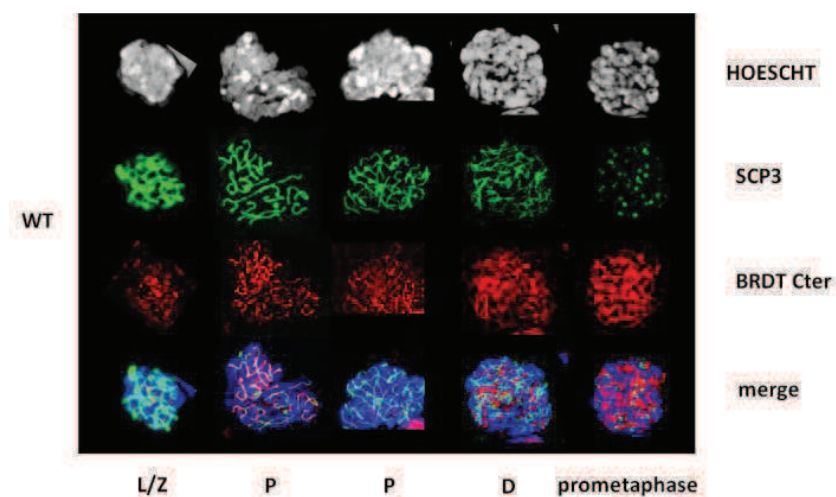
Nous avons pu voir que l'expression ARN de BRDT débute dès le début de la méiose. Des résultats complémentaires montrent qu'une longue isoforme de BRDT (environ 100 kDa) est présente dans les spermatocytes et qu'une isoforme plus courte (environ 50 kDa) est retrouvée dans les spermatides allongées/condensées. Des expériences complémentaires sont en cours afin de caractériser ces différentes isoformes de BRDT.

Expression de la protéine BRDT pendant la spermatogenèse. Western blot sur séparation de cellules germinales séparées par sédimentation. Fractions de spermatocytes (P) spermatides rondes (R), spermtides allongée (E) et condensées (C). Deux isoformes de BRDT apparaissent : une forme longue, exprimée au cours de la méiose (en même temps que la phosphorylation de H3S10 (H3S10Ph), qui disparaît au moment de l'expression d'une forme plus courte dans les spermatides allongées/condensées au moment de la vague d'acétylation (H4 tetracétylé) et de l'apparition des protéines de transition (TP2).



D'autre part, j'ai pu montrer que BRDT colocalise avec les protéines du complexe synaptonémal au stade pachytène. Des expériences d'immunoprécipitation sont en cours afin de confirmer une interaction de BRDT avec les protéines du complexe synaptonémal SCP3 et SCP1.

Localisation de la protéine BRDT au cours de la méiose. Immunofluorescence sur une préparation de cellules germinales. BRDT colocalise avec la protéine du complexe synaptonémal SCP3 au stade pachytène (P).

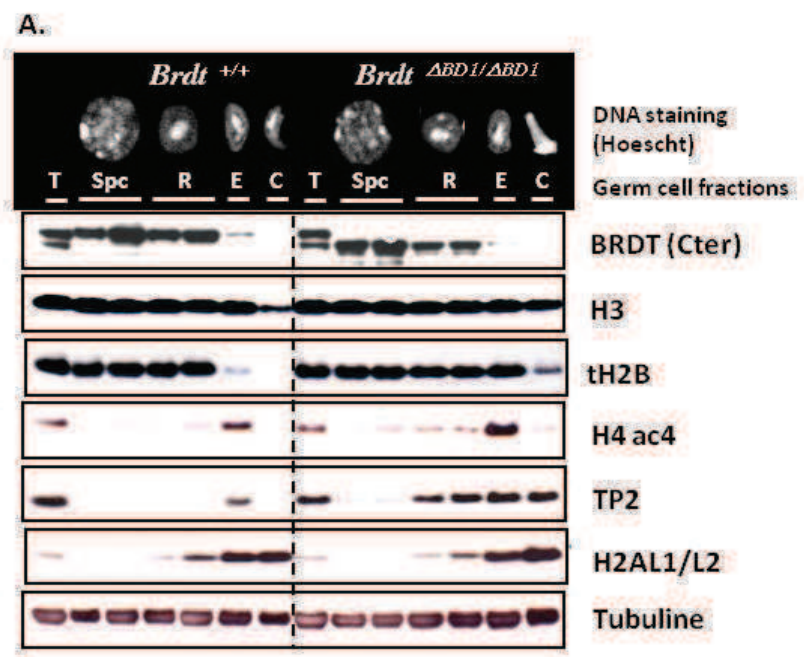


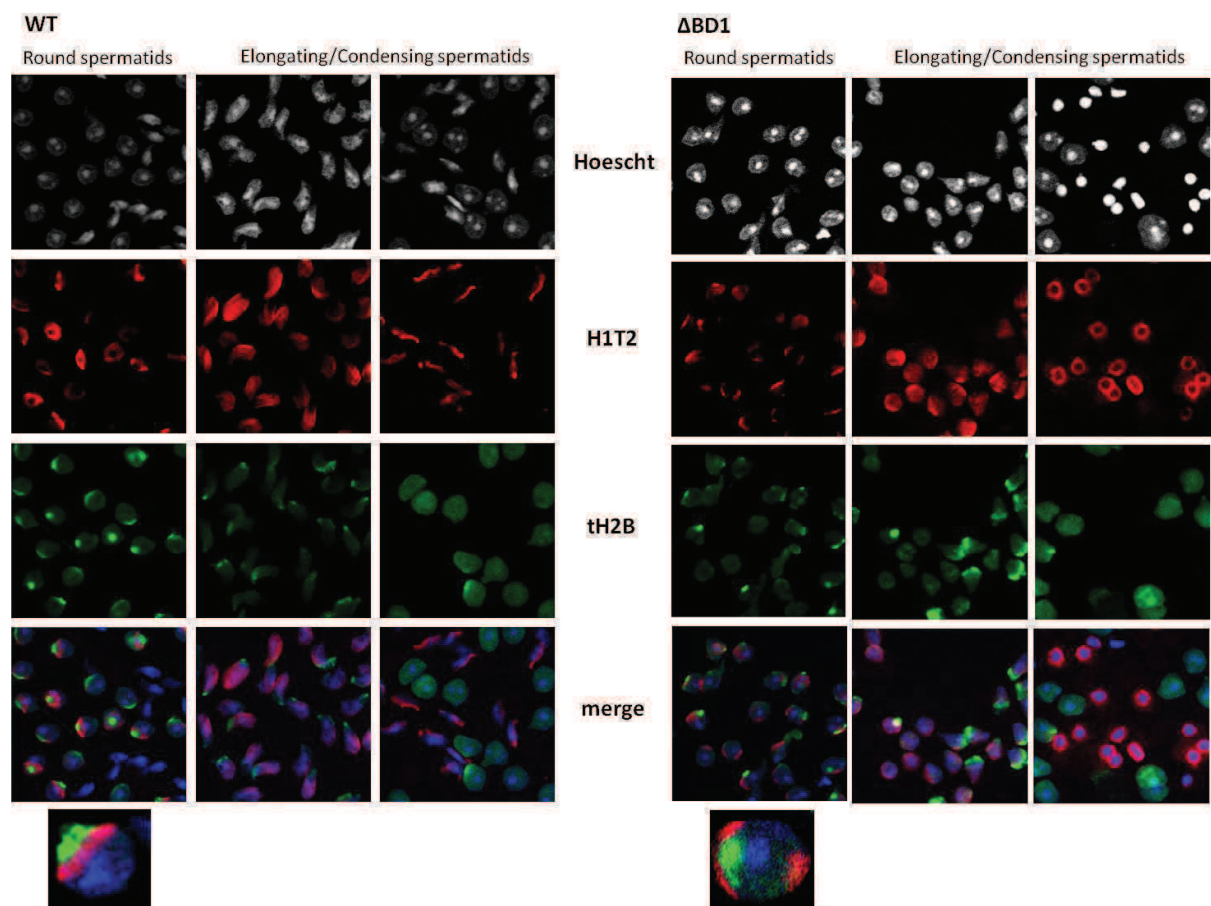
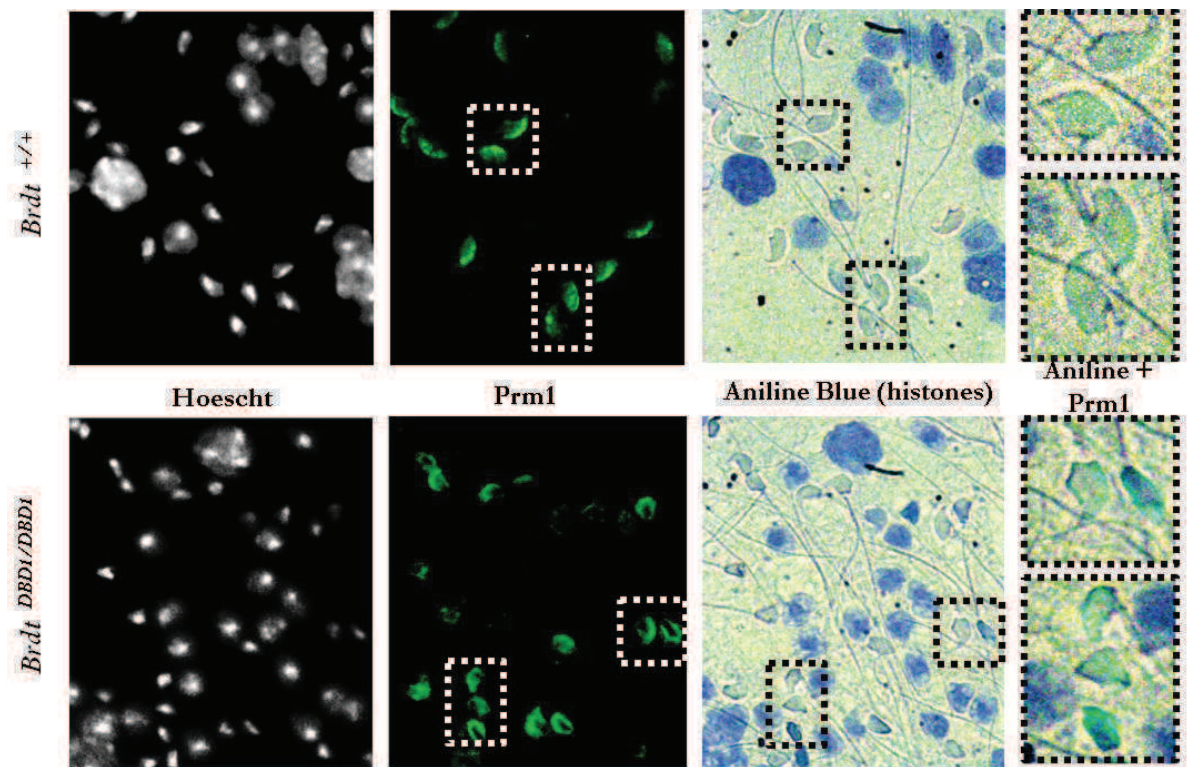
BRDT et l'enlèvement des histones au cours de la spermiogenèse. Analyse des spermatides allongées/condensées (E/C) chez les souris possédant une version déletée du premier bromodomaine de BRDT.

A. Western blot sur fractions de cellules germinales séparées par sédimentation. Fractions de spermatocytes (Spc), spermatides rondes (R), spermatides allongée (E) et condensées (C). Comparaison des fractions de cellules germinales des souris sauvage.

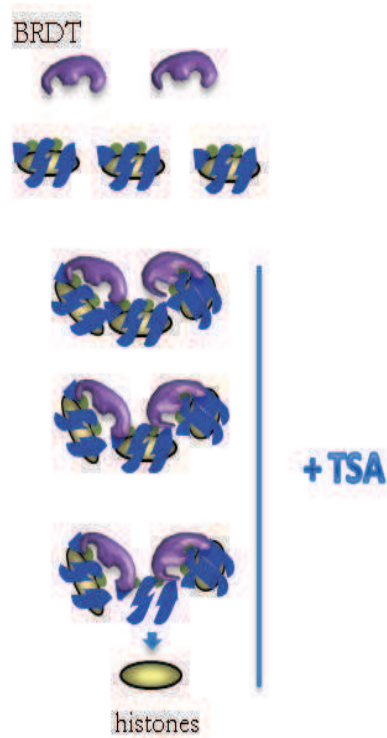
B. Les histones colorées en bleu par l'aniline. Au moment ou les protamines apparaissent, les histones disparaissent dans les spermatides allongées /condensées des souris sauvage. En revanche chez les souris BD1 les histones persistent à ces stades et ne semblent pas être correctement enlevées.

C. BRDT et l'incorporation/éviction des variants d'histones au cours de la spermiogenèse. Immunofluorescence sur tubules chez les souris possédant une version déletée du premier bromodomaine de BRDT. On observe une perte de la localisation polaire du variant d'histone H1T2 dans les spermatides rondes des souris BD1.





Vers un modèle in vitro d'enlèvement des histones. BRDT compacte la chromatine hyperacétylée lorsqu'il est exprimé dans les cellules COS. Il est possible que cette compaction de la chromatine puisse faciliter l'éviction des histones via l'action « mécanique » de BRDT.



CHAPITRE 3

DISCUSSION / PERSPECTIVES

1. Fonctions de la vague d'acétylation au cours de la spermiogenèse

- Dynamique et régulation de la vague d'acétylation post-méiotique

L'acétylation est une marque dynamique qui dépend de l'équilibre entre activités HAT et HDAC. Au cours de la spermiogenèse la vague d'acétylation massive des histones qui a lieu au moment de l'allongement des spermatides peut être déclenchée par une activation des HAT et/ou une inhibition des HDAC.

Il a été montré que les HDAC nucléaires HDAC1 et HDAC2, sont dégradées au moment où les histones sont hyperacétylées ce qui pourrait augmenter le niveau global d'acétylation des histones (Caron et al., 2003). Les HDAC sont globalement exprimées dans tous les tissus et HDAC6 est très abondante au sein du testicule. Le KO de HDAC6 chez la souris n'impacte ni la vague d'acétylation, ni la spermatogenèse.

L'établissement du profil d'expression des HDAC au cours de la spermatogenèse nous permettrait de savoir si les HDAC sont effectivement dégradées au cours de la spermiogenèse afin de faciliter la vague d'acétylation.

A l'heure actuelle, aucune HAT responsable de la vague d'acétylation n'a encore été identifiée. CDYL est une enzyme spécifique des cellules germinales exclusivement exprimée dans les spermatides allongés. Il a été proposé que CDYL possède une activité HAT au cours de la spermiogenèse (Lahn et al., 2002). Cependant cette activité HAT n'a pas pu être confirmée par notre laboratoire (communication personnelle Cécile Caron). Afin de véritablement infirmer cette hypothèse, il faudrait réaliser le KO de cette enzyme chez la souris et caractériser leur spermatogenèse.

Il serait aussi intéressant d'étudier le profil d'expression des HAT au cours de la spermatogenèse afin de cibler des acteurs potentiels de la vague d'acétylation. Effectivement, on peut supposer que la HAT responsable est très abondante dans les spermatides allongés. La délétion des enzymes identifiées dans les cellules post-méiotiques permettrait de caractériser d'éventuels acteurs de cette vague. Le problème est que les HAT sont des coactivateurs transcriptionnels puissants, et leur(s) délétion(s) pourrait engendrer des problèmes transcriptionnels rendant difficile l'étude de leur implication dans la vague d'acétylation.

D'autres HAT pourraient être impliquées sans pour autant être abondante dans les étapes post méiotiques. En effet, une HAT exprimée tout au long de la spermatogenèse pourrait voir son activité potentialisée au cours de la vague d'acétylation. Par exemple, NUT, une protéine spécifique du testicule, est connue pour potentialiser l'activité de la HAT p300 (Reynoird et al., 2010).

Enfin, l'acétylation semble aussi être régulée par le code histone. Par exemple, la phosphorylation de la sérine 1 de H4 inhibe fortement l'acétylation des lysines 5, 8, 12, 16 de cette histone *in vitro*. Au cours de la spermiogenèse, H4S1P disparaît au moment où les spermatides commencent à s'allonger, précisément lorsque les histones sont hyperacétylées. La phosphorylation de H4S1 pourrait influencer la structure de la queue de H4, et moduler son accessibilité. A pH physiologique, un grand nombre de charges positives sont exposées

au niveau d'un stretch d'acides aminés basiques de la queue amino-terminale d'H4 (acides aminés 16-20). La phosphorylation de la sérine 1 acidifie l'extrémité de la queue amino-terminale, qui pourrait interagir avec le stretch basique et former une « boucle » au sein de la queue amino-terminale de H4. Cette boucle pourrait bloquer l'accès des lysines aux complexes HAT.

H4S1 est phosphorylée chez la levure par CK2 (Cheung et al., 2005). CK2 est un hétérodimère entre des sous unités α et β . Lors de la spermatogénèse murine, la sous unité α est remplacée par une sous unité α' exprimée spécifiquement dans le testicule (Escalier et coll., 2003). Le gène codant pour cette sous unité α' a été invalidé chez la souris, ce qui conduit à une infertilité des souris mâles, et à des problèmes d'organisation du noyau (Escalier et coll., 2003). Il serait intéressant d'étudier l'état de la chromatine, et notamment l'état de phosphorylation de H4S1 dans ces souris. Si l'acétylation de H4 est dépendante de la déphosphorylation de H4S1, il est aussi intéressant d'étudier la phosphatase impliquée dans la réaction de déphosphorylation afin de mieux comprendre la mise en place de la vague d'acétylation.

On peut imaginer un modèle de la mise en place de la vague d'acétylation des histones au cours de la spermiogénèse : dans les spermatides rondes, les queues amino-terminales d'H4 sont verrouillées par la phosphorylation de H4S1 (H4S1ph) ; au cours de l'allongement des spermatides, la déphosphorylation d'H4S1ph permet la libération des queues, alors accessibles aux complexes HAT. Enfin, la dégradation conjointe des HDAC et la potentialisation de HAT permet l'amplification de la dynamique d'acétylation des histones.

- L'acétylation des histones participe à la déstabilisation des nucléosomes

L'hyperacétylation des histones au cours de la spermiogénèse est un phénomène conservé chez de nombreuses espèces. Chez la souris, la vague d'acétylation commence dans les spermatides allongées dans lesquelles la transcription est totalement éteinte. Dans les cellules somatiques, l'acétylation des histones est associée à l'activation de la transcription et à l'incorporation des histones lors de la réplication de l'ADN. De façon opposée, l'acétylation dans les spermatides allongées n'est ni associée à la transcription ni à la réplication de l'ADN. L'acétylation coïncide avec l'échange des histones par les protéines de transitions qui à terme seront elles-mêmes remplacées par les protamines dans les spermatides condensées. Cette concomitance suggère que l'hyperacétylation des histones à ce stade semble intimement liée à leur remplacement. De nombreux arguments sont en faveur de cette hypothèse. Par exemple, les histones ne sont pas hyperacétylées dans les espèces où elles ne sont pas remplacées, comme chez certains poissons (Kennedy and Davies, 1980, 1981). De plus, la disparition antéropostérieure du signal d'acétylation corrèle très bien avec la direction antéropostérieure de remplacement des histones. Quelques expériences *in vitro* suggèrent que l'acétylation des histones faciliterait leur remplacement par des protéines extrêmement basiques comme les protamines (Oliva et al., 1987). Ces résultats s'accordent avec d'autres expériences montrant

que l'acétylation des histones peut affecter l'organisation d'ordre supérieur de la chromatine, les propriétés du nucléosome, et faciliter l'échange des histones (Garcia-Ramirez et al., 1995).

L'acétylation des histones dans le cœur des nucléosomes favorise leur dissociation grâce à la rupture des liaisons entre ADN et histones. Par exemple, l'acétylation de H3K56 est connue pour déstabiliser le nucléosome et favoriser l'échange des histones. Cette marque d'acétylation est soupçonnée d'être impliquée dans l'assemblage des nucléosomes au cours de la réplication et de la réparation de l'ADN. Par exemple, chez la levure, les mutations K56R (imitant la perte d'acétylation) et K56Q (mimant l'acétylation) empêchent le processus d'assemblage des nucléosomes pendant la réplication et la réparation de l'ADN (Schneider et al 2006 ; Driscoll et al. 2007 ; Han et al. 2007). Au cours de la sporulation, seule la mutation K56R (et K56A), mais pas la mutation K56Q (qui mime l'acétylation), bloque la différenciation des cellules. Il est possible que l'acétylation de H3K56 fournisse une surface d'interaction permettant la stabilisation de facteurs de remodelage. Chez la souris, nous avons montré que cette marque est présente au cours de l'allongement des spermatides et que le premier bromodomaine de BRDT est aussi capable de reconnaître cette modification.

- Le recrutement de facteurs à bromodomaine

L'hyperacétylation des histones marque très certainement les premières étapes de la réorganisation du génome au cours de la spermiogenèse. Cette acétylation pourrait agir comme un signal permettant le recrutement d'une machinerie de remodelage. En effet ces marques pourraient être lues et interprétées par des facteurs spécifiques. Les bromodomains sont connus pour reconnaître les lysines acétylées. Au cours de ma thèse, j'ai cherché à décortiquer le rôle de la protéine à double bromodomaine BRDT. Cette protéine, très conservée au cours de l'évolution, appartient à la famille BET. Chez la souris, elle est exclusivement exprimée au sein des cellules germinales mâles. Elle est également capable de compacter *ex vivo* la totalité de la chromatine des cellules somatiques, lorsqu'une hyperacétylation des histones est induite par un inhibiteur des HDAC, la TSA (Pivot-Pajot et al., 2003). En immunofluorescence, la localisation de BRDT suit exactement le profil de distribution des histones acétylées (Govin et al., 2006). Nous avons pu montrer que le premier bromodomaine de BRDT (BD1) possède une forte affinité pour le motif diacétylé H4 K5ac et K8ac. D'autre part, la délétion du premier bromodomaine de BRDT chez la souris (notée Δ BD1), engendre une stérilité mâle associée à des défauts de compaction de la chromatine au cours de la spermiogenèse.

2. Fonctions de la protéine BRDT au cours de la spermiogenèse

- L'échange des histones par les TP et les protamines

La protéine BRDT pourrait protéger les résidus acétylés par les HAT d'une déacétylation active par les HDAC et, contribuer à la mise en place de la vague d'acétylation des histones. Un rôle similaire des protéines à bromodomaine a été montré pour l'homologue de BRDT chez la levure, Bdf1 (Ladurner et al., 2003). D'autre part le couplage de bromodomaines à une activité HAT peut permettre d'établir une acétylation "en cascade". Cependant, chez les souris Δ BD1, la vague d'acétylation a toujours lieu et n'est pas perturbée. Le premier bromodomaine de BRDT, BD1, n'est donc pas impliqué dans l'induction de vague d'acétylation post-méiotique.

Chez la levure la protéine à double bromodomaine Bdf1 interagit avec l'histone chaperonne CIA/Asf1 et permet l'enlèvement des histones acétylés pour faciliter la liaison du complexe transcriptionnel (Akai et al., 2010). De façon similaire, BRDT pourrait participer à l'enlèvement des histones hyperacétylées et à l'incorporation des protéines de transition (TP) et des protamines. Par exemple, chez les souris Δ BD1, bien que les TP et les protamines soient synthétisées, elles restent dans le cytoplasme et les régions périnucléaires. BD1 est donc indispensable pour réguler l'échange des histones par les TP, ainsi que l'assemblage ultérieur des protamines. Il est possible qu'un code histone régit cet enlèvement. Par exemple, dans les spermatides condensées, les marques d'acétylation de H4K8 et H4K12 sont retrouvées au sein des zones d'hétérochromatine et persistent dans les spermatozoïdes. BRDT est localisé au sein de ces zones et reconnaît la diacétylation de H4K5 et H4K8. On peut imaginer que BRDT participe uniquement au démantèlement des nucléosomes contenant cette diacétylation et permet ainsi aux nucléosomes possédant les marques d'acétylation H4K8 et H4K12 de persister dans les spermatozoïdes. Chez la levure, la protéine à bromodomaines de la famille BET, Bdf1 pourrait également être impliquée dans la compaction de la chromatine, pendant la phase post-méiotique de la sporulation, en coopération avec l'hyperacétylation des histones. La perte de Bdf1 chez la levure provoque un blocage des cellules en méiose. Il serait intéressant de voir si la perte du premier bromodomaine de Bdf1 pourrait induire un blocage plus tardif, dans les phases post-méiotiques de la sporulation comme chez les souris Δ BD1.

Afin de mieux comprendre comment cet échange a lieu, il est important de connaître les partenaires de BRDT impliqués dans ce remodelage de la chromatine. Au cours de ma thèse j'ai réalisé des expériences visant à caractériser le complexe de remodelage de la chromatine post-méiotique. Les analyses d'extraits testiculaires de cellules post-méiotiques en gel filtration montrent l'existence d'un complexe de haut poids moléculaire (environ 600kDa) contenant BRDT et des protéines basiques comme les TP et les variants d'histones comme TH2B et H2AL1/L2 (données non présentées). La chromatographie par échange d'ions puis la capture de BRDT grâce à un peptide histone H4 hyperacétylé permet la co-capture de chaperonnes comme Nap1L4 et Asf1. L'interaction de BRDT avec Asf1 a également pu être

observée *in vitro* et pourrait participer à l'échange des histones hyperacétylées comme cela à été montré chez la levure (Akai et al., 2010). D'autres expériences de purification de BRDT couplées à l'analyse en spectrométrie de masse ont permis de découvrir une potentielle association de BRDT à des protéines de la matrice nucléaire comme SAFB2. Les expériences préliminaires de recherches de partenaires de BRDT suggèrent que cette protéine agit au sein d'un complexe macromoléculaire contenant des chaperonnes et des protéines de la matrice nucléaire permettant l'échange des histones acétylées par les protéines de transition et les protéines de transition par les protamines. Pour dissocier les interactions fortes entre ADN et histones des facteurs de remodelage ATP-dépendants pourraient être impliqués.

La réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse impose à l'ADN d'importants changements biophysiques. En effet, la torsion de l'ADN organisé autour des protamines est moins importante que celle engendrée par la liaison des histones. Au cours de ce remodelage, l'ADN topoisomérases II pourrait soulager les supertours de l'ADN et faciliter le déplacement des histones. L'ADN topoisomérase II est une enzyme associée à la matrice nucléaire qui modifie l'état topologique de l'ADN via une cassure transitoire de l'ADN. Plusieurs études récentes ont montré comment cette enzyme pourrait être impliquée dans la réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse (Meyer-Ficca, 2011 ; Ward, 2011). D'autre part des cassures de l'ADN, probablement générées par les topoisomérases, sont détectées dans les spermatides allongées et condensées (Leduc, 2008). Le dysfonctionnement des topoisomérases pourrait être une source de cassures de l'ADN parfois retrouvées dans des spermatozoïdes anormaux. Les topoisomérases peuvent également être impliquées dans la fragmentation de l'ADN des cellules apoptotiques (Solovyan, 2002). Il est donc possible que ces cassures présentes au sein des spermatozoïdes puissent en fait être le résultat d'une mort programmée des spermatides.

L'échange des histones semble être la conséquence de plusieurs mécanismes conjoints qui participent au démantèlement des nucléosomes et à l'incorporation des protéines de transition puis des protamines. On peut imaginer une succession d'évènement extrêmement bien coordonnés comme l'acétylation des histones et l'incorporation de variants d'histones qui pourrait déstabiliser le nucléosome et un code histone particulier permettant la sélection des nucléosomes à conserver dans les spermatozoïdes et ceux à remplacer. Puis le recrutement de facteurs de remodelage de la chromatine permettant l'éviction des histones et le remplacement par des protéines basiques comme les protéines de transition et les protamines.

Le devenir des histones enlevées est aussi mystérieux. Il est possible que ces histones soient dégradées par le système ubiquitine protéasome. Par exemple, la perte de l'ubiquitine ligase Rnf8 empêche l'enlèvement des histones au cours de la spermiogenèse. Ces histones pourraient aussi être dégradées par des protéases associées à la matrice nucléaire. L'acrosome des spermatides contient de nombreuses protéases, on peut imaginer que les histones sont envoyées dans ce compartiment pour être dégradées. La protéine HIT2 ainsi que des marques d'acétylation ont été détectées par immunofluorescence juste en dessous de l'acrosome au moment de l'enlèvement des histones. Il se peut que cette localisation indique un lieu d'échange permettant une dégradation des histones à proximité, dans l'acrosome. Le

marquage de cette zone peut aussi refléter une différence d'accessibilité des épitopes ou encore un marquage aspécifique liée à une dégradation des épitopes.

- L'incorporation de variants d'histones

Bdf1 chez la levure est impliqué dans l'incorporation du variant d'histone H2AZ. On sait également qu'au cours de la spermatogenèse H2AZ est incorporé au niveau des chromosomes sexuels dans les cellules post-méiotiques (Greaves et al., 2006). Dans les spermatides rondes, la vésicule sexuelle est aussi enrichie en modifications d'histones comme l'acétylation qui pourrait permettre le recrutement de BRDT et l'incorporation du variant H2AZ. Chez les souris Δ BD1, H2AZ est bien incorporé au niveau des chromosomes sexuels et, BRDT ne semble donc pas être impliqué dans l'incorporation de ce variant.

D'autre part dans les spermatides condensées des histones acétylées persistent au niveau des zones d'hétérochromatine. C'est à ce moment que les variants d'histones H2AL1/L2 sont incorporées au sein de l'hétérochromatine péricentrique. Au cours de la spermiogenèse, les variants H2AL1/L2 sont incorporés aux nucléosomes et provoquent *in vitro* la déstabilisation de ceux-ci (Govin et al., 2007). Nous avons vu que H2AL1 et H2AL2 ont une région acide réduite. Ces variants pourraient être impliqués dans le phénomène de compaction de la chromatine. Soit en altérant la stabilité des nucléosomes et en facilitant le remplacement des histones par les protéines de transition, soit en facilitant la compaction de la chromatine grâce à la disparition partielle de la région acide, ou encore en servant de surface d'interaction pour des protéines spécifiques comme BRDT par exemple.

Chez les souris Δ BD1, bien que l'échange des histones acétylées par les protéines de transition soit perturbé, les variants H2AL1/L2 sont localisés au niveau des zones d'hétérochromatine. Il serait intéressant de déterminer si l'incorporation de ces variants d'histones est reliée à la dynamique d'acétylation des histones.

Le variant H1T2 présent exclusivement dans les cellules post méiotiques possède une localisation polaire au niveau de la chromatine. On ne connaît pas le rôle de cette localisation mais la perte de cette localisation polaire pourrait refléter un mauvais état de la chromatine. Par exemple la délétion des protéines associées à la chromatine comme Trf2 (Télomere repeat factor 2), qui structure les télomères, engendre un défaut de localisation de H1T2 dans les spermatides rondes.

Chez les souris BD1, la localisation polaire de H1T2 est perturbée dès son apparition dans les spermatides rondes sans que l'on comprenne pourquoi. On peut noter que H1T2 est mal localisée dans les spermatides rondes alors que les problèmes chez ces souris apparaissent plus tardivement au moment de l'acétylation des histones dans les spermatides allongées. Il est possible que BRDT agisse dès les premières phases de la spermiogenèse et participe à l'architecture de la chromatine.

- Conséquences de la dérégulation de l'épigénome spermatique

Les nouvelles techniques d'assistance médicale à la procréation (AMP) ont révolutionné la prise en charge de l'infertilité masculine (Winston et Hardy, 2002). Les techniques de fécondation *in vitro* (FIV) et de micro-injection de spermatozoïde ou de spermatides dans le cytoplasme ovocytaire (ICSI) ont permis aux hommes, dont la production de spermatozoïdes est sévèrement altérée, d'avoir des enfants. Ainsi, une anomalie génétique ou épigénétique, présente au sein de ces spermatozoïdes, peut être transmise à leur descendance. Plus d'un million d'enfants sont nés dans le monde à l'aide de ces techniques, et différentes études internationales ont analysé les anomalies potentielles présentes chez les enfants (Anastasiou and Mandelbaum, 2006). Bien que certaines études soient contradictoires, et que la fréquence des anomalies soit très faible, la possibilité d'un lien direct avec l'utilisation de ces techniques ne peut être exclue. De plus, il est intéressant de noter que le faible taux d'implantation des embryons reste une des limites majeures de ces techniques. Ces problèmes d'implantation peuvent être expliqués par un développement embryonnaire aberrant, combinant des causes génétiques et/ou épigénétiques.

Brdt est sans doute un facteur clé de la spermatogénèse, car cette protéine est impliquée dans plusieurs étapes de reprogrammation de l'épigénome. L'acétylation d'H4 marque fortement les régions soumises à l'empreinte (ICR) tout au long de la spermatogénèse. Il serait intéressant de déterminer si cette marque recrute des protéines de la famille BET, et notamment Brdt, au niveau des ICR. Il est possible que les membres de la famille BET protègent la chromatine des ICR, qui serait alors maintenue dans une structure nucléosomale dans les spermatozoïdes. En effet, il a déjà été montré qu'une ICR, H19, est enrichie en histones dans les spermatozoïdes (Wykes and Krawetz, 2003). De plus, si les nucléosomes organisant les ICR dans le gamète mâle sont acétylés, des protéines de la famille BET pourraient rester liées à ces régions et les protéger de la déméthylation ou du gain de méthylation. La maintenance des marques de méthylation est importante dans les phases de remodelage de la chromatine au cours de la spermatogénèse, mais aussi à l'intérieur du spermatozoïde et du pronoyau mâle qui doit être protégé de la déméthylation générale du génome paternel lors de la fécondation. De nombreuses études montrent que chez de nombreux hommes infertiles, avec des anomalies morphologiques des spermatozoïdes, le statut de méthylation des ICR est altéré (Delaval and Feil, 2004). Les souris délétées du premier bromodomaine de BRDT possèdent également des spermatozoïdes morphologiquement anormaux mais l'analyse du statut de méthylation des ICR au cours de la spermatogénèse chez ces souris n'a révélé aucune anomalie de l'empreinte (l'analyse de la méthylation de l'ADN du génome entier lors de la spermatogénèse n'est pas présentée).

Ces exemples illustrent le risque potentiel lié à l'utilisation massive des techniques d'AMP. L'information épigénétique établie au cours de la spermatogénèse joue un rôle déterminant pour le développement embryonnaire. A l'intérieur des spermatozoïdes anormaux, les altérations des profils de méthylation, du contenu en histones variant ou en modifications post-traductionnelles pourraient être transmises au zygote via ces techniques. Cependant, les expériences d'injection dans les ovocytes de souris mature, de spermatides rondes ou de

spermatozoïdes montrent que ces deux types de cellules germinales peuvent participer de façon équivalente au développement embryonnaire et peut engendrer une descendance normale et fertile. Cette expérience démontre que l'empreinte (ou l'information épigénétique) présente dans ces cellules germinales immatures est déjà établie avant le début de la spermiogenèse et les étapes de remodelage post-méiotique de la chromatine ne semblent donc pas impliquées dans la mise en place de l'épigénome mâle. En revanche cette réorganisation est importante pour la protection du génome et de l'épigénome mâle.

- Vers un modèle *in vitro* d'échange des histones

BRDT pourrait faciliter l'éviction des histones par une action mécanique dans des cellules somatiques après transfection et induction du remodelage de la chromatine hyperacétylée. Il a d'ailleurs été montré, qu'au cours de la compaction de la chromatine, BRDT est capable d'éjecter les histones de liaison de la chromatine (Govin et al., 2006). BRDT pourrait donc "compresser" la chromatine afin d'extraire les histones hyperacétylées. Les diverses analyses biochimiques que j'ai pu mener n'ont pas donné de preuves directes de l'éviction des histones par BRDT dans un système *ex vivo*. Il est probable que BRDT n'agit pas seul et coopère avec des facteurs spécifiques au sein des cellules germinales pour permettre cet échange.

Afin de mieux comprendre comment BRDT compacte la chromatine acétylée nous avons mené des expériences de FRET entre les protéines BRDT. Nous avons découvert que lors de la compaction les protéines BRDT pourraient se rapprocher et former une sorte de "réseau". En effet, les parties amino- et carboxy- terminales de BRDT interagissent et sont essentielles pour la compaction de la chromatine. La délétion de ces domaines engendre une perte de la capacité de BRDT à compacter la chromatine. De façon surprenante, la délétion de la partie amino-terminale empêche la liaison de BRDT à un peptide d'histone hyperacétylé. Il est possible que cette partie contribue à la stabilité du premier bromodomaine et/ou structure la protéine BRDT dans l'espace pour permettre son interaction à la chromatine acétylée. La partie carboxy-terminale de BRDT contient une série de sérines soumises à phosphorylation. L'absence de phosphorylation n'est pas à l'origine de la perte de fonction de la protéine déléetée de sa partie carboxy-terminale. En effet, la protéine BRDT exprimée dans un système bactérien, dépourvu de système de phosphorylation, est également capable d'induire une compaction de la chromatine *in vitro*. On ne connaît pas le rôle exact de cette modification de BRDT mais elle pourrait réguler son interaction avec d'autres protéines.

3. Fonctions de la protéine BRDT au cours de la méiose

- L'architecture de la chromatine

Nous avons pu montrer que BRDT est fortement exprimé au stade pachytène et qu'elle localise au niveau des complexes synaptonémaux à ce stade. BRDT pourrait participer à l'architecture du complexe synaptonémal, essentiel pour la recombinaison méiotique. Cependant, l'absence de BRDT ne semble pas perturber la formation des complexes synaptonémaux. La vésicule sexuelle, élément caractéristique du stade pachytène est également bien formée chez ces animaux. A priori, les cellules germinales sans BRDT progressent normalement pendant la prophase de méiose et se bloquent au stade diplotène (juste avant les divisions méiotiques). Ces protéines pourraient avoir un rôle architectural prépondérant pendant les divisions méiotiques. Cependant les cellules mitotiques, à la fois chez la levure et chez la souris, n'ont aucun problème de division.

- La régulation des programmes d'expression spermatogénique

La perte du premier bromodomaine de BRDT ne semble pas perturber la progression des cellules germinales durant la méiose. En revanche, l'absence complète de protéine bloque les cellules avant les deux divisions méiotiques en prophase I. De façon surprenante chez la levure, la perte de Bdf1 engendre le même phénotype observé chez la souris BRDT KO. En effet, bien que les complexes synaptonémaux s'assemblent les cellules germinales sont arrêtées avant les divisions méiotiques. Ces protéines pourraient servir de coactivateurs transcriptionnels lors de la méiose pour permettre l'expression de facteurs cruciaux pour la progression méiotique. En effet, BRD4, qui appartient à la même famille que BRDT possède ce rôle : après liaison de BRD4 au niveau des nucléosomes acétylés sur les promoteurs, cette protéine est capable de recruter le complexe pTEFb et l'ARN polymérase II pour stimuler la transcription de gènes spécifiques. La partie carboxy-terminale de BRD4 est identique à celle de BRDT et pourrait recruter de la même façon le complexe pTEFb et la machinerie transcriptionnelle. Des expériences préliminaires suggèrent que BRDT se lie au complexe pTEFb dans les cellules germinales mâles.

Enfin afin de connaître les gènes touchés par la perte de fonction de BRDT nous avons entrepris plusieurs séries d'analyses transcriptomiques à grande échelle. Les premiers résultats obtenus nous montrent que BRDT pourrait réguler le programme d'expression au cours de la spermatogénèse. Par exemple, en activant des gènes essentiels pour la progression méiotique (données non montrées). L'un de ces gènes, la cycline A1 est cruciale pour la progression méiotique et son absence pourrait expliquer à elle seule le phénotype observé en absence de BRDT. En effet, comme pour le KO BRDT, la délétion de la cycline A1 chez la souris engendre un blocage des spermatocytes au stade diplotène alors que les complexes

synaptonémaux sont bien assemblés. De plus on observe, comme dans le KO BRDT, un regroupement anormal des centromères au stade diplotène. Cependant, chez le KO de la cycline A1 aucune phosphorylation de H3S10 n'est détectée alors que dans les BRDT KO cette modification est présente mais largement diminuée.

Afin de comprendre pourquoi l'absence de BRDT provoque la dérégulation de certains gènes il serait intéressant de savoir si BRDT peut se fixer directement à leur promoteur et jouer sur le niveau de transcription. Pour répondre à ces questions, nous sommes à l'heure actuelle en train de réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et de transcription *in vitro*. Cela nous permettra de mieux comprendre comment BRDT régule l'expression de certains gènes au cours de la méiose.

Les souris chimères qui possèdent une version tagguée de BRDT ont un blocage de la spermatogenèse très précoce dès l'entrée en méiose. Ce phénotype est différent de celui des BRDT KO où la spermatogenèse est arrêtée au stade diplotène. Chez les chimères les cellules meurent rapidement par apoptose. Dès 14 jours après la naissance (début du stade spermatocyte pachytène chez la souris), plus aucune cellule n'est observée dans l'épithélium séminal. Chez les chimères les problèmes apparaissent dès que BRDT est exprimée en tout début de la méiose. La protéine tagguée agit comme un dominant négatif c'est à dire qu'elle semble perturber les fonctions de la protéine sauvage chez les chimères. Un faible chimérisme et donc une faible expression de la version tagguée, est suffisante pour induire ce phénotype drastique. Cependant on ne peut pas exclure une expression de BRDT au cours de la spermatogenèse embryonnaire mais nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier d'autres animaux à des stades plus précoces de la spermatogenèse. Chez les KO le phénotype est plus tardif peut-être à cause d'une compensation par les protéines de la famille BET présentes aussi à ces stades.

- Vers un modèle *in vitro* de différenciation des cellules germinales

BRDT semble contrôler l'expression de gènes importants pour la méiose et réprimer des gènes importants pour la totipotence (résultats non montrés). Il est probable que BRDT pourrait permettre la différenciation des cellules germinales en déclanchant des programmes d'expression particuliers. Afin de vérifier cette hypothèse il serait intéressant d'exprimer BRDT dans des cellules souches pour voir si ce facteur est capable de reprogrammer les cellules.

4. Implication de la protéine BRDT dans la fertilité humaine

- Le mutation K61Q

La mutation K61Q a été mise en évidence chez l'homme. Cette lysine présente au niveau du premier bromodomaine de BRDT. Elle est due à un polymorphisme d'un nucléotide (SNP=Single Nucleotide Polymorphism) qui entraîne la mutation de la lysine K61 du premier bromodomaine de BRDT en une glutamine Q. Cette lysine, très conservée, est aussi retrouvée chez la souris et le rat. Cependant la comparaison des séquences protéiques des bromodomaines des membres de la famille BET montre que ce résidu est uniquement présent au sein du premier bromodomaine de BRDT. D'après certaines données du laboratoire ce polymorphisme pourrait être impliqué dans des cas d'infertilité masculine. La mutation K61Q du premier bromodomaine n'entraîne pas de changement majeur dans les propriétés d'association du premier bromodomaine avec les histones H3 et H4. De façon intéressante, cette lysine n'est pas présente dans les autres membres de la famille BET BRD2, BRD3 ou BRD4. Ce résidu particulier pourrait conférer une fonction spécifique à BRDT et à son premier bromodomaine. D'autre part, de nombreux SNP ont été détectés dans la séquence de BRDT. On peut aussi imaginer que certaines de ces variations pourraient perturber la fonction de BRDT.

Variations de séquence de la protéine BRDT humaine. Position, changement de l'acide aminé lié au SNP et références.

BRDT humain sauvage (forme longue) acides aminés 1 à 947

Position acide aminé	Description variants naturels	Référence SNP
1	M → MTCTCRQDSKQLRM	isoforme BRDT NY
2	S → F	[SNP:rs55806733]
6	R → Q	[SNP:rs56273490]
62	K → Q	[SNP:rs10783071]
89	A → V	adénocarcinome gastrique
238	K → N	[SNP:rs1156281]
288	H → Y	carcinome pulmonaire
336	K → T	[SNP:rs1064567]
357	E → K	[SNP:rs34674879]
410	N → K	[SNP:rs3088232]
542	P → A	[SNP:rs55912588]
605	R → Q	[SNP:rs35327986]
696	P → L	[SNP:rs10747493]

- Vers un mécanisme d'autorégulation de la fonction de la protéine BRDT

Il est possible que cette mutation interfère avec la fonction de BRDT. Les études structurales ont montré que ce résidu n'est pas localisé dans le site de fixation des lysines acétylées. De plus, cette mutation ne semble pas perturber la capacité du bromodomaine à reconnaître ses substrats acétylés. La mutation de la lysine en glutamine mime une acétylation constitutive et on peut imaginer que cette acétylation joue sur la liaison de BRDT à la chromatine. En effet, les données structurales suggèrent que ce résidu, localisé à proximité du site de fixation des lysines acétylées, pourrait intervenir sur le positionnement de BRDT sur la chromatine en modulant l'affinité à l'ADN via l'acétylation de ce résidu. D'autre part, la modification de ce résidu pourrait jouer sur la conformation de la protéine pour réguler ses fonctions. Pour répondre à cette question, nous sommes à l'heure actuelle en train de réaliser des expériences de FRET interne sur la protéine, de gel filtration et de digestion tryptique afin d'évaluer les différences d'organisation spatiale de ces protéines.

5. Implication de la protéine BRDT dans les cancers

- Les "Cancer/Testis antigens"

Les mécanismes épigénétiques sont impliqués dans le contrôle à grande échelle de l'expression du génôme. Ils contribuent à la mise en place de profils d'expression de gènes spécifiques de tissus et de types cellulaires. Dans les cellules en cours de différenciation ces mécanismes sont aussi impliqués dans la mise en place et le maintien de la répression d'un grand nombre de gènes. Nous savons maintenant que la transformation oncogénique est presque toujours associée à des anomalies de la signalisation épigénétique, dont certaines, comme les méthylations aberrantes de gènes suppresseurs de tumeur, sont considérées comme des événements oncogènes. Un aspect beaucoup moins étudié de ces dérégulations épigénétiques est l'activation illégitime de gènes tissus-spécifiques dans des cellules pré-cancéreuses et transformées. De nombreuses études rapportent l'activation illégitime de gènes spécifiques des cellules germinales mâles dans plusieurs cancers somatiques. Ces gènes sont décrits sous le nom de gènes "cancer/testis" ou "C/T". Par exemple, la protéine Spo11, qui induit des cassures double brins d'ADN lors de la méiose, est exprimée dans des cellules cancéreuses et pourrait faciliter des translocations chromosomiques (Atanackovic et al., 2011).

- BRDT dans les cancers

Bien que le gène Brdt soit exclusivement exprimé dans le testicule, la présence de l'ARN codant pour Brdt a été rapportée dans 12 cas (sur 47 étudiés) de cancers du poumon non à petites cellules, et dans un cas de carcinome à cellules squameuses (Scanlan et al, 2000). A ce titre, Brdt est classé comme gène C/T. L'expression illégitime de BRDT dans les cancers broncho-pulmonaires, ainsi que sa capacité extraordinaire à remodeler et à condenser la chromatine acétylée, suggèrent qu'elle pourrait être impliquée dans la genèse et/ou l'évolution de ces cancers. Les mécanismes moléculaires impliqués restent cependant à être élucidé. A l'heure actuelle, on recense un peu plus d'une quarantaine de familles de gènes C/T, comprenant environ une centaine de gènes au total, dont l'expression anormale a été directement identifiée dans des cancers somatiques. Dans certaines tumeurs, le niveau de cette expression illégitime peut atteindre 20 à 30% du niveau d'expression testiculaire.

- Vers une thérapie ciblée

Les gènes C/T, dont l'expression est normalement restreinte aux cellules de la spermatogenèse méiotique ou post-méiotique, cellules protégées du système immunitaire par la barrière hémato-testiculaire, ont un statut immunitaire tout à fait particulier. En effet, dans des conditions physiologiques normales, en l'absence de cancer somatique ou d'effraction de la barrière hémato-testiculaire, les produits de ces gènes restent inconnus du système immunitaire autologue. En revanche, lorsqu'ils sont exprimés de manière aberrante dans les cancers somatiques, ils peuvent être reconnus par le système immunitaire qui les considère comme des antigènes étrangers, induisant une réaction cellulaire et/ou humorale contre les cellules tumorales. Ainsi, du fait de leur expression tissulaire restreinte et de leur caractère très immunogène, les gènes C/T et leurs produits constituent non seulement des marqueurs potentiels de choix pour le diagnostic et le suivi des cancers, mais aussi des cibles idéales pour une immunothérapie anticancéreuse.

Nous avons pu montrer que des cellules somatiques exprimant la protéine BRDT de manière illégitime ou induite par transfection prolifèrent normalement et se portent bien. En revanche, lorsqu'on induit une hyperacétylation des histones par un traitement aux inhibiteurs des HDAC (HDACi), BRDT interagit et compacte la chromatine hyperacétylée. Nous pensons que dans les cellules somatiques, en l'absence du reste de la machinerie de remplacement des histones hyperacétylées, l'action initiée par BRDT aboutit à un effondrement de la chromatine. Les cellules avec la chromatine ainsi compactée n'arrivent pas à survivre et meurent rapidement. Selon ces données, on peut prévoir que les patients dont les cellules cancéreuses expriment des quantités importantes de BRDT pourraient être particulièrement sensibles à un traitement par les inhibiteurs des HDAC utilisés en thérapie anti-cancéreuse comme le Vorinostat. Ceci a son importance car à l'heure actuelle, les cliniciens ne sont pas capables de prédire la réponse ou non des patients qui seront traités par ces inhibiteurs.

6. Conclusion générale

Il est connu depuis plus de vingt ans que l'information épigénétique portée par le gamète maternel et le gamète paternel est indispensables au bon développement de l'embryon, car un zygote formé avec deux pronoyaux de même origine ne se développe pas normalement (McGrath and Solter, 1984 ; Surani et al., 1984). L'information portée par l'épigénome des gamètes joue un rôle clé lors du développement embryonnaire. Les cellules germinales reprogramment intégralement leur épigénome lors de leur différenciation en gamète. Malgré l'importance de cette restructuration, très peu de données apportent une vision fonctionnelle et intégrée des mécanismes mis en jeu.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont révélé plusieurs aspects de la dynamique de l'épigénome lors de la spermatogénèse. Le code des histones au cours de la spermatogénèse a été précisé, et laisse présager de nouvelles fonctions associées à ces marques. L'étude des mécanismes régissant l'échange des histones au cours de la spermiogénèse a permis la découverte de nouveaux mécanismes et de nombreuses protéines, associées à la chromatine au cours de ces phases. Enfin, la caractérisation d'un facteur pouvant contrôler le devenir cellulaire ouvre de nombreuses pistes d'études sur les programmes de différenciation des cellules germinales mâles.

Les implications médicales de ces travaux de recherche fondamentale concernent non seulement les pratiques médicales à l'assistance médicale à la procréation, mais aussi la lutte contre le cancer, ou le développement de nouvelles technologies comme le clonage thérapeutique et la différenciation *in vitro* de cellules germinales.

CHAPITRE 4

BIBLIOGRAPHIE

Adham, I.M., Nayernia, K., Burkhardt-Gottges, E., Topaloglu, O., Dixkens, C., Holstein, A.F., and Engel, W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Molecular human reproduction* 7, 513-520.

Akai, Y., Adachi, N., Hayashi, Y., Eitoku, M., Sano, N., Natsume, R., Kudo, N., Tanokura, M., Senda, T., and Horikoshi, M. (2010). Structure of the histone chaperone CIA/ASF1-double bromodomain complex linking histone modifications and site-specific histone eviction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 8153-8158.

Alekseev, O.M., Widgren, E.E., Richardson, R.T., and O'Rand, M.G. (2005). Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *The Journal of biological chemistry* 280, 2904-2911.

Amor, D.J., Bentley, K., Ryan, J., Perry, J., Wong, L., Slater, H., and Choo, K.H. (2004). Human centromere repositioning "in progress". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6542-6547.

Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., *et al.* (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442, 203-207.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10148-10152.

Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M., Steger, K., Tedder, P., and Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome research* 19, 1338-1349.

Aul, R.B., and Oko, R.J. (2001). The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Developmental biology* 239, 376-387.

Baarends, W.M., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J.W., Schoenmakers, S., Sun, Z.W., and Grootegeed, J.A. (2007). Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. *Journal of cell science* 120, 1841-1851.

Baarends, W.M., Wassenaar, E., Hoogerbrugge, J.W., van Cappellen, G., Roest, H.P., Vreeburg, J., Ooms, M., Hoeijmakers, J.H., and Grootegeed, J.A. (2003). Loss of HR6B ubiquitin-conjugating activity results in damaged synaptonemal complex structure and increased crossing-over frequency during the male meiotic prophase. *Molecular and cellular biology* 23, 1151-1162.

Balhorn, R., Brewer, L., and Corzett, M. (2000). DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Molecular reproduction and development* 56, 230-234.

Balhorn, R., Gledhill, B.L., and Wyrobek, A.J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry* 16, 4074-4080.

Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C., and Wyrobek, A.J. (1984). DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Experimental cell research* 150, 298-308.

Banerjee, S., and Smallwood, A. (1998). Chromatin modification of imprinted H19 gene in mammalian spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 50, 474-484.

Barlow, C., Liyanage, M., Moens, P.B., Tarsounas, M., Nagashima, K., Brown, K., Rottinghaus, S., Jackson, S.P., Tagle, D., Ried, T., *et al.* (1998). Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Development* 125, 4007-4017.

Barton, S.C., Surani, M.A., and Norris, M.L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311, 374-376.

Batova, I.N., Richardson, R.T., Widgren, E.E., and O'Rand, M.G. (2000). Analysis of the autoimmune epitopes on human testicular NASP using recombinant and synthetic peptides. *Clinical and experimental immunology* 121, 201-209.

Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and de Massy, B. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 327, 836-840.

Bellani, M.A., Romanienko, P.J., Cairatti, D.A., and Camerini-Otero, R.D. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *Journal of cell science* 118, 3233-3245.

Bellve, A.R. (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods in enzymology* 225, 84-113.

Bellve, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., and Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *The Journal of cell biology* 74, 68-85.

Berghoff, W.J., Pietrzak, W.S., and Rhodes, R.D. (2006). Platelet-rich plasma application during closure following total knee arthroplasty. *Orthopedics* 29, 590-598.

Bharath, M.M., Chandra, N.R., and Rao, M.R. (2003). Molecular modeling of the chromosome particle. *Nucleic acids research* 31, 4264-4274.

Biggiogera, M., Muller, S., Courtens, J.L., Fakan, S., and Romanini, M.G. (1992). Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *Microscopy research and technique* 20, 259-267.

Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Geli, V., and Nicolas, A. (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *The EMBO journal* 28, 99-111.

Bourc'his, D., and Bestor, T.H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96-99.

Brewer, L., Corzett, M., and Balhorn, R. (2002). Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry* 277, 38895-38900.

Brewer, L., Corzett, M., Lau, E.Y., and Balhorn, R. (2003). Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *The Journal of biological chemistry* 278, 42403-42408.

Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11298-11302.

Brock, W.A., Trostle, P.K., and Meistrich, M.L. (1980). Meiotic synthesis of testis histones in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 371-375.

Bruce, K., Myers, F.A., Mantouvalou, E., Lefevre, P., Greaves, I., Bonifer, C., Tremethick, D.J., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. (2005). The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucleic acids research* 33, 5633-5639.

Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schubeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology* 17, 679-687.

Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., and Braun, R.E. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature genetics* 36, 647-652.

Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 276, 42462-42467.

Burns, K.H., Viveiros, M.M., Ren, Y., Wang, P., DeMayo, F.J., Frail, D.E., Eppig, J.J., and Matzuk, M.M. (2003). Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 300, 633-636.

Busslinger, M., Hurst, J., and Flavell, R.A. (1983). DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* 34, 197-206.

Capozzi, J.D., Rhodes, R., and Gantsoudes, G. (2006). Professionalism in the face of adversity. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 88, 1674-1676.

Catena, R., Ronfani, L., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2006). Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Developmental biology* 296, 231-238.

Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature cell biology* 5, 675-679.

Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., *et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296, 922-927.

Chargaff, E., Magasanik, B., and *et al.* (1949). The nucleotide composition of ribonucleic acids. *Journal of the American Chemical Society* 71, 1513.

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, 82-86.

Chua, P., and Roeder, G.S. (1995). Bdf1, a yeast chromosomal protein required for sporulation. *Molecular and cellular biology* 15, 3685-3696.

Clermont, Y., and Perey, B. (1957a). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *The American journal of anatomy* 100, 241-267.

Clermont, Y., and Perey, B. (1957b). The stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat: practical definitions in PA-Schiff-hematoxylin and hematoxylin-eosin stained sections. *Revue canadienne de biologie / editee par l'Universite de Montreal* 16, 451-462.

Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M., Sukumaran, D.K., and Zarbock, J. (1987). The polypeptide fold of the globular domain of histone H5 in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *The EMBO journal* 6, 1833-1842.

Cocquet, J., Ellis, P.J., Yamauchi, Y., Mahadevaiah, S.K., Affara, N.A., Ward, M.A., and Burgoyne, P.S. (2009). The multicopy gene Sly represses the sex chromosomes in the male mouse germline after meiosis. *PLoS biology* 7, e1000244.

Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (2001). MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *The Journal of biological chemistry* 276, 21776-21784.

Costoya, J.A., Hobbs, R.M., Barna, M., Cattoretti, G., Manova, K., Sukhwani, M., Orwig, K.E., Wolgemuth, D.J., and Pandolfi, P.P. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature genetics* 36, 653-659.

Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H., and Evans, M.J. (1999). A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Human molecular genetics* 8, 2489-2495.

Courtens, J.L., and Loir, M. (1981). The spermatid manchette of mammals: formation and relations with the nuclear envelope and the chromatin. *Reproduction, nutrition, development* 21, 467-477.

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *The Biochemical journal* 342 (Pt 2), 249-268.

De Koning, L., Corpet, A., Haber, J.E., and Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nature structural & molecular biology* 14, 997-1007.

de Rooij, D.G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121, 347-354.

de Rooij, D.G., and Grootegeed, J.A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Current opinion in cell biology* 10, 694-701.

de Rooij, D.G., Okabe, M., and Nishimune, Y. (1999). Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, Sl17H/Sl17H, and cryptorchid mice. *Biology of reproduction* 61, 842-847.

de Rooij, D.G., and Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of andrology* 21, 776-798.

de Vries, F.A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W.M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J.G., van Zeeland, A.A., Heyting, C., and Pastink, A. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes & development* 19, 1376-1389.

Delaval, K., and Feil, R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current opinion in genetics & development* 14, 188-195.

Delaval, K., Govin, J., Cerqueira, F., Rousseaux, S., Khochbin, S., and Feil, R. (2007). Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *The EMBO journal* 26, 720-729.

Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Rutten, T., Fuchs, J., Ashtiyani, R.K., Lein, S., Fischer, A., Reuter, G., and Houben, A. (2009). Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59, 221-230.

Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental cell* 2, 819-830.

Denis, G.V., McComb, M.E., Faller, D.V., Sinha, A., Romesser, P.B., and Costello, C.E. (2006). Identification of transcription complexes that contain the double bromodomain protein Brd2 and chromatin remodeling machines. *Journal of proteome research* 5, 502-511.

Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8758-8763.

Dey, A., Nishiyama, A., Karpova, T., McNally, J., and Ozato, K. (2009). Brd4 marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription. *Molecular biology of the cell* 20, 4899-4909.

Digan, M.E., Haynes, S.R., Mozer, B.A., Dawid, I.B., Forquignon, F., and Gans, M. (1986). Genetic and molecular analysis of fs(1)h, a maternal effect homeotic gene in Drosophila. *Developmental biology* 114, 161-169.

Drennan, K.J., Linnemann, A.K., Platts, A.E., Heng, H.H., Armant, D.R., and Krawetz, S.A. (2010). Nuclear matrix association: switching to the invasive cytotrophoblast. *Placenta* 31, 365-372.

Dym, M. (1976). The mammalian rete testis--a morphological examination. *The Anatomical record* 186, 493-523.

Eberharter, A., and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO reports* 3, 224-229.

Eddy, E.M. (2002). Male germ cell gene expression. *Recent progress in hormone research* 57, 103-128.

Fan, J.Y., Rangasamy, D., Luger, K., and Tremethick, D.J. (2004). H2A.Z alters the nucleosome surface to promote HP1alpha-mediated chromatin fiber folding. *Molecular cell* 16, 655-661.

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, 811-818.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for

chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental cell* 4, 497-508.

Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, R.S., Rushton, B., Levitt, M., and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* 269, 29-36.

Fischle, W., Tseng, B.S., Dormann, H.L., Ueberheide, B.M., Garcia, B.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Funabiki, H., and Allis, C.D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116-1122.

Florence, B., and Faller, D.V. (2001). You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6, D1008-1018.

Fournier, A., McLeer-Florin, A., Lefebvre, C., Duley, S., Barki, L., Ribeyron, J., Alboukadel, K., Hamaidia, S., Granjon, A., Gressin, R., *et al.* (2010). 1q12 chromosome translocations form aberrant heterochromatic foci associated with changes in nuclear architecture and gene expression in B cell lymphoma. *EMBO molecular medicine* 2, 159-171.

Gall, J.G., and Murphy, C. (1998). Assembly of lampbrush chromosomes from sperm chromatin. *Molecular biology of the cell* 9, 733-747.

Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* 270, 17923-17928.

Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M., and Tam, P.P. (1998). Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Molecular and cellular biology* 18, 3350-3356.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., and Bradbury, E.M. (1990). Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *The Journal of biological chemistry* 265, 20662-20666.

Germond, J.E., Bellard, M., Oudet, P., and Chambon, P. (1976). Stability of nucleosomes in native and reconstituted chromatins. *Nucleic acids research* 3, 3173-3192.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews Genetics* 10, 94-108.

Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Yau, P.M., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *The Journal of cell biology* 151, 1591-1598.

Godde, J.S., and Ura, K. (2008). Cracking the enigmatic linker histone code. *Journal of biochemistry* 143, 287-293.

Godmann, M., Auger, V., Ferraroni-Aguiar, V., Di Sauro, A., Sette, C., Behr, R., and Kimmins, S. (2007). Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of reproduction* 77, 754-764.

Golan, R., Cooper, T.G., Oschry, Y., Oberpenning, F., Schulze, H., Shochat, L., and Lewin, L.M. (1996). Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod* 11, 1457-1462.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry* 74, 481-514.

Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *European journal of biochemistry / FEBS* 271, 3459-3469.

Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., *et al.* (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *The Journal of cell biology* 176, 283-294.

Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006). The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing [corrected] facultative heterochromatin [corrected] following meiosis. *Molecular and cellular biology* 26, 5394-5405.

Groudine, M., and Weintraub, H. (1981). Activation of globin genes during chicken development. *Cell* 24, 393-401.

Hamer, G., Kal, H.B., Westphal, C.H., Ashley, T., and de Rooij, D.G. (2004). Ataxia telangiectasia mutated expression and activation in the testis. *Biology of reproduction* 70, 1206-1212.

Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473-478.

Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* 111, 369-379.

Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Kihara, K., and Oshima, H. (2002). Involvement of apoptosis in the control of Sertoli and pre-meiotic germ cell numbers in the developing rabbit testis. *Andrologia* 34, 34-40.

Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *European journal of cell biology* 79, 950-960.

Hershey, A.D., and Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology* 36, 39-56.

Heun, P., Erhardt, S., Blower, M.D., Weiss, S., Skora, A.D., and Karpen, G.H. (2006). Mislocalization of the *Drosophila* centromere-specific histone CID promotes formation of functional ectopic kinetochores. *Developmental cell* 10, 303-315.

Hewish, D.R., and Burgoyne, L.A. (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochemical and biophysical research communications* 52, 504-510.

Holdcraft, R.W., and Braun, R.E. (2004a). Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* 131, 459-467.

Holdcraft, R.W., and Braun, R.E. (2004b). Hormonal regulation of spermatogenesis. *International journal of andrology* 27, 335-342.

Houzelstein, D., Bullock, S.L., Lynch, D.E., Grigorieva, E.F., Wilson, V.A., and Beddington, R.S. (2002). Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4. *Molecular and cellular biology* 22, 3794-3802.

Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., Redward, S., MacDonald, A.C., Kalitsis, P., and Choo, K.H. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1148-1153.

Hoyer-Fender, S., Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (2000). Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Experimental cell research* 258, 254-260.

Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.S., Brady, J.N., and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Molecular cell* 19, 523-534.

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, 6165-6177.

Jeanmougin, F., Wurtz, J.M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends in biochemical sciences* 22, 151-153.

Jia, S., Kobayashi, R., and Grewal, S.I. (2005). Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Ctr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nature cell biology* 7, 1007-1013.

Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes & development* 21, 1519-1529.

Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2004). CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biology of reproduction* 70, 70-75.

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

Kennedy, B.P., and Davies, P.L. (1980). Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *The Journal of biological chemistry* **255**, 2533-2539.

Kennedy, B.P., and Davies, P.L. (1981). Phosphorylation of a group of high molecular weight basic nuclear proteins during spermatogenesis in the winter flounder. *The Journal of biological chemistry* **256**, 9254-9259.

Khadake, J.R., and Rao, M.R. (1995). DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* **34**, 15792-15801.

Khalil, A.M., Boyar, F.Z., and Driscoll, D.J. (2004). Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 16583-16587.

Khalil, A.M., and Wahlestedt, C. (2008). Epigenetic mechanisms of gene regulation during mammalian spermatogenesis. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **3**, 21-28.

Klattenhoff, C., and Theurkauf, W. (2008). Biogenesis and germline functions of piRNAs. *Development* **135**, 3-9.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* **31**, 89-97.

Kornberg, R.D., and Thomas, J.O. (1974). Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* **184**, 865-868.

Kotaja, N., and Sassone-Corsi, P. (2007). The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**, 85-90.

Kouznetsova, A., Novak, I., Jessberger, R., and Hoog, C. (2005). SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *Journal of cell science* **118**, 2271-2278.

Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W.L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C.D., Guacci, V., Khochbin, S., *et al.* (2006). Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes & development* **20**, 2580-2592.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular cell* **12**, 1565-1576.

Kundu, T.K., and Rao, M.R. (1995). DNA condensation by the rat spermatidal protein TP2 shows GC-rich sequence preference and is zinc dependent. *Biochemistry* **34**, 5143-5150.

Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., *et al.* (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* **131**, 839-849.

Ladurner, A.G., Inouye, C., Jain, R., and Tjian, R. (2003). Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Molecular cell* **11**, 365-376.

Lalli, M., and Clermont, Y. (1981). Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. *The American journal of anatomy* **160**, 419-434.

Latham, J.A., and Dent, S.Y. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nature structural & molecular biology* **14**, 1017-1024.

LeRoy, G., Rickards, B., and Flint, S.J. (2008). The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Molecular cell* **30**, 51-60.

Lewis, J.D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M.J., Chiva, M., and Ausio, J. (2004). Histone H1 and the origin of protamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 4148-4152.

Li, A., Eirin-Lopez, J.M., and Ausio, J. (2005). H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *83*, 505-515.

Lin, Q., Inselman, A., Han, X., Xu, H., Zhang, W., Handel, M.A., and Skoultschi, A.I. (2004). Reductions in linker histone levels are tolerated in developing spermatocytes but cause changes in specific gene expression. *The Journal of biological chemistry* *279*, 23525-23535.

Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, 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*, 1386-1390.

Lorincz, M.C., Dickerson, D.R., Schmitt, M., and Groudine, M. (2004). Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology* *11*, 1068-1075.

Loveland, K.L., and Schlatt, S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *The Journal of endocrinology* *153*, 337-344.

Lu, L.Y., Wu, J., Ye, L., Gavrilina, G.B., Saunders, T.L., and Yu, X. (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Developmental cell* *18*, 371-384.

Luger, K., Mader, 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*, 251-260.

Lusser, A., and Kadonaga, J.T. (2004). Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nature methods* *1*, 19-26.

Maekawa, M., Kamimura, K., and Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Archives of histology and cytology* *59*, 1-13.

Mahadevaiah, S.K., Bourc'his, D., de Rooij, D.G., Bestor, T.H., Turner, J.M., and Burgoyne, P.S. (2008). Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *The Journal of cell biology* *182*, 263-276.

Mali, P., Kaipia, A., Kangasniemi, M., Toppari, J., Sandberg, M., Hecht, N.B., and Parvinen, M. (1989). Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reproduction, fertility, and development* *1*, 369-382.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nature structural biology* *10*, 882-891.

Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., and Roldan, E.R. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology letters* *2*, 246-249.

Martelli, A.M., Bortul, R., Fackelmayer, F.O., Tazzari, P.L., Bareggi, R., Narducci, P., and Zwyer, M. (1999). Biochemical and morphological characterization of the nuclear matrix from apoptotic HL-60 cells. *Journal of cellular biochemistry* *72*, 35-46.

Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 2808-2813.

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*, 487-498.

Matangkasombut, O., and Buratowski, S. (2003). Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Molecular cell* *11*, 353-363.

Mavilio, F., Giampaolo, A., Care, A., Migliaccio, G., Calandrini, M., Russo, G., Pagliardi, G.L., Mastroberardino, G., Marinucci, M., and Peschle, C. (1983). Molecular mechanisms of human hemoglobin switching: selective undermethylation and expression of globin genes in embryonic,

fetal, and adult erythroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 6907-6911.

McBride, A.A., McPhillips, M.G., and Oliveira, J.G. (2004). Brd4: tethering, segregation and beyond. *Trends in microbiology* **12**, 527-529.

McGrath, J., and Solter, D. (1984). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* **226**, 1317-1319.

Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**, 483-488.

Meistrich, M.L., Trostle-Weige, P.K., Lin, R., Bhatnagar, Y.M., and Allis, C.D. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular reproduction and development* **31**, 170-181.

Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J.C., and Forejt, J. (2009). A mouse speciation gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science* **323**, 373-375.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303**, 343-348.

Moazed, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* **457**, 413-420.

Morison, I.M., Ramsay, J.P., and Spencer, H.G. (2005). A census of mammalian imprinting. *Trends in genetics : TIG* **21**, 457-465.

Motorin, Y., Lyko, F., and Helm, M. (2010). 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic acids research* **38**, 1415-1430.

Mudrak, O., Tomilin, N., and Zalensky, A. (2005). Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *Journal of cell science* **118**, 4541-4550.

Mueller, J.L., Mahadevaiah, S.K., Park, P.J., Warburton, P.E., Page, D.C., and Turner, J.M. (2008). The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nature genetics* **40**, 794-799.

Mujtaba, S., Zeng, L., and Zhou, M.M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**, 5521-5527.

Nagashima, T., Maruyama, T., Furuya, M., Kajitani, T., Uchida, H., Masuda, H., Ono, M., Arase, T., Ozato, K., and Yoshimura, Y. (2007). Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis. *Molecular human reproduction* **13**, 141-148.

Nakagawa, T., Nabeshima, Y., and Yoshida, S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Developmental cell* **12**, 195-206.

Namekawa, S.H., Park, P.J., Zhang, L.F., Shima, J.E., McCarrey, J.R., Griswold, M.D., and Lee, J.T. (2006). Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Current biology : CB* **16**, 660-667.

Nesterova, T.B., Mermoud, J.E., Hilton, K., Pehrson, J., Surani, M.A., McLaren, A., and Brockdorff, N. (2002). Xist expression and macroH2A1.2 localisation in mouse primordial and pluripotent embryonic germ cells. *Differentiation; research in biological diversity* **69**, 216-225.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., *et al.* (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**, 561-565.

Nishiyama, A., Dey, A., Miyazaki, J., and Ozato, K. (2006). Brd4 is required for recovery from antimicrotubule drug-induced mitotic arrest: preservation of acetylated chromatin. *Molecular biology of the cell* **17**, 814-823.

Okada, M., Okawa, K., Isobe, T., and Fukagawa, T. (2009). CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1. *Molecular biology of the cell* **20**, 3986-3995.

Okada, Y., Scott, G., Ray, M.K., Mishina, Y., and Zhang, Y. (2007). Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* **450**, 119-123.

Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* **183**, 330-332.

Oliva, R., Bazett-Jones, D., Mezquita, C., and Dixon, G.H. (1987). Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry* **262**, 17016-17025.

Oliva, R., and Dixon, G.H. (1991). Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **40**, 25-94.

Ooi, S.L., and Henikoff, S. (2007). Germline histone dynamics and epigenetics. *Current opinion in cell biology* **19**, 257-265.

Orth, J.M., Gunsalus, G.L., and Lamperti, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787-794.

Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2004). Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* **429**, 154.

Ostermeier, G.C., Sargeant, G.A., Yandell, B.S., Evenson, D.P., and Parrish, J.J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of andrology* **22**, 595-603.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* **4**, 281-300.

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**, 32-36.

Papaoiannou, M.D., and Nef, S. (2010). microRNAs in the testis: building up male fertility. *Journal of andrology* **31**, 26-33.

Park, E.J., Chan, D.W., Park, J.H., Oettinger, M.A., and Kwon, J. (2003). DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic acids research* **31**, 6819-6827.

Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* **125**, 703-717.

Pehrson, J.R., Costanzi, C., and Dharia, C. (1997). Developmental and tissue expression patterns of histone macroH2A1 subtypes. *Journal of cellular biochemistry* **65**, 107-113.

Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* **257**, 1398-1400.

Pesce, M., and Scholer, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* **19**, 271-278.

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J., and Scholer, H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mechanisms of development* **71**, 89-98.

Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., *et al.* (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323-337.

Pittoggi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrassi, F., Giordano, R., Magnano, A.R., Lorenzini, R., Lavia, P., and Spadafora, C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *Journal of cell science* **112 (Pt 20)**, 3537-3548.

Plotnikoff, R.C., Bercovitz, K., Rhodes, R.E., Loucaides, C.A., and Karunamuni, N. (2007). Testing a conceptual model related to weight perceptions, physical activity and smoking in adolescents. *Health education research* 22, 192-202.

Pogany, G.C., Corzett, M., Weston, S., and Balhorn, R. (1981). DNA and protein content of mouse sperm. Implications regarding sperm chromatin structure. *Experimental cell research* 136, 127-136.

Pradeepa, M.M., Nikhil, G., Hari Kishore, A., Bharath, G.N., Kundu, T.K., and Rao, M.R. (2009). Acetylation of transition protein 2 (TP2) by KAT3B (p300) alters its DNA condensation property and interaction with putative histone chaperone NPM3. *The Journal of biological chemistry* 284, 29956-29967.

Raisner, R.M., Hartley, P.D., Meneghini, M.D., Bao, M.Z., Liu, C.L., Schreiber, S.L., Rando, O.J., and Madhani, H.D. (2005). Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* 123, 233-248.

Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441, 469-474.

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, 326-338.

Ravnik, S.E., and Wolgemuth, D.J. (1999). Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. *Developmental biology* 207, 408-418.

Reynard, L.N., and Turner, J.M. (2009). Increased sex chromosome expression and epigenetic abnormalities in spermatids from male mice with Y chromosome deletions. *Journal of cell science* 122, 4239-4248.

Rhodes, R.E., Brown, S.G., and McIntyre, C.A. (2006). Integrating the perceived neighborhood environment and the theory of planned behavior when predicting walking in a Canadian adult sample. *American journal of health promotion : AJHP* 21, 110-118.

Richardson, L.L., Pedigo, C., and Ann Handel, M. (2000a). Expression of deoxyribonucleic acid repair enzymes during spermatogenesis in mice. *Biology of reproduction* 62, 789-796.

Richardson, R.T., Batova, I.N., Widgren, E.E., Zheng, L.X., Whitfield, M., Marzluff, W.F., and O'Rand, M.G. (2000b). Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *The Journal of biological chemistry* 275, 30378-30386.

Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145-150.

Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Current opinion in structural biology* 16, 336-343.

Roest, H.P., van Klaveren, J., de Wit, J., van Gurp, C.G., Koken, M.H., Vermey, M., van Roijen, J.H., Hoogerbrugge, J.W., Vreeburg, J.T., Baarends, W.M., *et al.* (1996). Inactivation of the HR23B ubiquitin-conjugating DNA repair enzyme in mice causes male sterility associated with chromatin modification. *Cell* 86, 799-810.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 5858-5868.

Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular cell* 6, 975-987.

Ruggiu, M., Speed, R., Taggart, M., McKay, S.J., Kilanowski, F., Saunders, P., Dorin, J., and Cooke, H.J. (1997). The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389, 73-77.

Schaefer, M., Hagemann, S., Hanna, K., and Lyko, F. (2009). Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. *Cancer research* 69, 8127-8132.

Scholer, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**, 435-439.

Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**, 887-898.

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**, 3507-3515.

Shang, E., Wang, X., Wen, D., Greenberg, D.A., and Wolgemuth, D.J. (2009). Double bromodomain-containing gene Brd2 is essential for embryonic development in mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **238**, 908-917.

Shelby, R.D., Vafa, O., and Sullivan, K.F. (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *The Journal of cell biology* **136**, 501-513.

Shia, W.J., Li, B., and Workman, J.L. (2006). SAS-mediated acetylation of histone H4 Lys 16 is required for H2A.Z incorporation at subtelomeric regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **20**, 2507-2512.

Shibata, Y., Takeshita, H., Sasakawa, N., and Sawa, H. (2010). Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*. *Development* **137**, 1045-1053.

Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* **3**, 155-168.

Shinohara, T., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (1999). beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 5504-5509.

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. *Biology of reproduction* **71**, 1220-1229.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844-847.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Current biology : CB* **14**, 1703-1711.

Siderakis, M., and Tarsounas, M. (2007). Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* **15**, 667-679.

Sinha, A., Faller, D.V., and Denis, G.V. (2005). Bromodomain analysis of Brd2-dependent transcriptional activation of cyclin A. *The Biochemical journal* **387**, 257-269.

Sirotkin, A.M., Edelmann, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, R., and Skoultschi, A.I. (1995). Mice develop normally without the H1(0) linker histone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6434-6438.

Soler, C., Yeung, C.H., and Cooper, T.G. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *International journal of andrology* **17**, 271-278.

Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* **34**, 384-390.

Spadafora, C., Bellard, M., Compton, J.L., and Chambon, P. (1976). The DNA repeat lengths in chromatins from sea urchin sperm and gastrule cells are markedly different. *FEBS letters* **69**, 281-285.

Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 435-459.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* 64, 2390-2396.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., and Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *The Journal of biological chemistry* 279, 27816-27823.

Sullivan, K.F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *The Journal of cell biology* 127, 581-592.

Syed, S.H., Boulard, M., Shukla, M.S., Gautier, T., Travers, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2009). The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome. *Nucleic acids research* 37, 4684-4695.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 10454-10459.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2008). Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic acids research* 36, 2208-2218.

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, 51-61.

Takubo, K., Ohmura, M., Azuma, M., Nagamatsu, G., Yamada, W., Arai, F., Hirao, A., and Suda, T. (2008). Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell stem cell* 2, 170-182.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., *et al.* (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016-1028.

Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., *et al.* (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and cellular biology* 25, 7107-7119.

Tanphaichitr, N., Sobhon, P., Taluppeth, N., and Chalermisarakchai, P. (1978). Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Experimental cell research* 117, 347-356.

Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology* 14, 1025-1040.

Thambirajah, A.A., Dryhurst, D., Ishibashi, T., Li, A., Maffey, A.H., and Ausio, J. (2006). H2A.Z stabilizes chromatin in a way that is dependent on core histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* 281, 20036-20044.

Thiagalingam, S., Cheng, K.H., Lee, H.J., Mineva, N., Thiagalingam, A., and Ponte, J.F. (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* 983, 84-100.

Torres-Padilla, M.E., Bannister, A.J., Hurd, P.J., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2006). Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *The International journal of developmental biology* 50, 455-461.

Tovich, P.R., and Oko, R.J. (2003). Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *The Journal of biological chemistry* 278, 32431-32438.

Toyama, R., Rebbert, M.L., Dey, A., Ozato, K., and Dawid, I.B. (2008). Brd4 associates with mitotic chromosomes throughout early zebrafish embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 1636-1644.

Turner, J.M. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823-1831.

Turner, J.M., Mahadevaiah, S.K., Ellis, P.J., Mitchell, M.J., and Burgoyne, P.S. (2006). Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Developmental cell* 10, 521-529.

Umehara, T., Nakamura, Y., Jang, M.K., Nakano, K., Tanaka, A., Ozato, K., Padmanabhan, B., and Yokoyama, S. (2010). Structural basis for acetylated histone H4 recognition by the human BRD2 bromodomain. *The Journal of biological chemistry* 285, 7610-7618.

Umlauf, D., Goto, Y., Cao, R., Cerqueira, F., Wagschal, A., Zhang, Y., and Feil, R. (2004). Imprinting along the Kcnq1 domain on mouse chromosome 7 involves repressive histone methylation and recruitment of Polycomb group complexes. *Nature genetics* 36, 1296-1300.

van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental biology* 298, 458-469.

van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A., Muller, S., Berden, J.H., Braat, D.D., 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, 1008-1022.

van der Heijden, G.W., Ramos, L., Baart, E.B., van den Berg, I.M., Derijck, A.A., van der Vlag, J., Martini, E., and de Boer, P. (2008). Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC developmental biology* 8, 34.

van der Ploeg, L.H., and Flavell, R.A. (1980). DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell* 19, 947-958.

van Roijen, H.J., Ooms, M.P., Spaargaren, M.C., Baarends, W.M., Weber, R.F., Grootegeed, J.A., and Vreeburg, J.T. (1998). Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue. *Hum Reprod* 13, 1559-1566.

Vergouwen, R.P., Huiskamp, R., Bas, R.J., Roepers-Gajadien, H.L., Davids, J.A., and de Rooij, D.G. (1993). Postnatal development of testicular cell populations in mice. *Journal of reproduction and fertility* 99, 479-485.

Verreault, A., Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1996). Nucleosome assembly by a complex of CAF-1 and acetylated histones H3/H4. *Cell* 87, 95-104.

Waddington, C.H. (1952). Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* 169, 625-626.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.

Ward, W.S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular human reproduction* 16, 30-36.

Ward, W.S., Partin, A.W., and Coffey, D.S. (1989). DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 98, 153-159.

Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 18, 123-131.

Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development* 2, 1136-1143.

Woodland, H.R., and Adamson, E.D. (1977). The synthesis and storage of histones during the oogenesis of *Xenopus laevis*. *Developmental biology* 57, 118-135.

Wu, F., Caron, C., De Robertis, C., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2008). Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *The Journal of reproduction and development* 54, 413-417.

Wu, J.Y., Ribar, T.J., Cummings, D.E., Burton, K.A., McKnight, G.S., and Means, A.R. (2000). Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nature genetics* 25, 448-452.

Wu, S.F., Zhang, H., and Cairns, B.R. (2011). Genes for embryo development are packaged in blocks of multivalent chromatin in zebrafish sperm. *Genome research* 21, 578-589.

Wykes, S.M., and Krawetz, S.A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *The Journal of biological chemistry* 278, 29471-29477.

Wyrobek, A.J., Meistrich, M.L., Furrer, R., and Bruce, W.R. (1976). Physical characteristics of mouse sperm nuclei. *Biophysical journal* 16, 811-825.

Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoto, K., Chuma, S., and Saitou, M. (2011). TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly, and spermiogenesis in mice. *The Journal of cell biology* 192, 781-795.

Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., and Matzuk, M.M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10546-10551.

Yang, X.J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 1076-1087.

Yang, Z., Yik, J.H., Chen, R., He, N., Jang, M.K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Molecular cell* 19, 535-545.

Yelick, P.C., Kwon, Y.H., Flynn, J.F., Borzorgzadeh, A., Kleene, K.C., and Hecht, N.B. (1989). Mouse transition protein 1 is translationally regulated during the postmeiotic stages of spermatogenesis. *Molecular reproduction and development* 1, 193-200.

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, 4683-4688.

Yuan, L., Liu, J.G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Hoog, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular cell* 5, 73-83.

Zalenskaya, I.A., and Zalensky, A.O. (2004). Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 12, 163-173.

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, 509-518.

Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P., and Bradbury, E.M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). *Molecular cloning and characterization. The Journal of biological chemistry* 277, 43474-43480.

Zalensky, A.O., Tomilin, N.V., Zalenskaya, I.A., Teplitz, R.L., and Bradbury, E.M. (1997). Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. *Experimental cell research* 232, 29-41.

Zeng, L., and Zhou, M.M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* 513, 124-128.

Zhang, H., Roberts, D.N., and Cairns, B.R. (2005). Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell* 123, 219-231.

Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S., and Meistrich, M.L. (2004). Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biology of reproduction* 71, 1016-1025.

Zhao, M., Shirley, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H., Weil, M.M., *et al.* (2001). Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and cellular biology* 21, 7243-7255.

Zlatanova, J., and Thakar, A. (2008). H2A.Z: view from the top. *Structure* 16, 166-179.

CHAPITRE 5

ANNEXES

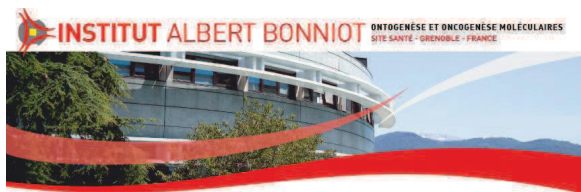
Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Jonathan Gaucher

Institut Albert Bonniot - Centre de Recherche INSERM U823
Equipe 6 : Epigénétique et signalisation cellulaire
Directeur : Saadi Khochbin Directeur de thèse : Sophie Rousseaux

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt :
souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusions/Perspectives

Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

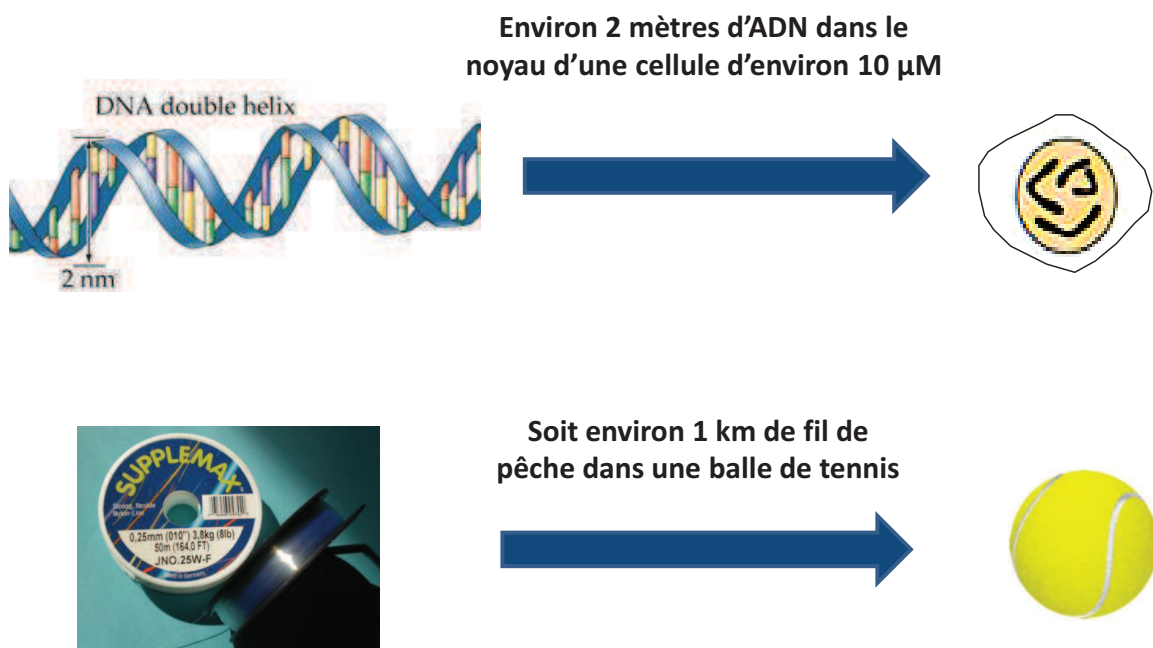
- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

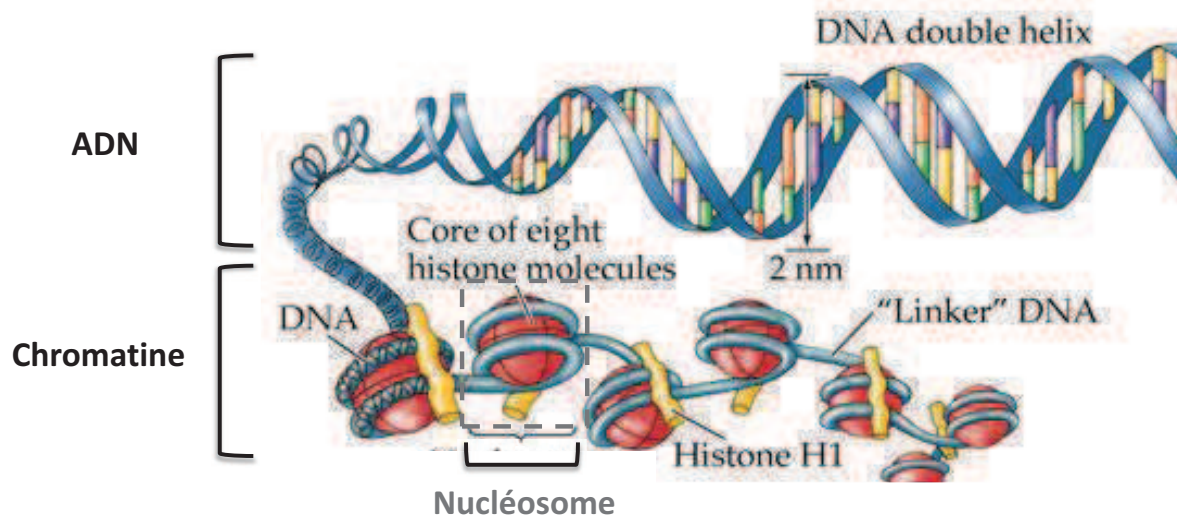
- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusions/Perspectives

Organisation du génome dans le noyau des cellules

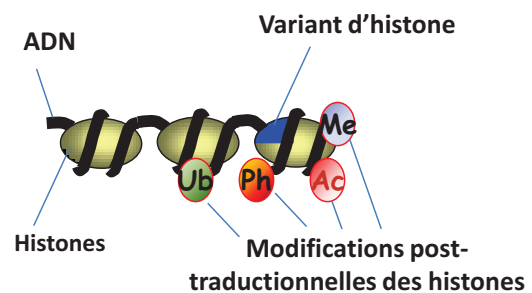


Organisation fonctionnelle de la chromatine



Dynamique et plasticité de la chromatine

Des modifications...

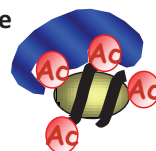


...réversibles...



...lues et interprétées par une machinerie protéique spécifique

Protéine à bromodomaine



Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

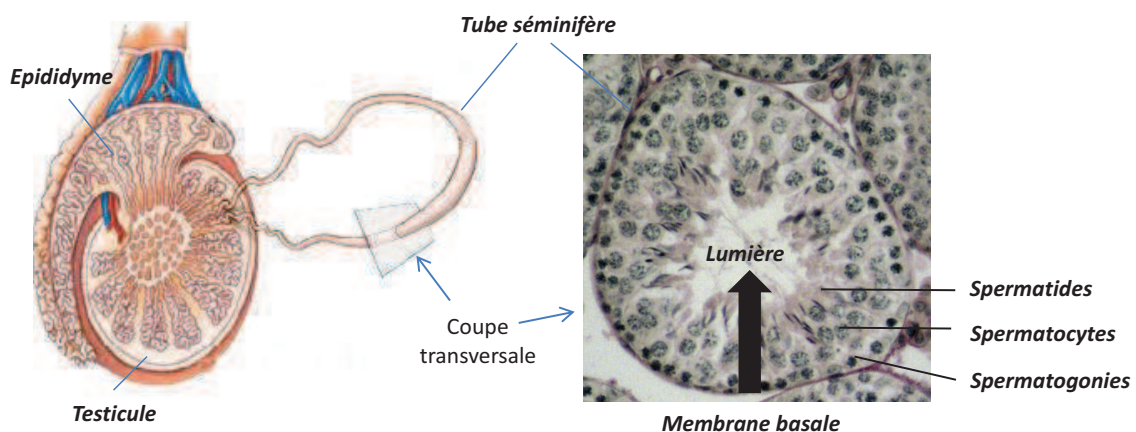
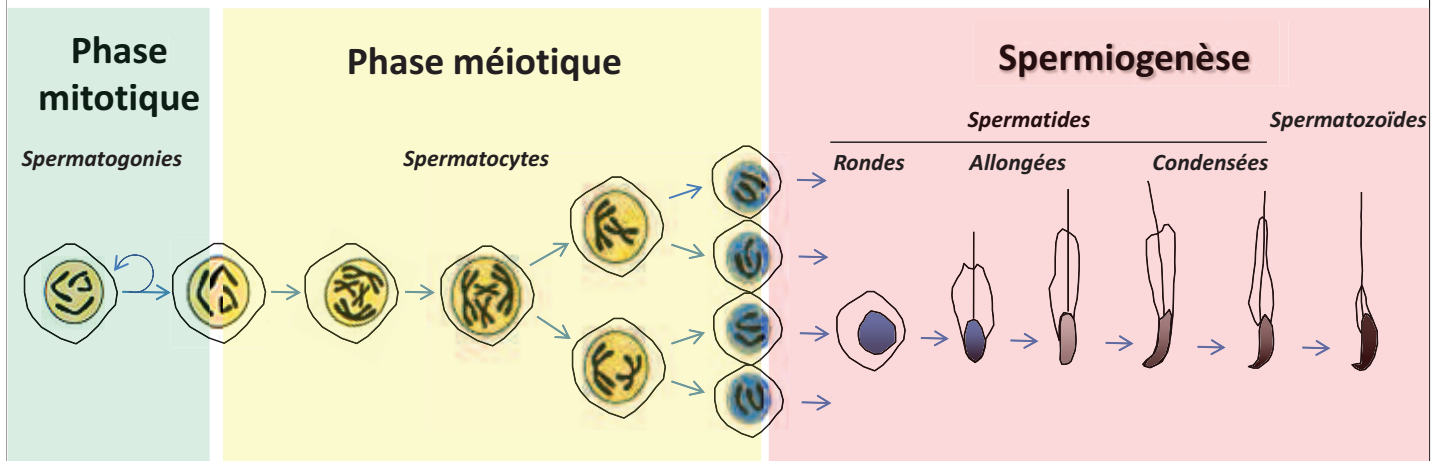
- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

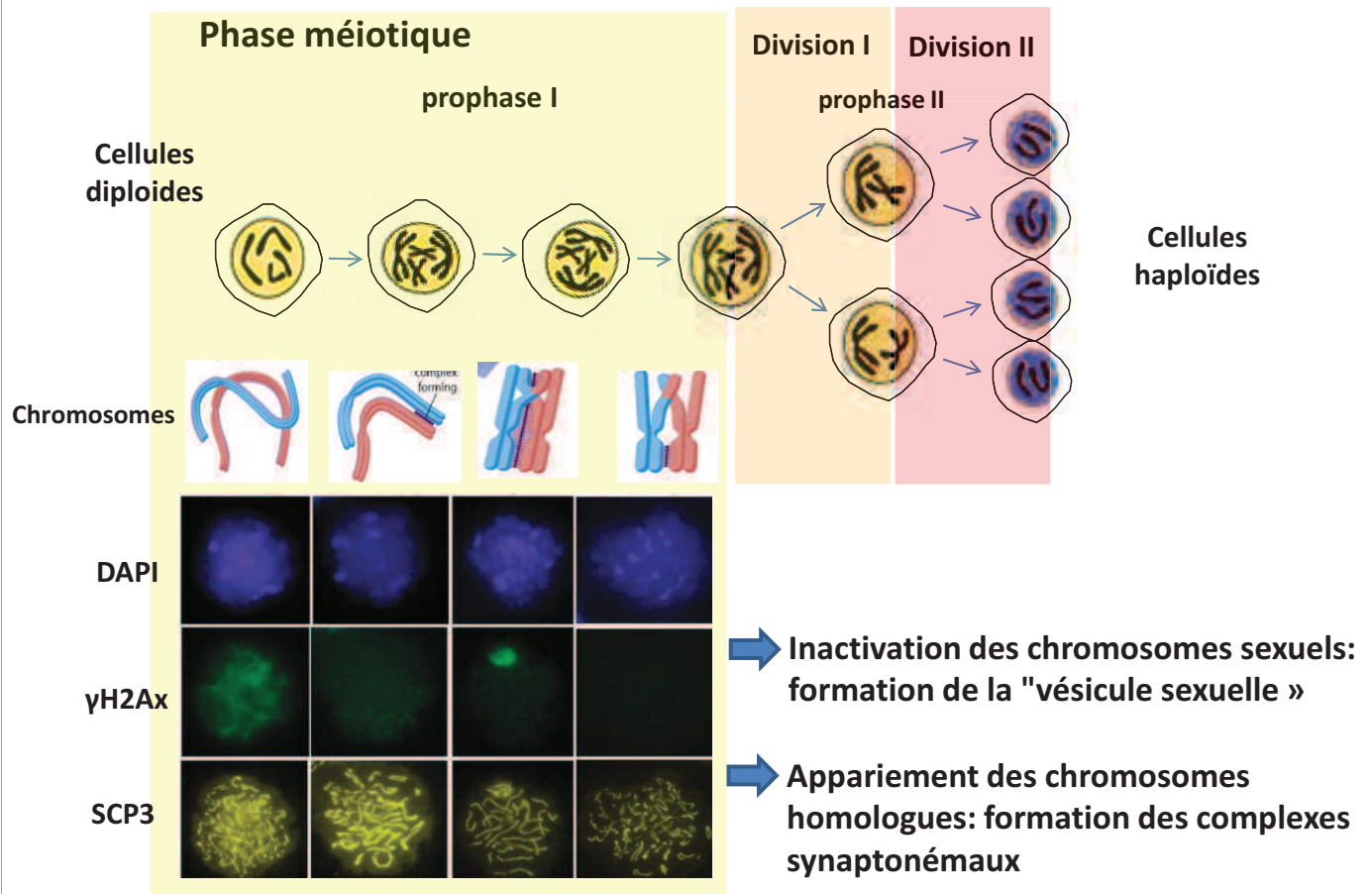
- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusion/Perspectives

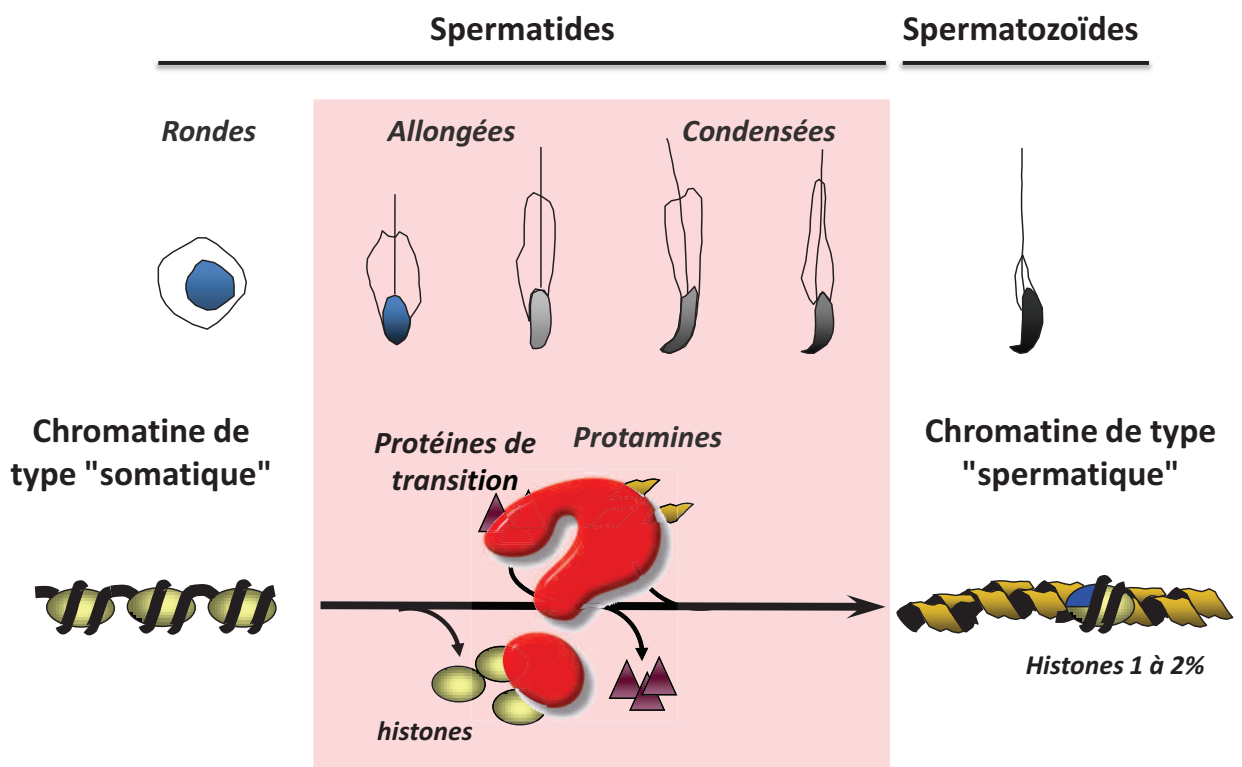
La spermatogenèse



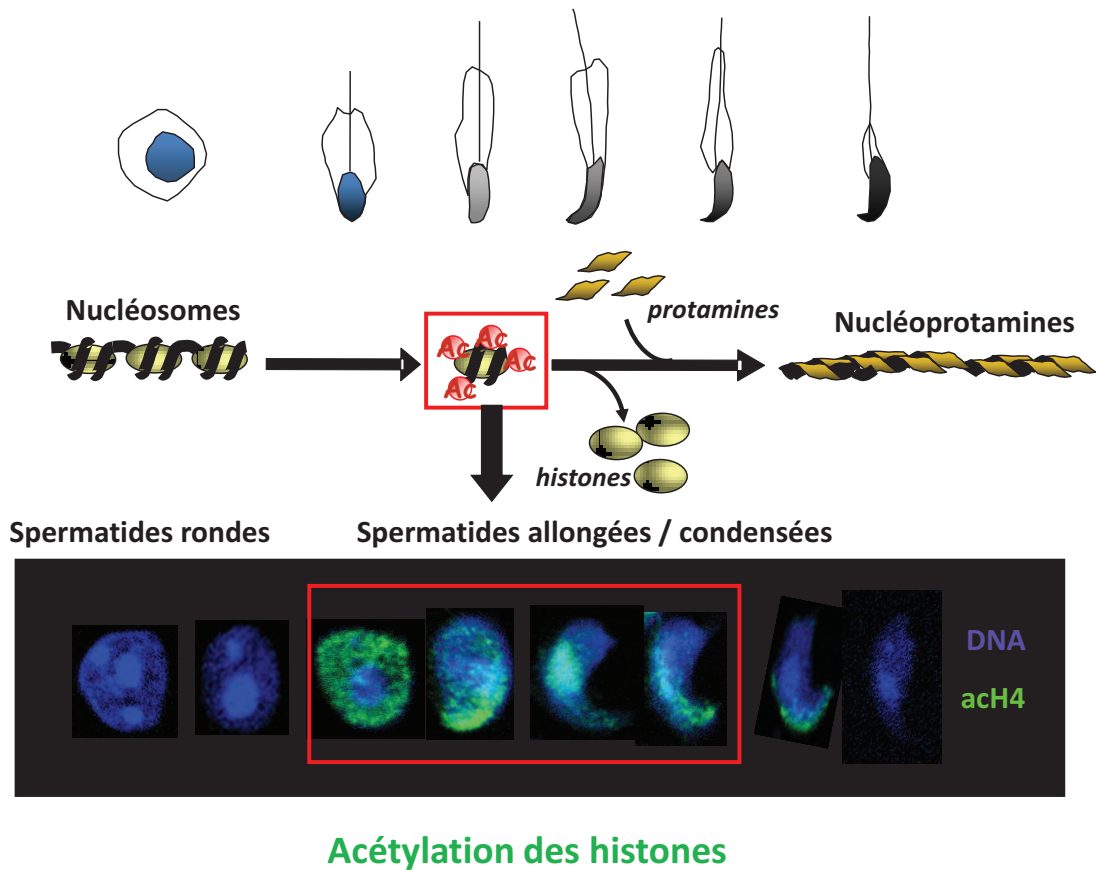
Réorganisations génétiques et divisions méiotiques



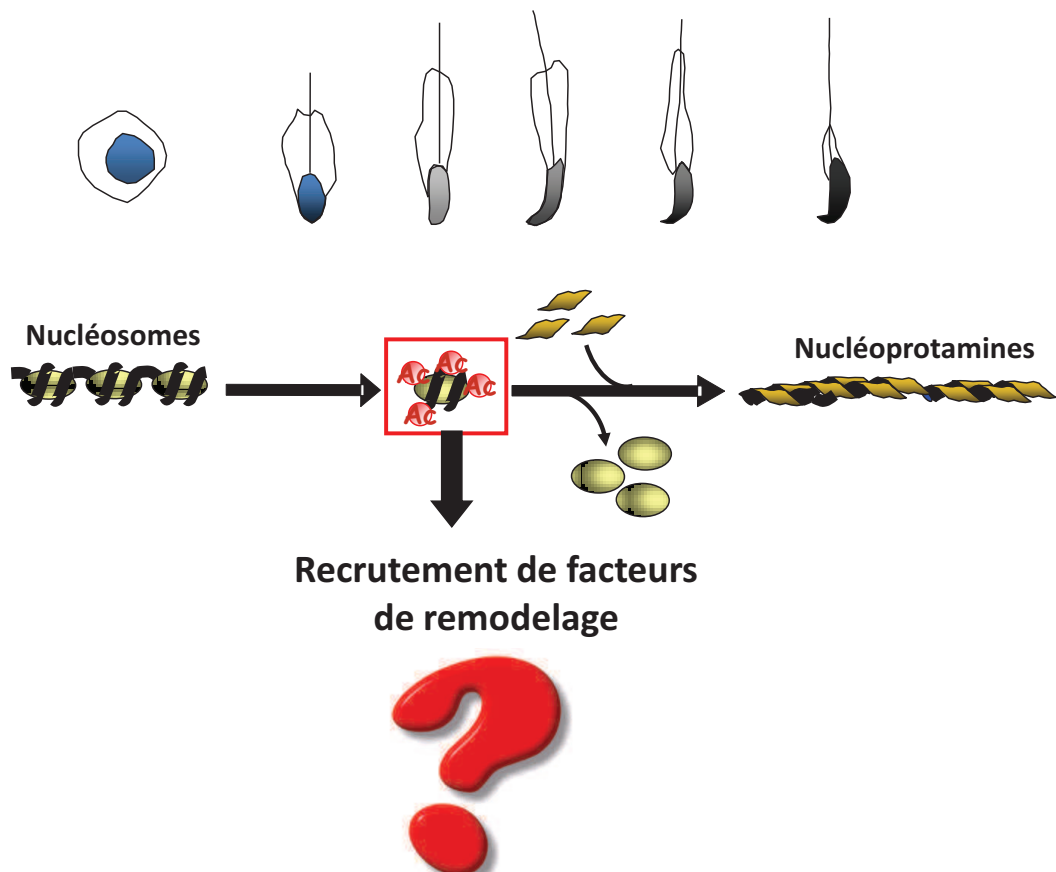
Réorganisation de la chromatine au cours de la spermiogenèse



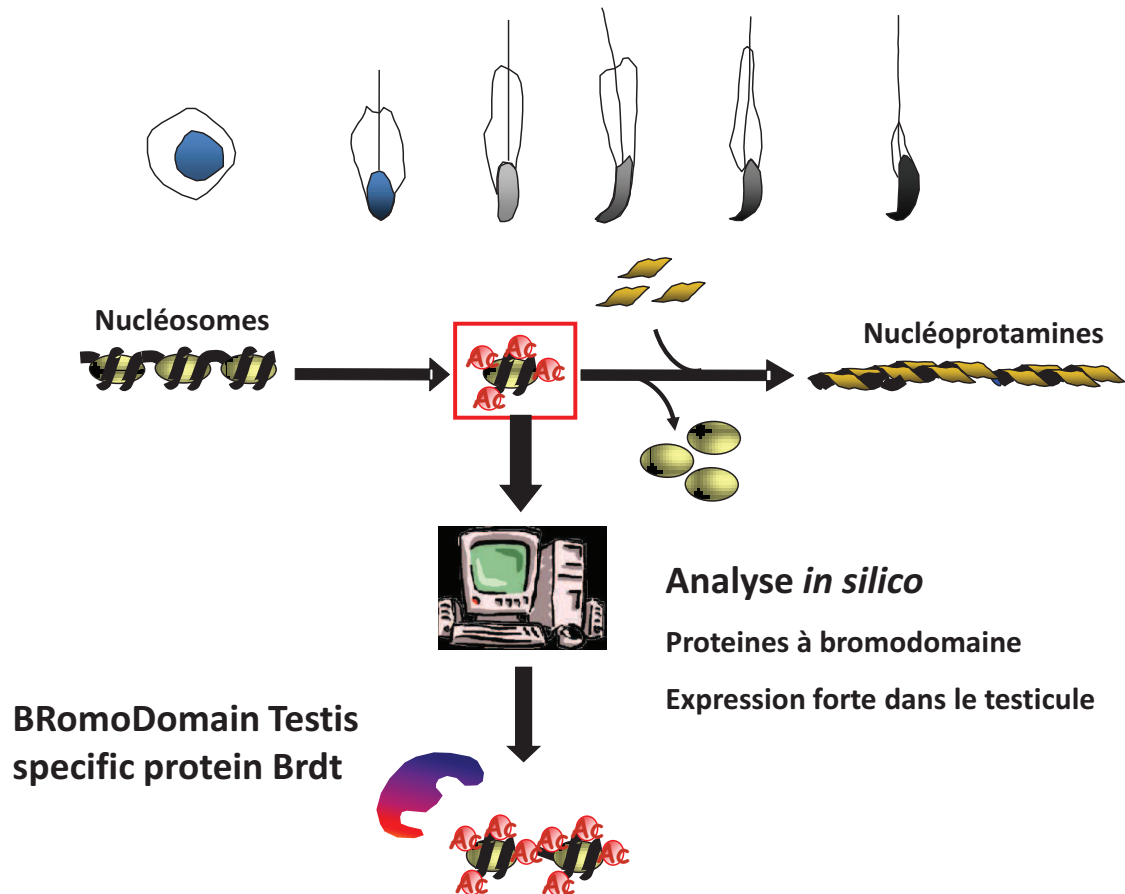
La vague d'acétylation des histones au cours de la spermiogenèse



Un signal permettant le recrutement de facteurs de remodelage impliqués dans l'échange des histones?



Identification de la protéine à double bromodomaine Brdt



Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine Brdt

Introduction

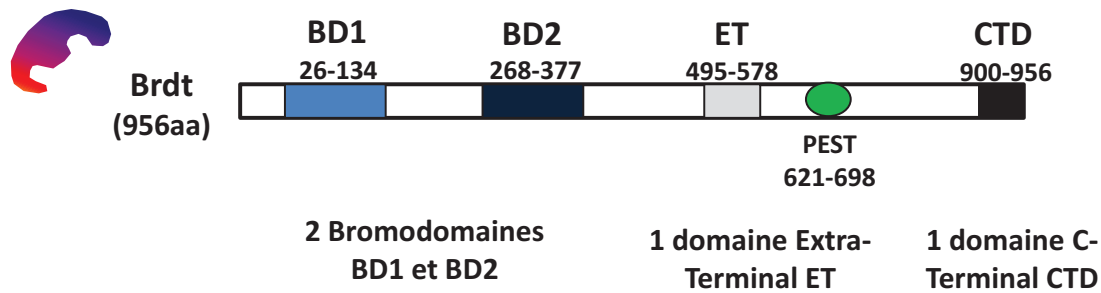
- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusion/Perspectives

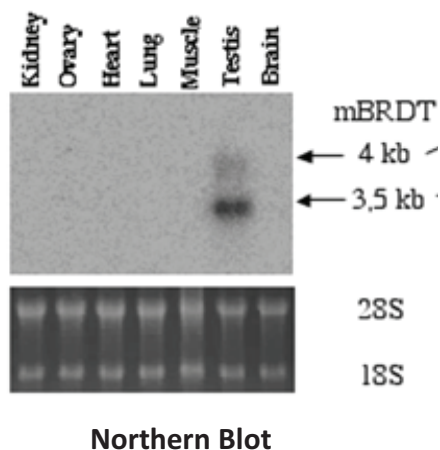
Brdt appartient à la famille de protéines à double bromodomaines BET



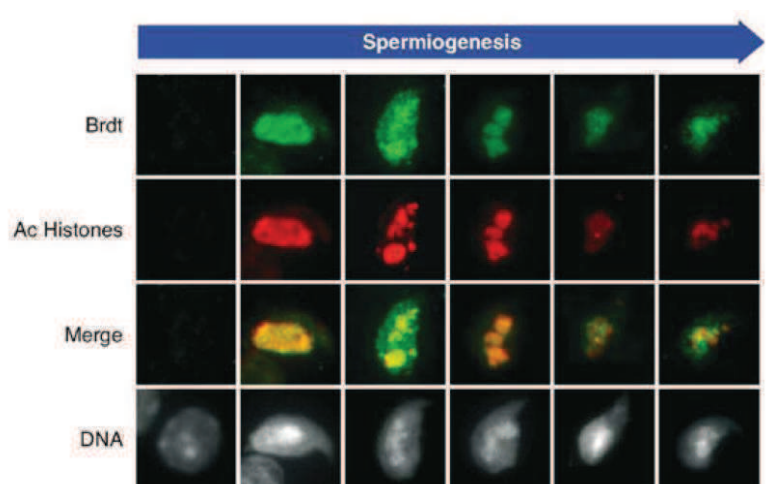
- Conservation au cours de l'évolution**
- Levure : Bdf1, Bdf2
 - Drosophile : Fsh
 - Humain / Souris : Brd2, Brd3, Brd4 et Brdt
- Nombreuses fonctions biologiques**
- Liaison à la chromatine acétylée
 - Association aux chromosomes mitotiques
 - Activation transcriptionnelle ...

Brdt est exprimé spécifiquement dans les cellules germinales mâles

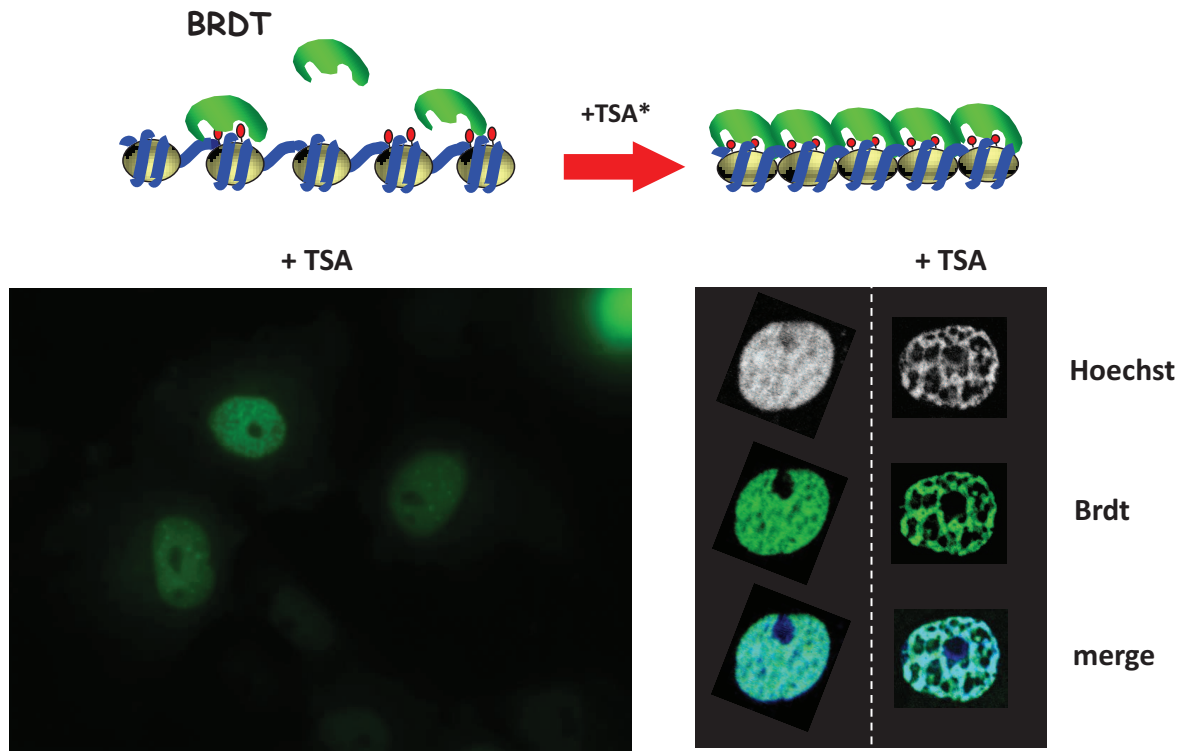
Spécifique du testicule



Dans les cellules post-méiotiques



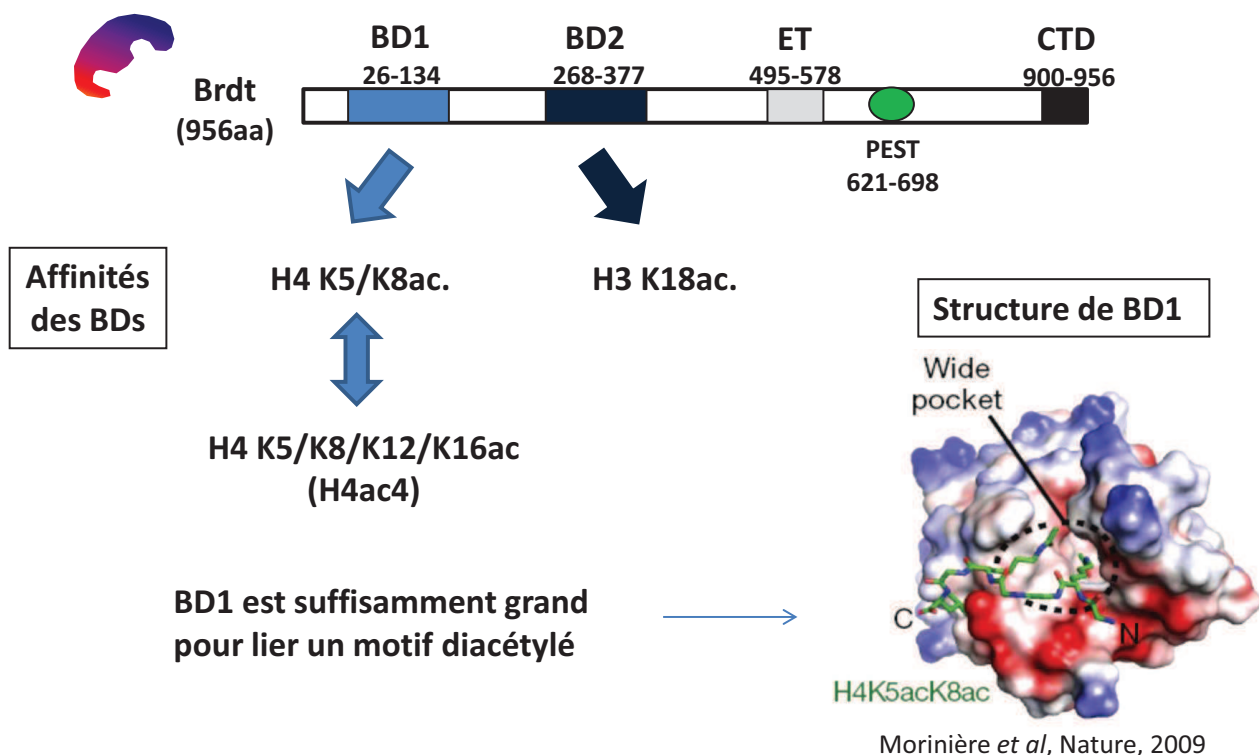
Brdt réorganise la chromatine hyperacétylée



D'après Pivot Pajot et al, Mol. Cell Biol, 2003

Caractérisation structurale et fonctionnelle des bromodomaines de Brdt

Collaboration avec Dr. Carlo Petosa & Dr. Christoph Müller, EMBL (FR)



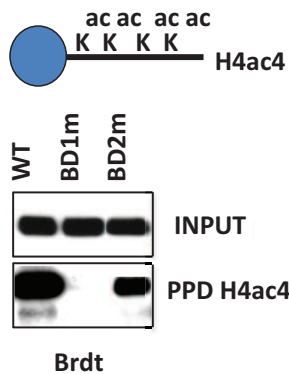
Le premier bromodomaine de Brdt (BD1) est crucial pour l'interaction de Brdt avec la chromatine hyperacétylée

Mutations bromodomaines Brdt ΔC (443aa)

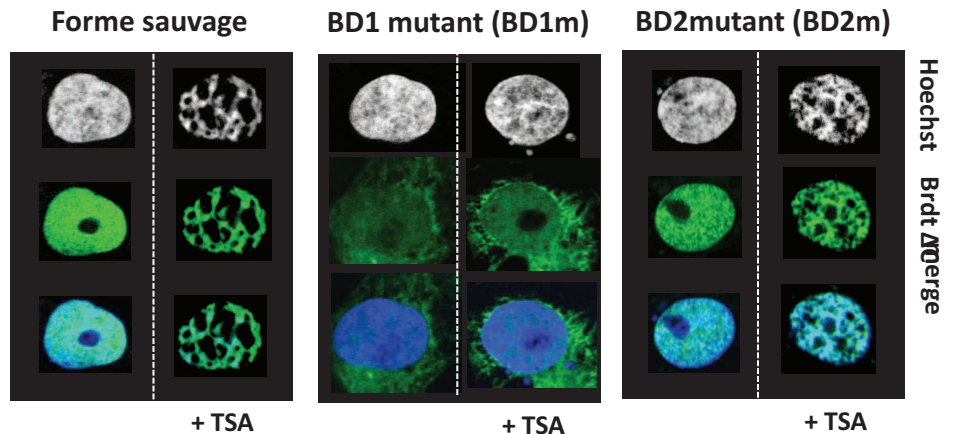


Liaison à un peptide H4ac4

Peptide pull-down (PPD)

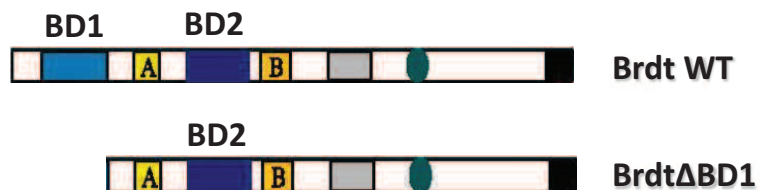


Remodelage de la chromatine acétylée

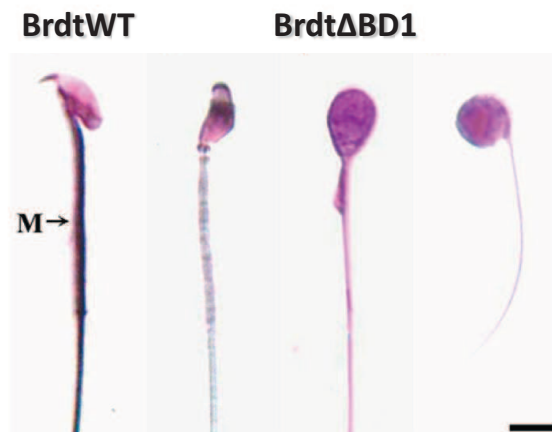


BD1 est crucial pour la spermiogénèse

Collaboration avec Dr. Debra Wolgemuth, Columbia University (NY)



Les mâles Brdt ΔBD1 sont stériles



Objectifs

Investigation des fonctions physiologiques de Brdt

- Caractérisation du rôle du premier bromodomaine de Brdt (BD1) au cours de la spermiogenèse
→ Modèle de souris BRDT Δ BD1
- Dissection des fonctions méiotiques de Brdt
→ Modèles de souris Brdt KO et Brdt Tag

Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

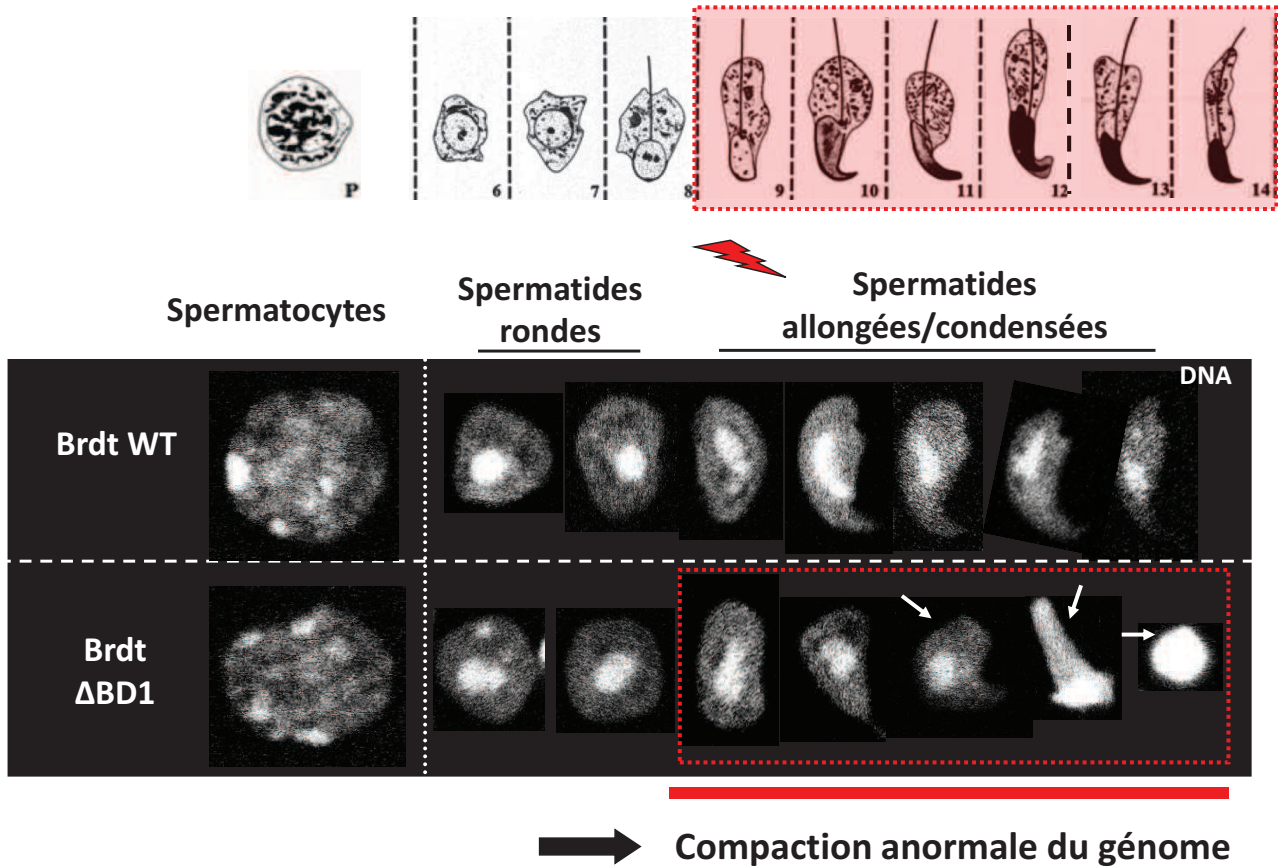
- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

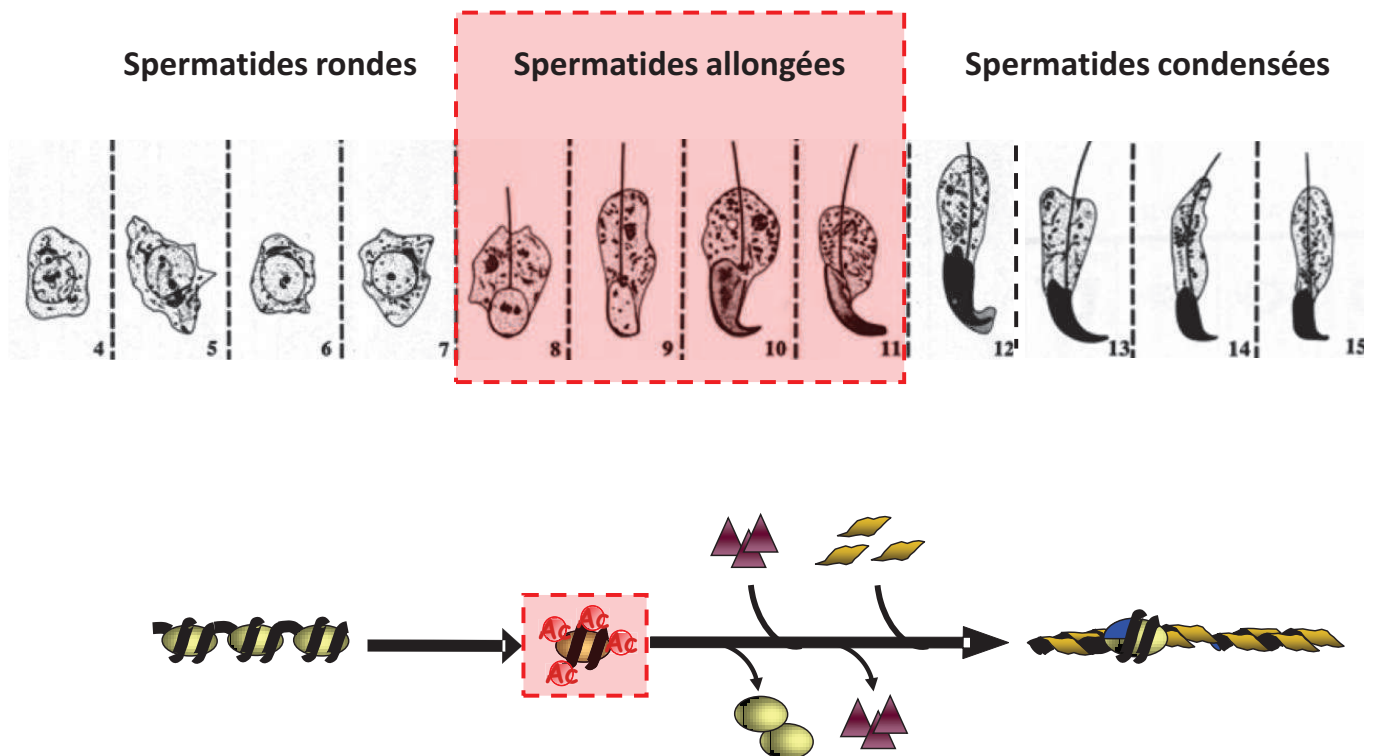
- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusion/Perspectives

La délétion de BD1 engendre des problèmes post-méiotiques

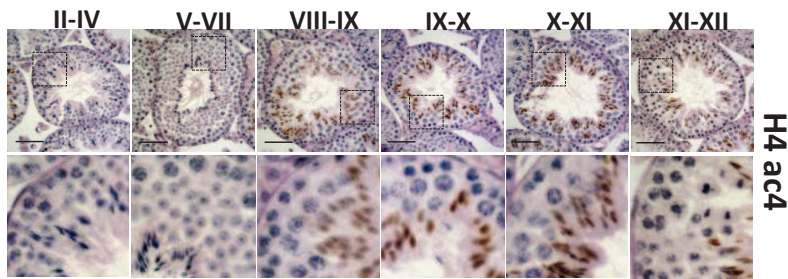


Perturbation de la vague d'acétylation ?



La vague d'acétylation n'est pas affectée par la délétion de BD1

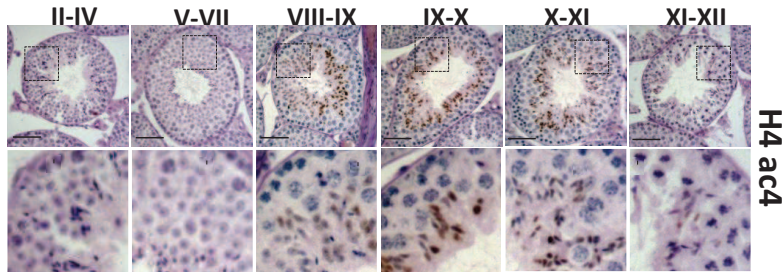
Brdt WT



H4 ac4

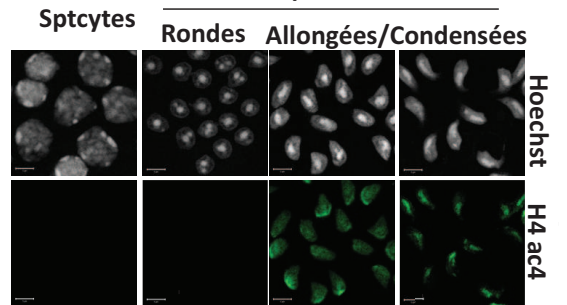


Brdt ΔBD1



H4 ac4

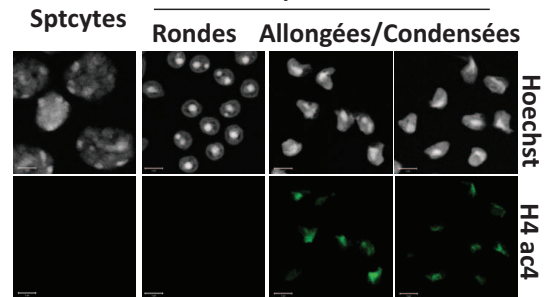
Spermatides



Hoechst

H4 ac4

Spermatides



Hoechst

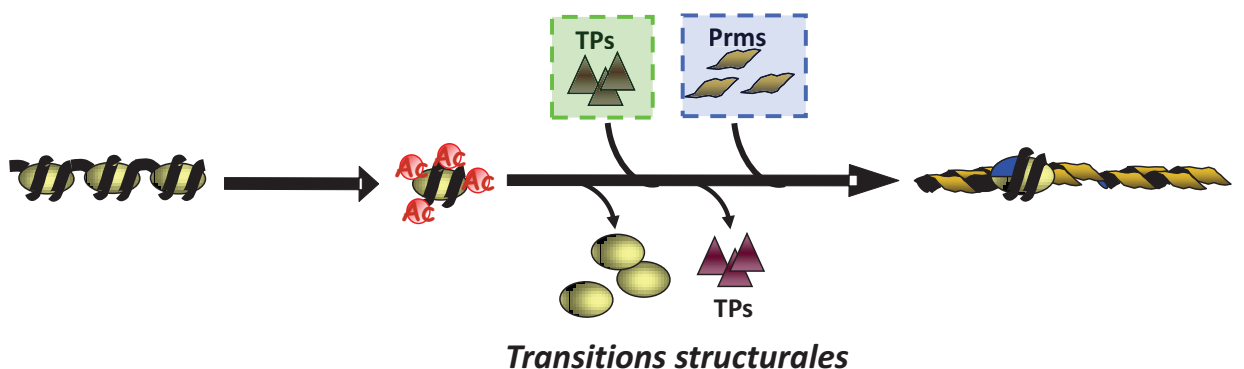
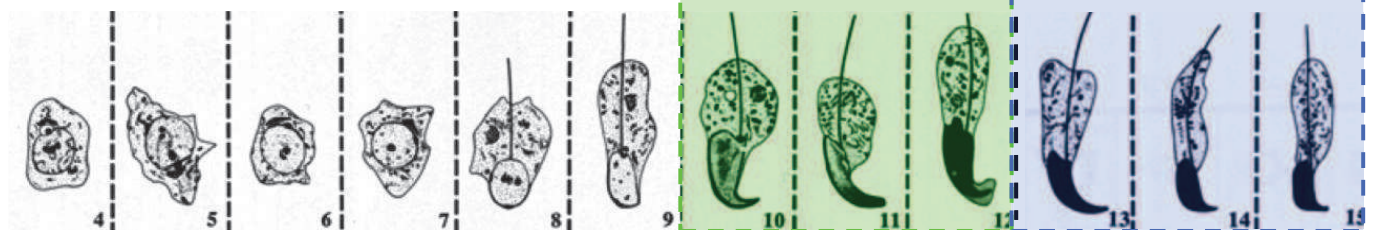
H4 ac4

Incorporation des protéines de transition et des protamines ?

Spermatides rondes

Spermatides allongées

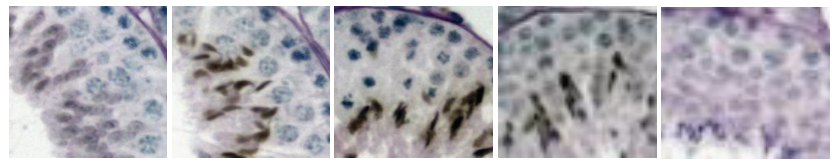
Spermatides condensées



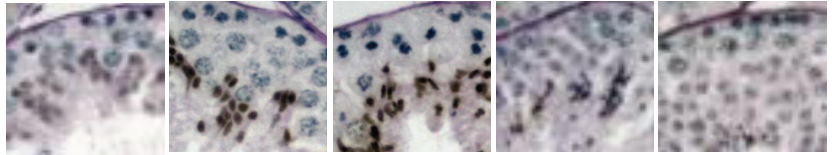
L'apparition des TP's et des Prms n'est pas affectée par la délétion de BD1

Protéines de transition (TPs)

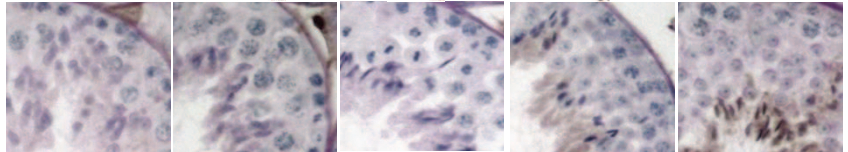
Brdt WT



Brdt Δ BD1

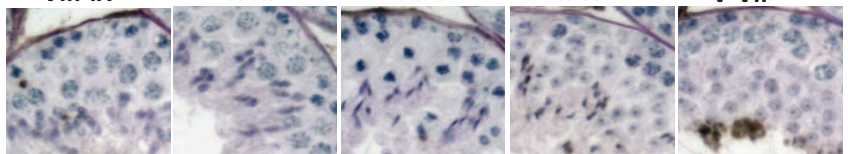


Brdt WT



Protamines (Prm)

Brdt Δ BD1



La délétion de BD1 entraîne des défauts d'incorporation des TP's et des Prms

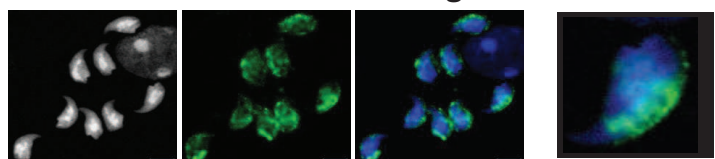
Protéines de transition (TPs)

Brdt WT

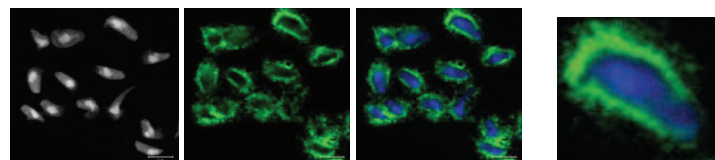
Hoechst

TP

Merge



Brdt Δ BD1



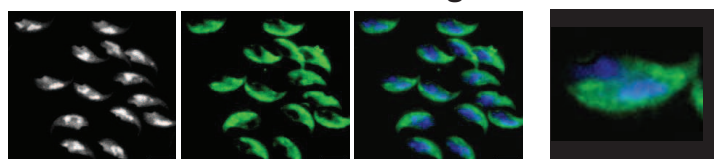
Protamines (Prms)

Brdt WT

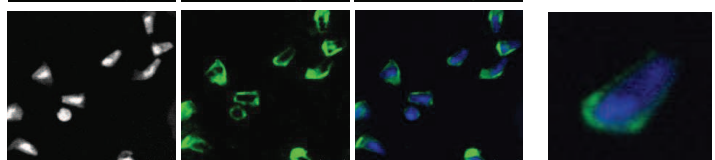
Hoechst

Prm

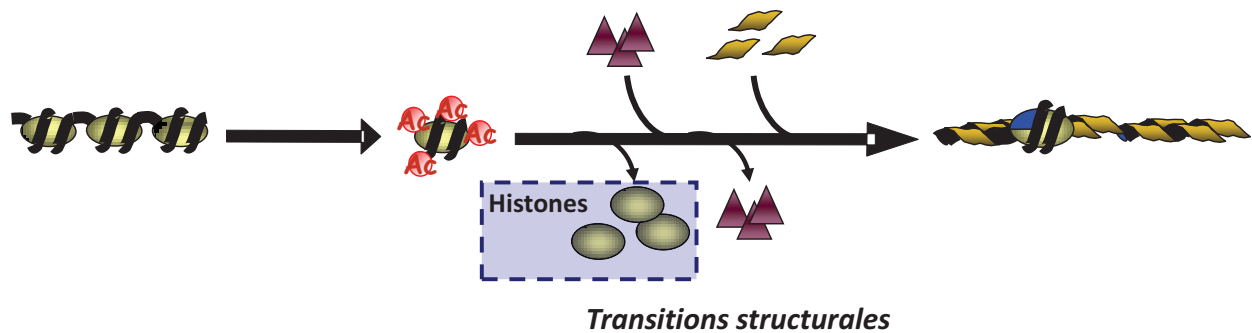
Merge



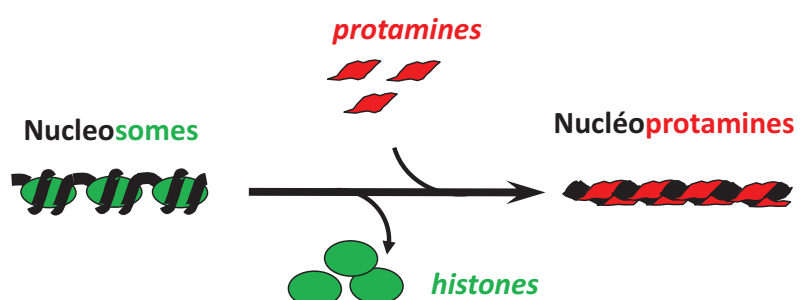
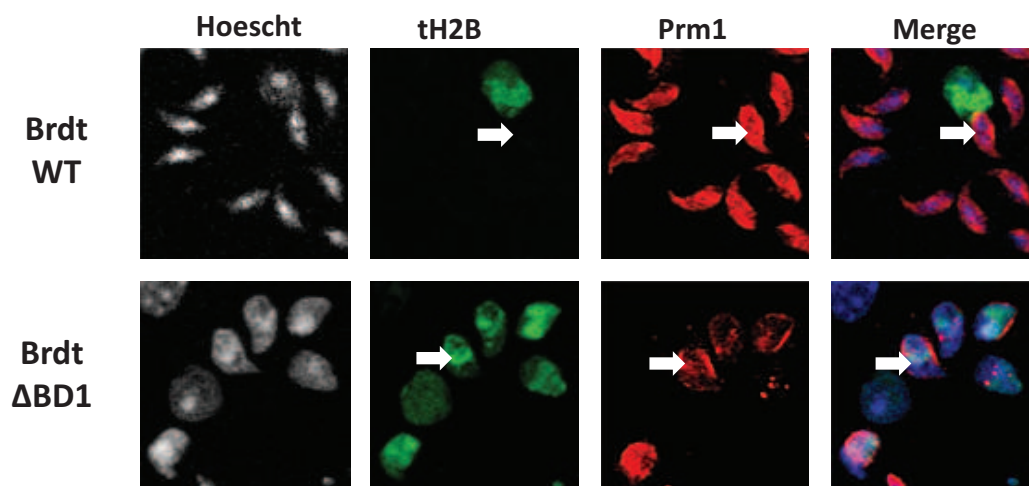
Brdt Δ BD1



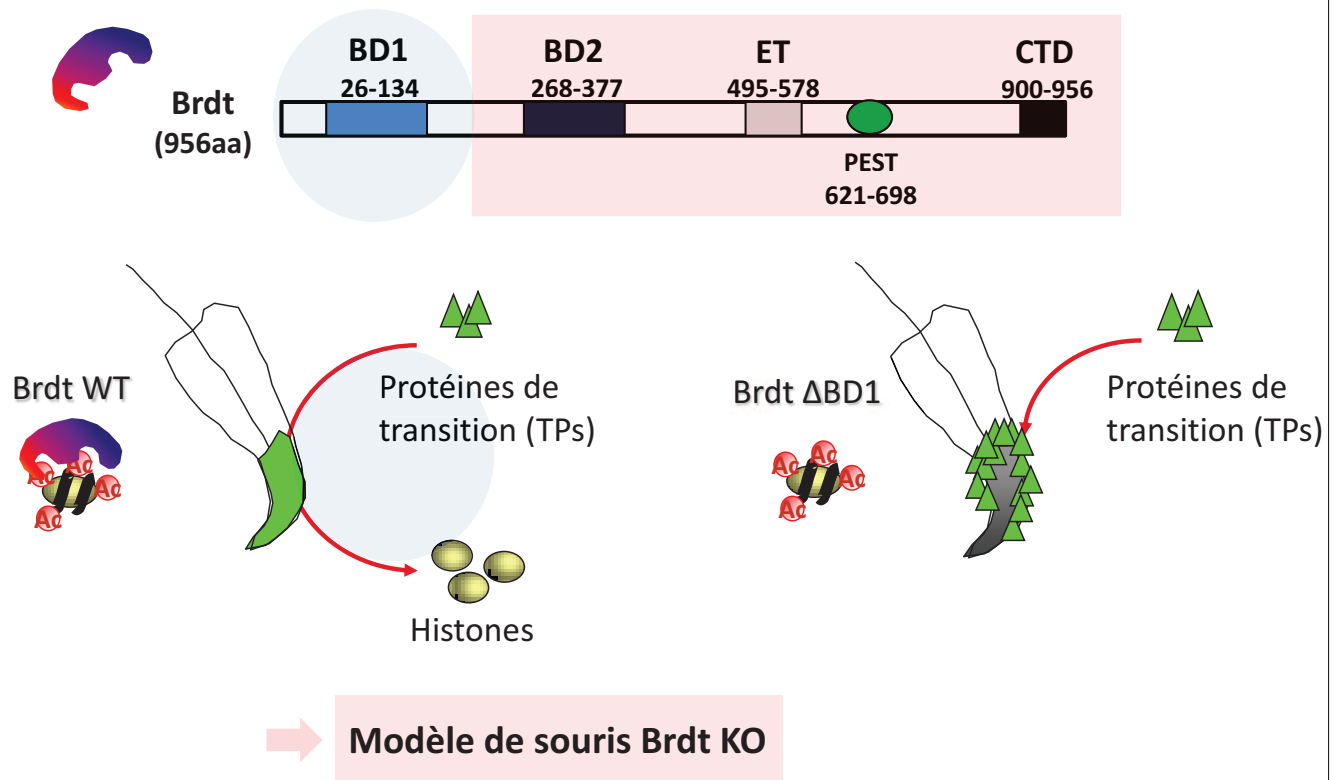
Eviction des histones ?



La délétion de BD1 entraîne des défauts d'enlèvement des histones



BD1 est impliqué dans l'échange des histones par les protéines de transition et les protamines



Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

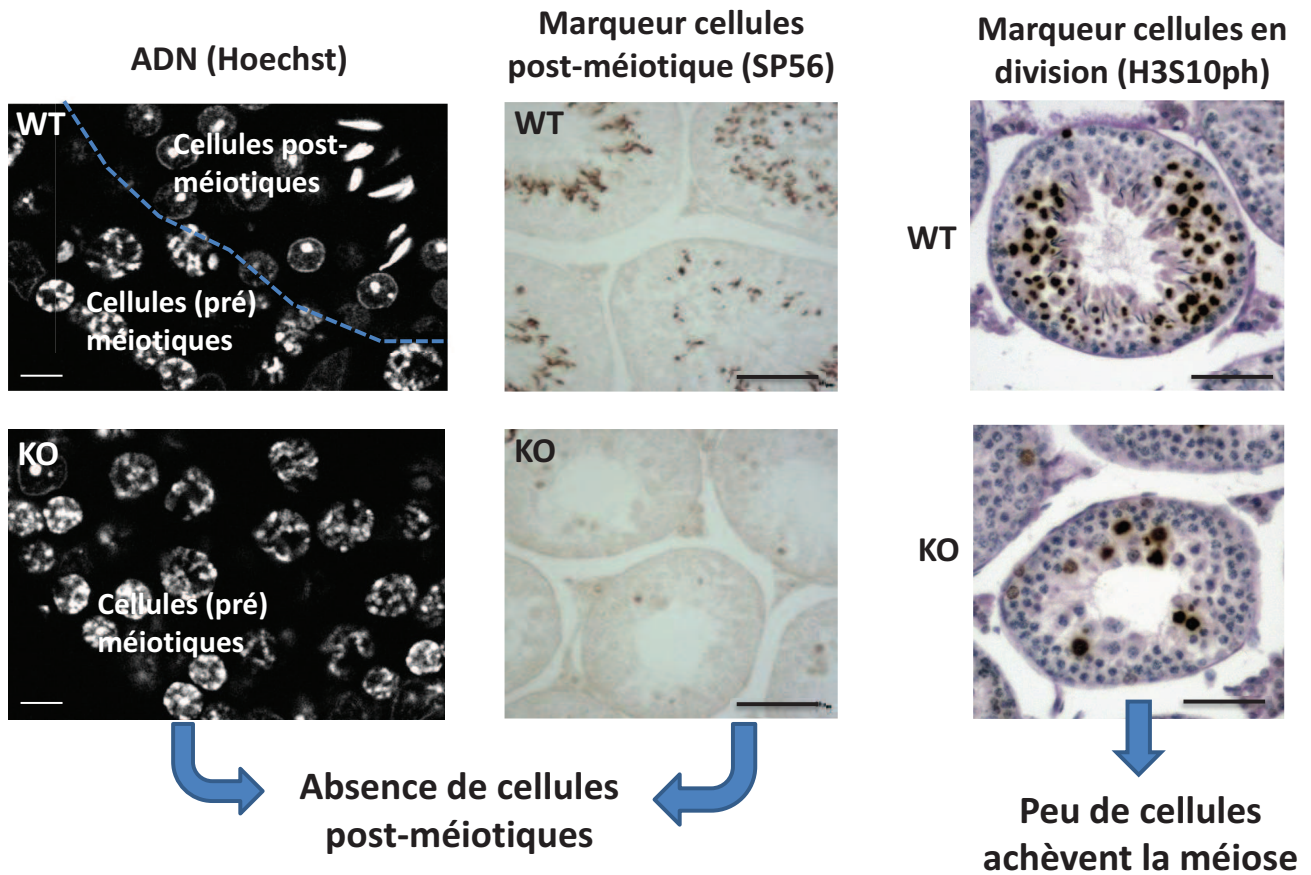
- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

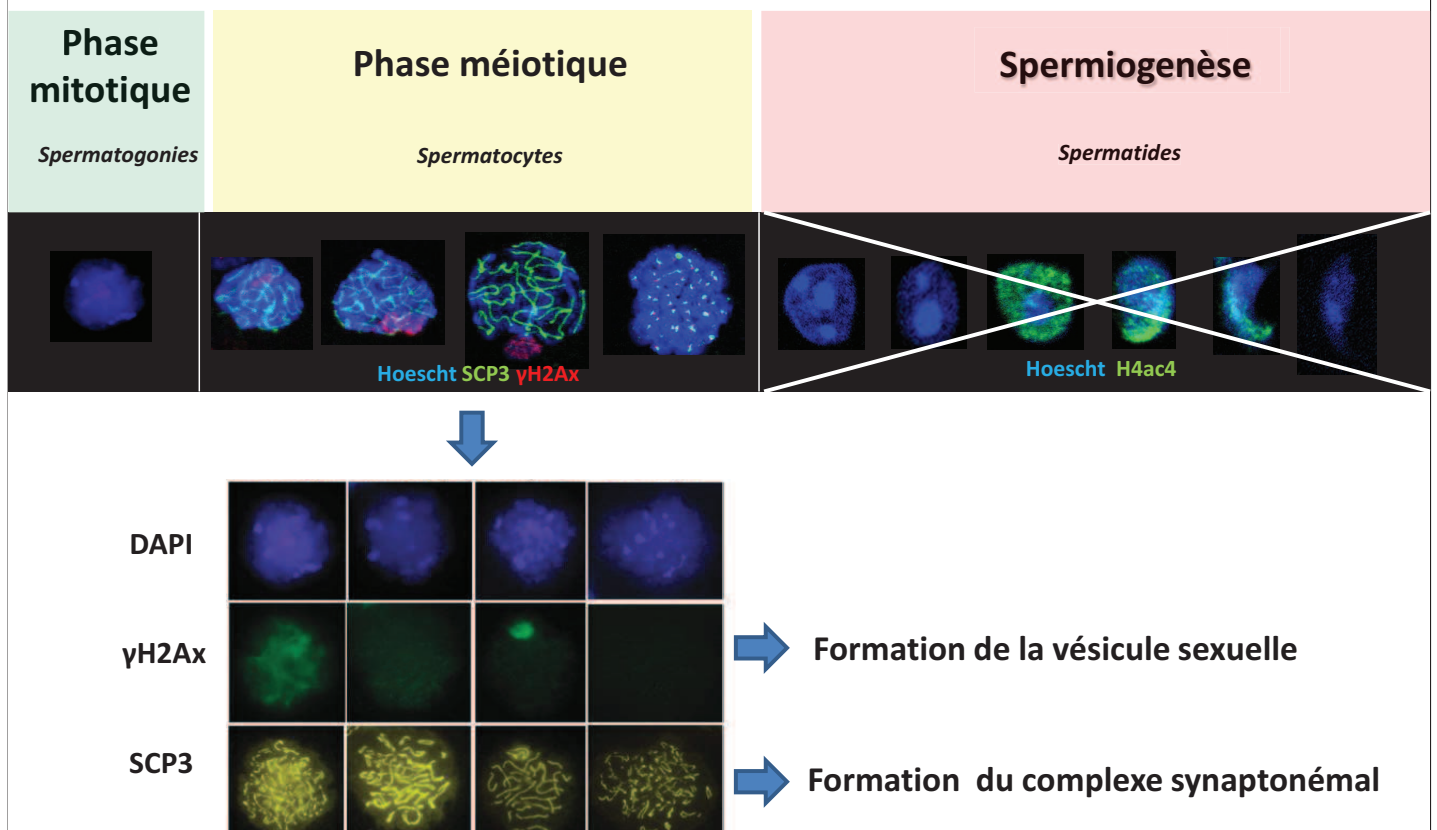
- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusion/Perspectives

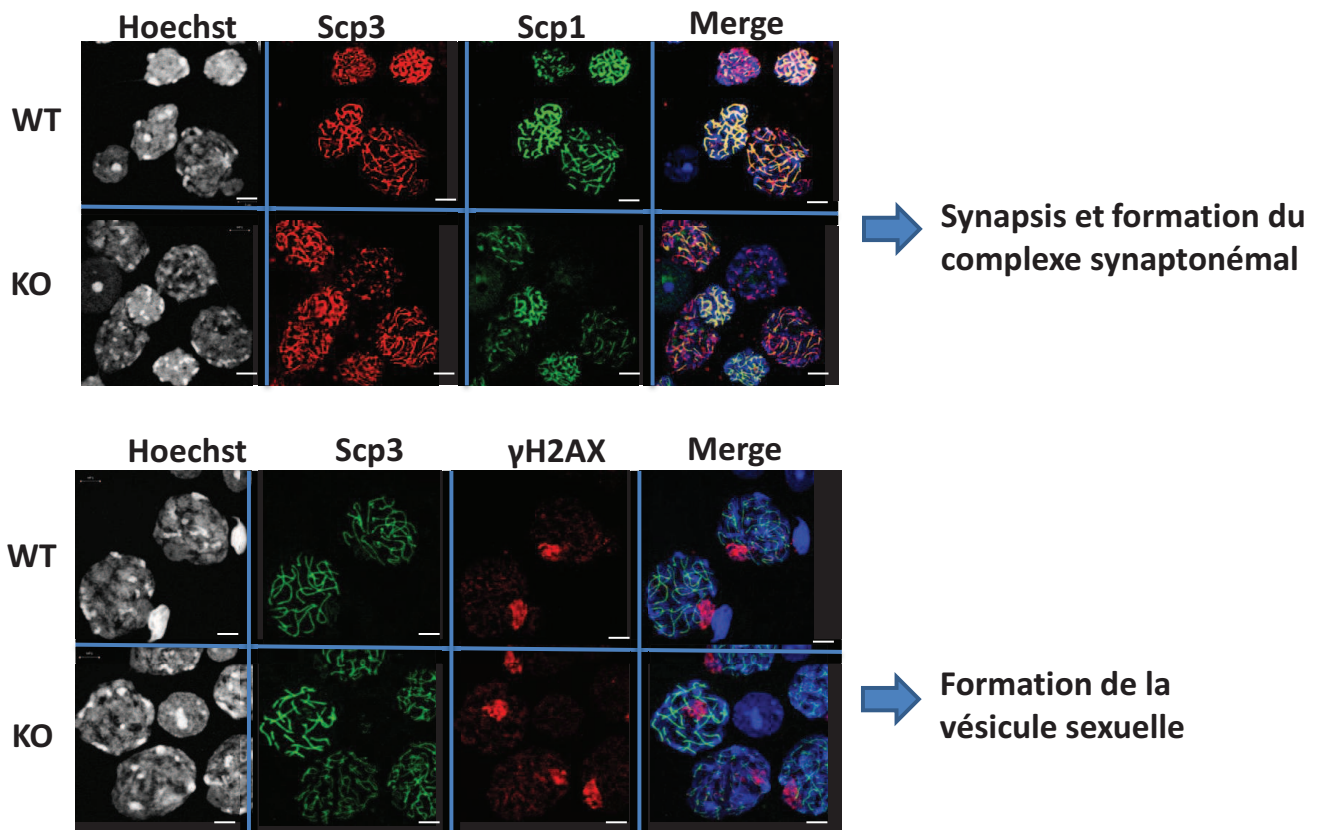
L'absence de Brdt entraîne un blocage en fin de méiose



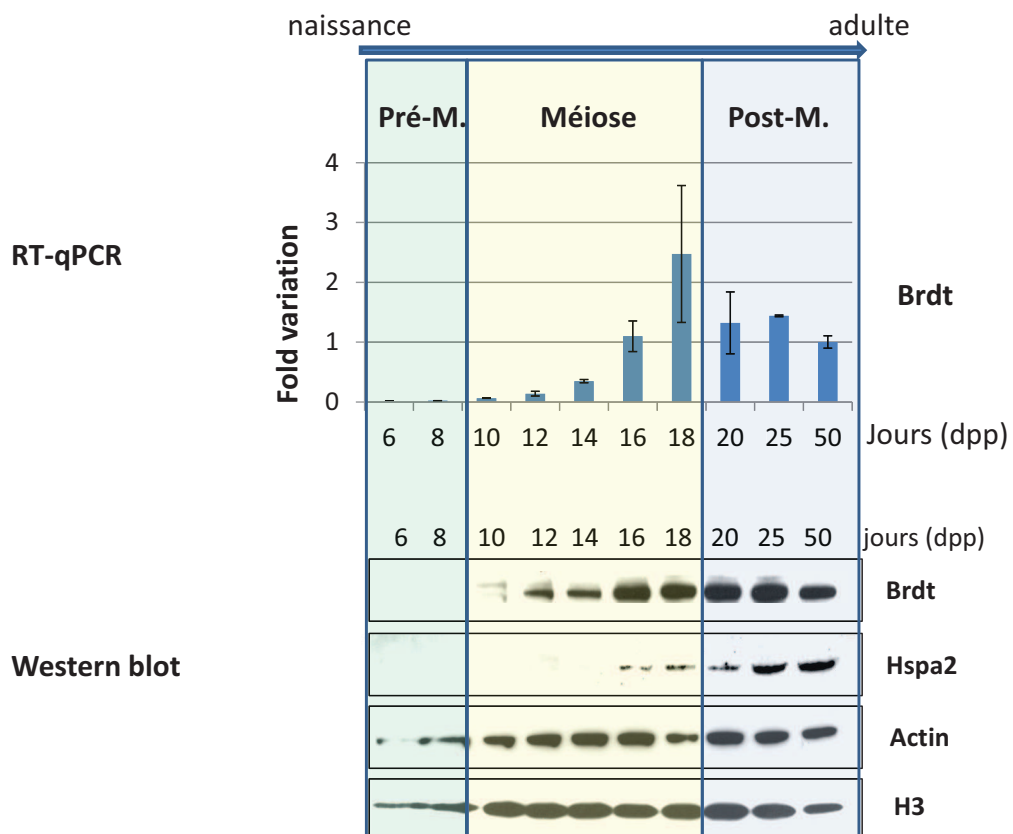
Fonction méiotique de BRDT ?



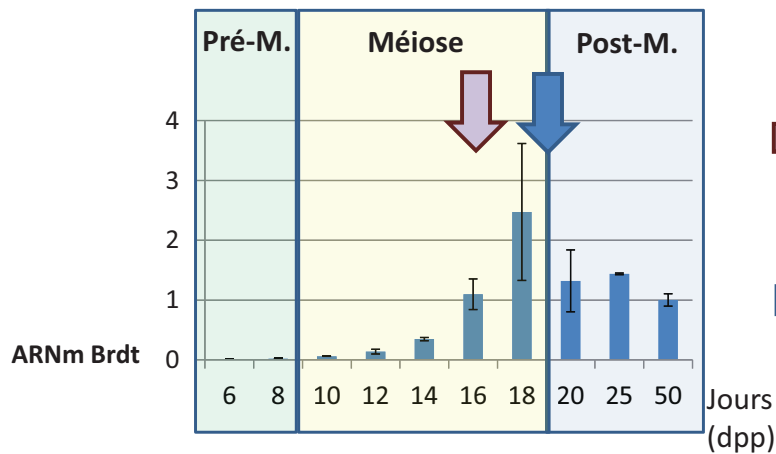
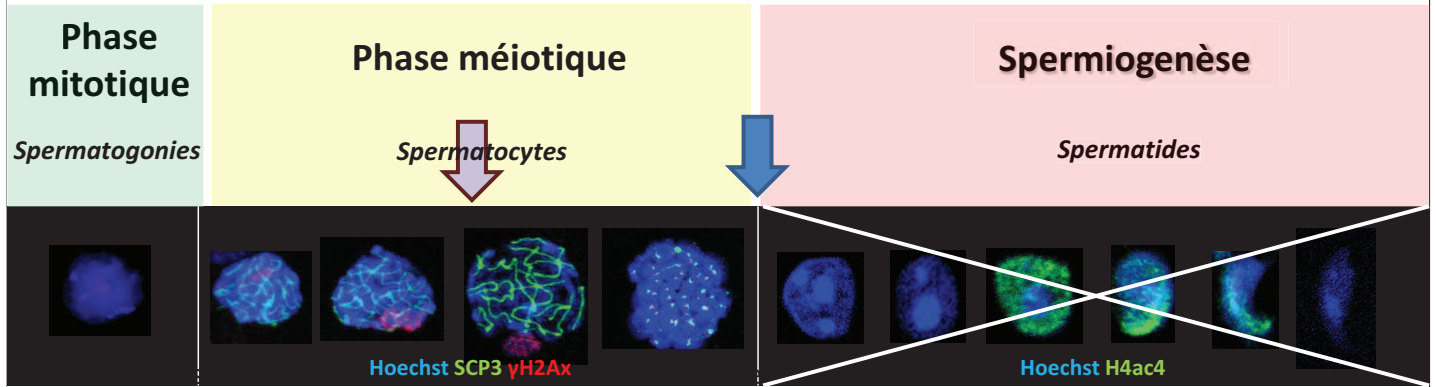
Les évènements de la prophase I de méiose ne sont pas affectés chez le KO



Expression de Brdt au cours de la première vague de spermatogenèse



Brdt peut-il réguler l'expression de gènes nécessaires pour la méiose et la spermiogenèse?

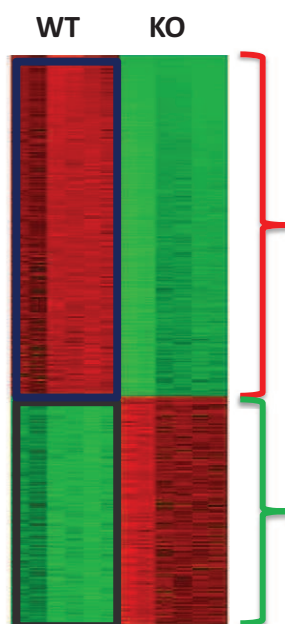


➡ Analyse transcriptomique en milieu de méiose (17 jours)

➡ Analyse transcriptomique en fin de méiose (20 jours)

Brdt régule l'expression d'environ 3000 gènes

Fin prophase I
méiose (20dpp)

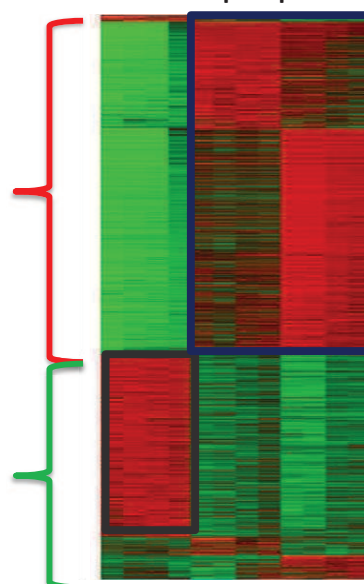


Gènes activés par Brdt
(down in KO versus Ctrl)
= 1864 gènes

Gènes réprimés par Brdt
(Up in KO versus Ctrl)
= 1153 gènes

spermatogenèse

Gonia Spc Spermatids

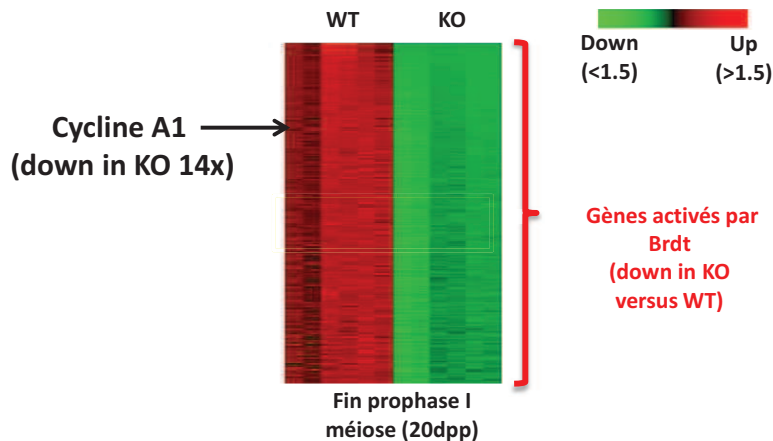


Gènes méiotiques et post-méiotiques
(spermatocytes et spermatides)

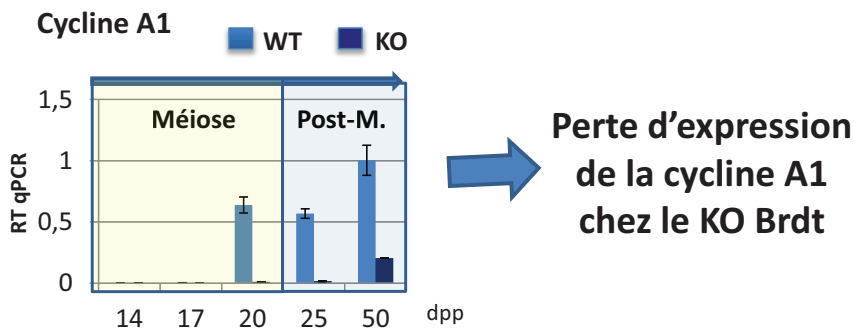
Gènes pré-méiotiques
(spermatogonies)

Down (<1.5) Up (>1.5)

Brdt active l'expression de gènes essentiels pour la progression méiotique



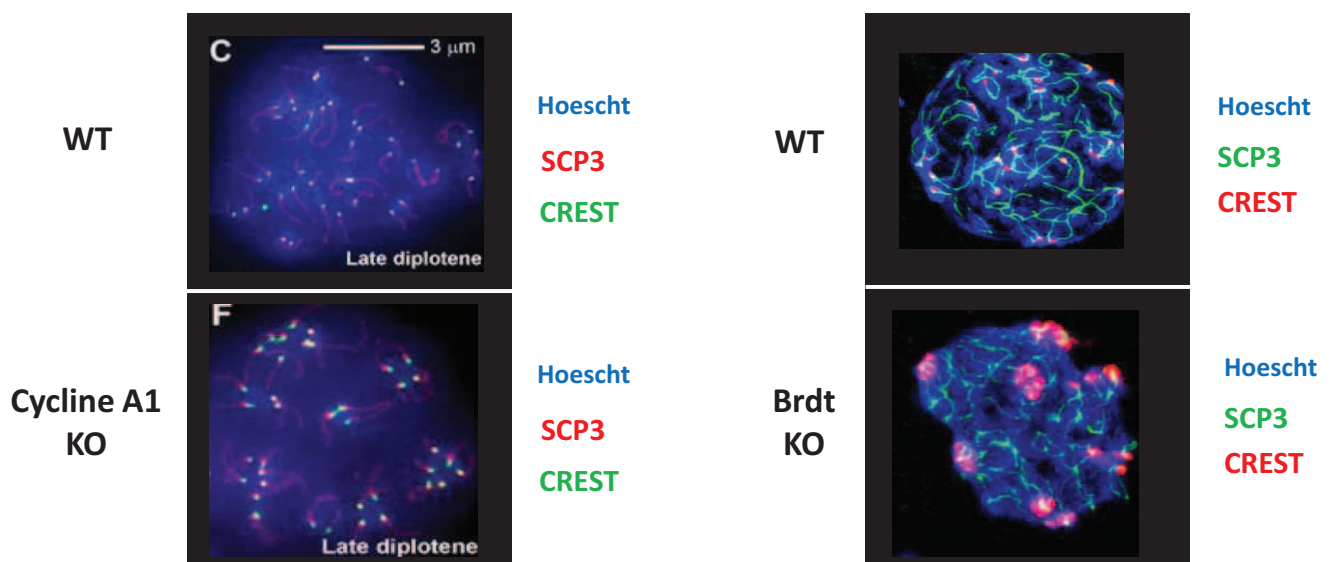
Le KO de la cycline A1 chez la souris entraîne un blocage méiotique et la stérilité des mâles



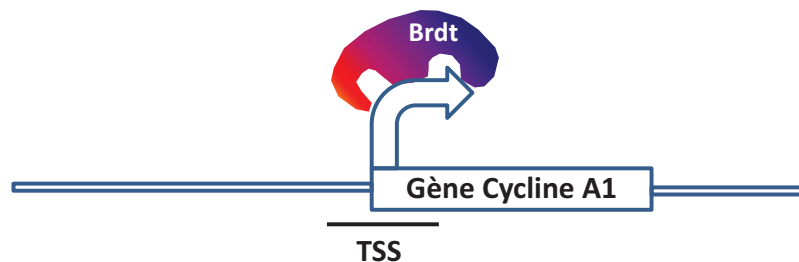
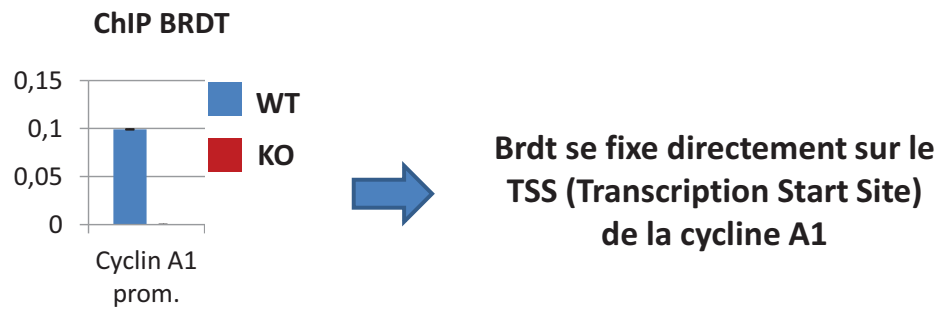
Le phénotype du KO Brdt peut être expliquée par la perte d'expression de la cycline A1

Le KO de la cycline A1 chez la souris entraîne un blocage méiotique et une aggrégation des centromères

Nickerson et al., Dev. Biol., 2007



Brdt pourrait activer directement l'expression de la cycline A1

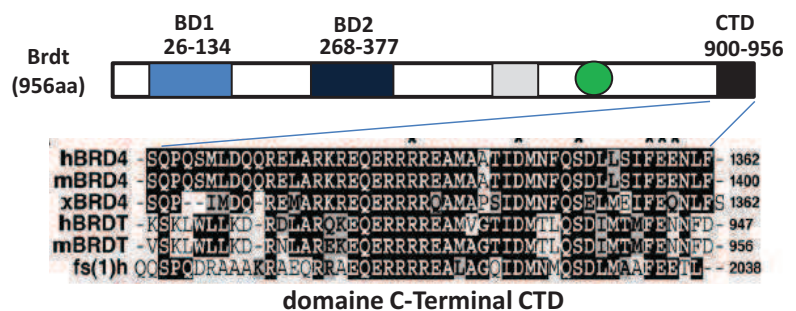


Mécanisme ?

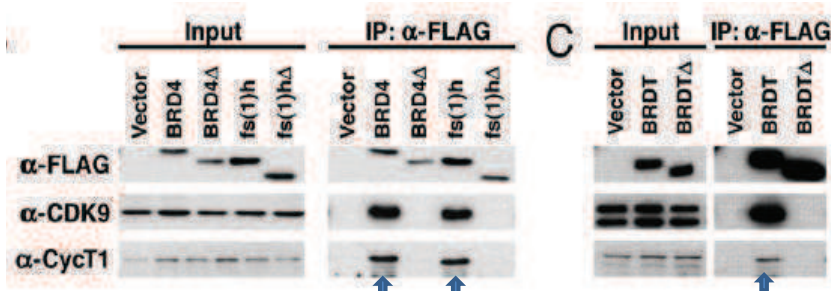
Brd4 et Brdt peuvent recruter le complexe d'élongation de la transcription pTefb via le domaine C-terminal

Conservation des domaines au sein de la famille BET

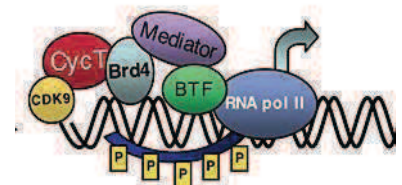
Bisgrove et al., PNAS, 2007



Interaction du CTD de Brd4 et Brdt avec le complexe pTefb

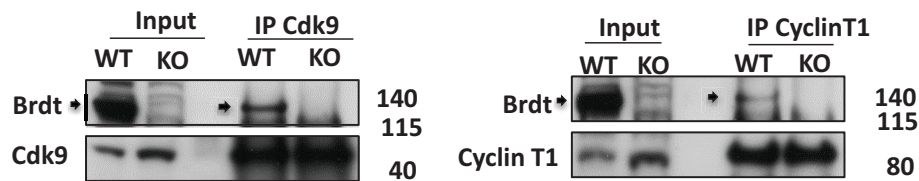


Complexe pTefb = Cycline T1 + Cdk9

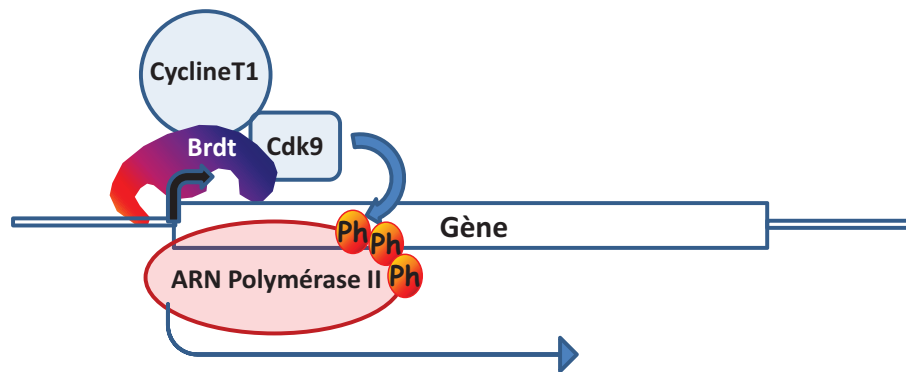


Brdt interagît avec le complexe d'élongation de la transcription pTefb dans les cellules germinales mâles

IP Cdk9 et CyclinT1 (complexe pTefb)



Brdt interagît avec pTefb (Cdk9 + Cycline T1) dans le testicule



Et les gènes réprimés par Brdt ?

Localisation Chromosomique ?

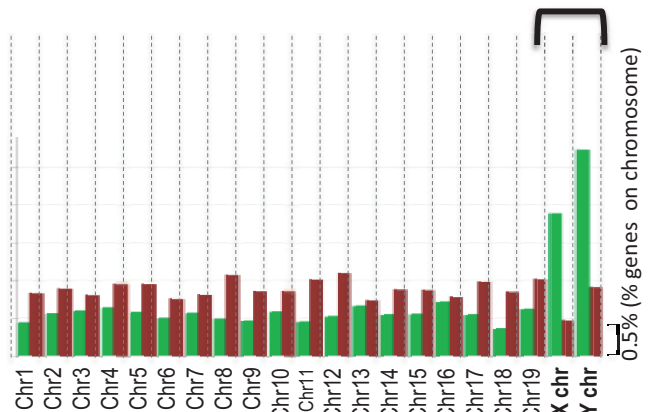
Fin prophase I
méiose (20dpp)



Genes réprimés par Brdt
(Up in KO versus Ctrl)
(n=1153)

Genes activés par Brdt
(down in KO versus Ctrl)
(n=1864)

Les gènes réprimés par Brdt sont
enrichis sur les chromosomes sexuels



Brdt participe à l'inactivation des chromosomes sexuels

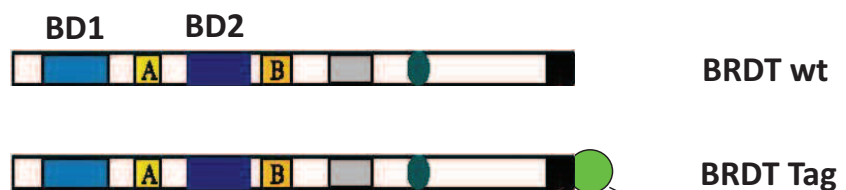
Brdt régule le programme de différenciation des cellules germinales males

Brdt active des gènes méiotiques et post-méiotiques au cours de la méiose

Brdt peut recruter le complexe d'élongation de la transcription dans les cellules germinales

Brdt participe à l'inactivation des chromosomes sexuels pendant la méiose

La protéine Brdt endogène taguée



Purification d'affinité

Analyse spectrométrie de masse

Identification des partenaires de Brdt

Rôle physiologique de Brdt

GAPHHHHHGAAGGDYKDDDKSAAGGYPDVPDYA
6xHIS flag HA

Souris chimères mâles Brdt Tag stériles !!!

Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

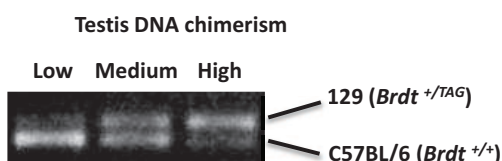
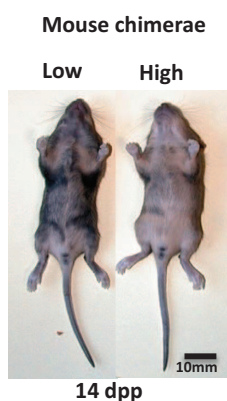
Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 ($\Delta BD1$)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

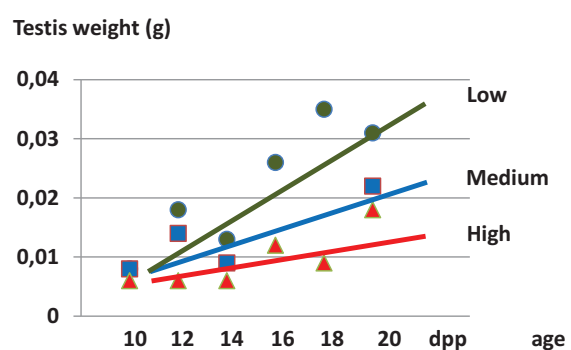
Conclusion/Perspectives

Analyse des chimères Brdt Tag

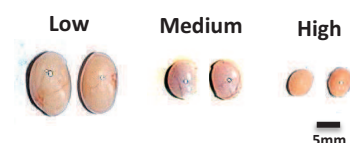
Evaluation du chimérisme



Le poids du testicule est corrélé à la quantité de cellules germinales

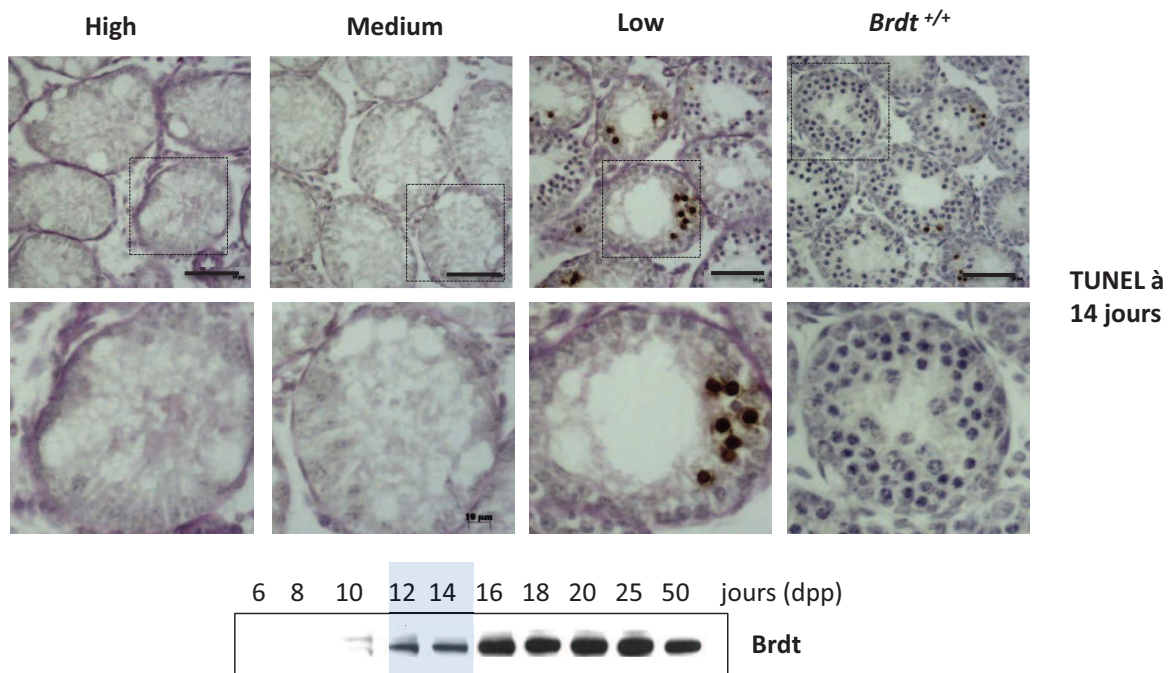


Testis morphology (at 49 dpp)



Plus le chimérisme est élevé (plus la proportion de Brdt Tag est importante) plus les testicule sont petits

Perte des cellules germinales mâles dès le début de la méiose chez les chimères Brdt Tag



➡ Dès que la forme Brdt TAG s'exprime elle pourrait perturber le programme d'expression des gènes et conduire à l'apoptose des cellules

Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogenèse: fonctions de la protéine à double bromodomaine BRDT

Introduction

- Organisation fonctionnelle de la chromatine
- Remodelage de la chromatine au cours de la spermatogenèse
- Caractérisation de la protéine à double bromodomaine BRDT

Résultats : fonctions physiologiques de Brdt (modèles murins)

- Un rôle post-méiotique du premier bromodomaine de Brdt : souris Brdt delta-BD1 (Δ BD1)
- Un rôle méiotique de Brdt : souris Brdt Knock-out (KO)
- Un effet "dominant-négatif" : souris Brdt TapTag (TAG)

Conclusion/Perspectives

Conclusions

Brdt BD1 est impliqué dans le remodelage de la chromatine au cours de la spermiogenèse

Brd1 permet l'échange des histones par les protéines de transition et les protamines

(modèle de souris Brdt Δ BD1)

Brdt est impliqué dans la régulation du programme d'expression des cellules germinales mâles au cours de la méiose

Brdt active des gènes méiotiques et post méiotiques

Brdt participe à l'inactivation des chromosomes sexuels

(modèles de souris Brdt KO et Brdt Tag)

Perspectives

Partenaires de Brdt

(en cours)

Vers un modèle de remodelage in vitro de la chromatine

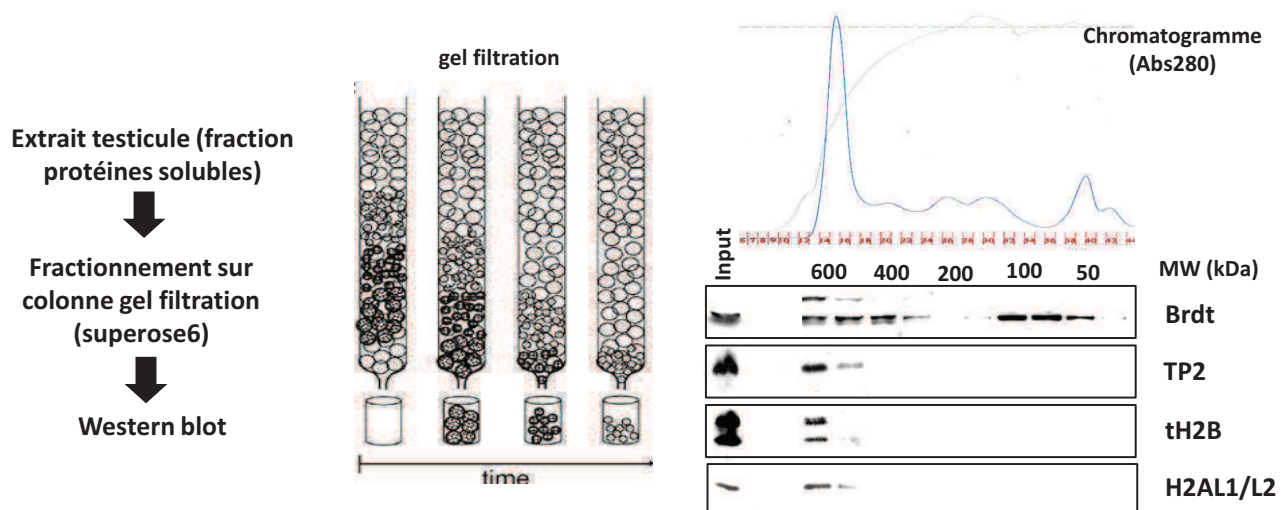
ChIP-seq.

(en cours)

Vers un modèle de reprogrammation des cellules souches

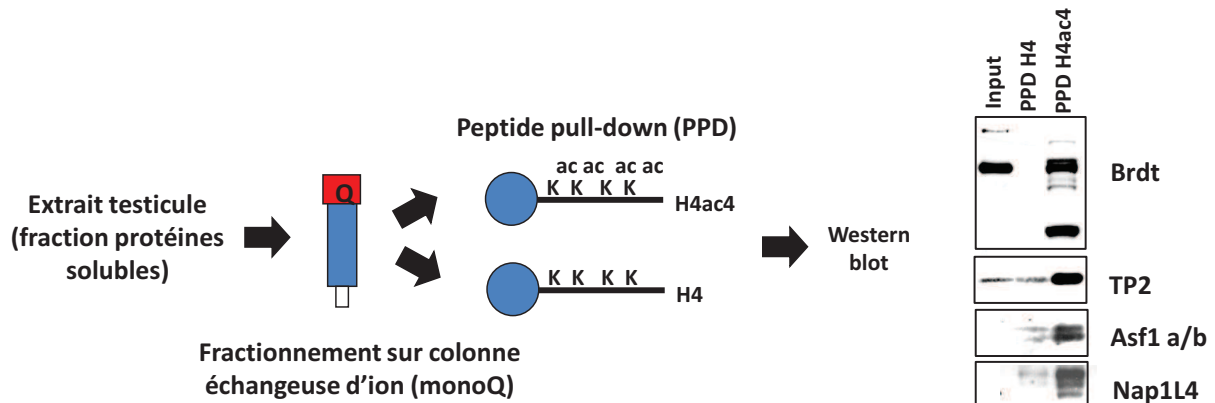
Brdt est en complexe avec des protéines basiques associées à la chromatine

➡ Brdt est dans un complexe de haut poids moléculaire (600 kDa)

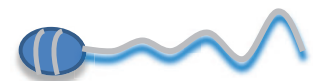


Brdt est en complexe avec des protéines basiques et des chaperones d'histones au sein du testicule

➔ Brdt copurifie avec les TP et des chaperones d'histones



REMERCIEMENTS



Team Epigenetic and Cell Signaling

Saadi Khochbin

Sophie Rousseaux
Fayçal Boussouar
Christine de Robertis
Sandrine Benitski
Anne Laure Vitte
Alexandra de Bernardi
Thierry Buchou



Genome-wide transcriptome analysis
Philippe Guardiola (CHU, Angers, FR)

Genome-wide methylome analysis
Yorg Tost (CEA, Evry, FR)

BRDT KO mice
Sanger Institute, UK

Toutes les personnes de l'IAB

Michel Pabion
Karin Sadoul
Clothilde Rabatel
Emilie Montellier
Aurore le Bescont
Nicolas Reynoird

BRDT ΔBD1 mice
Debra Wolgemuth
(Columbia Univ, NY, USA)

Brdt Tag mice
Mathieu Gérard
(CEA, Saclay, FR)

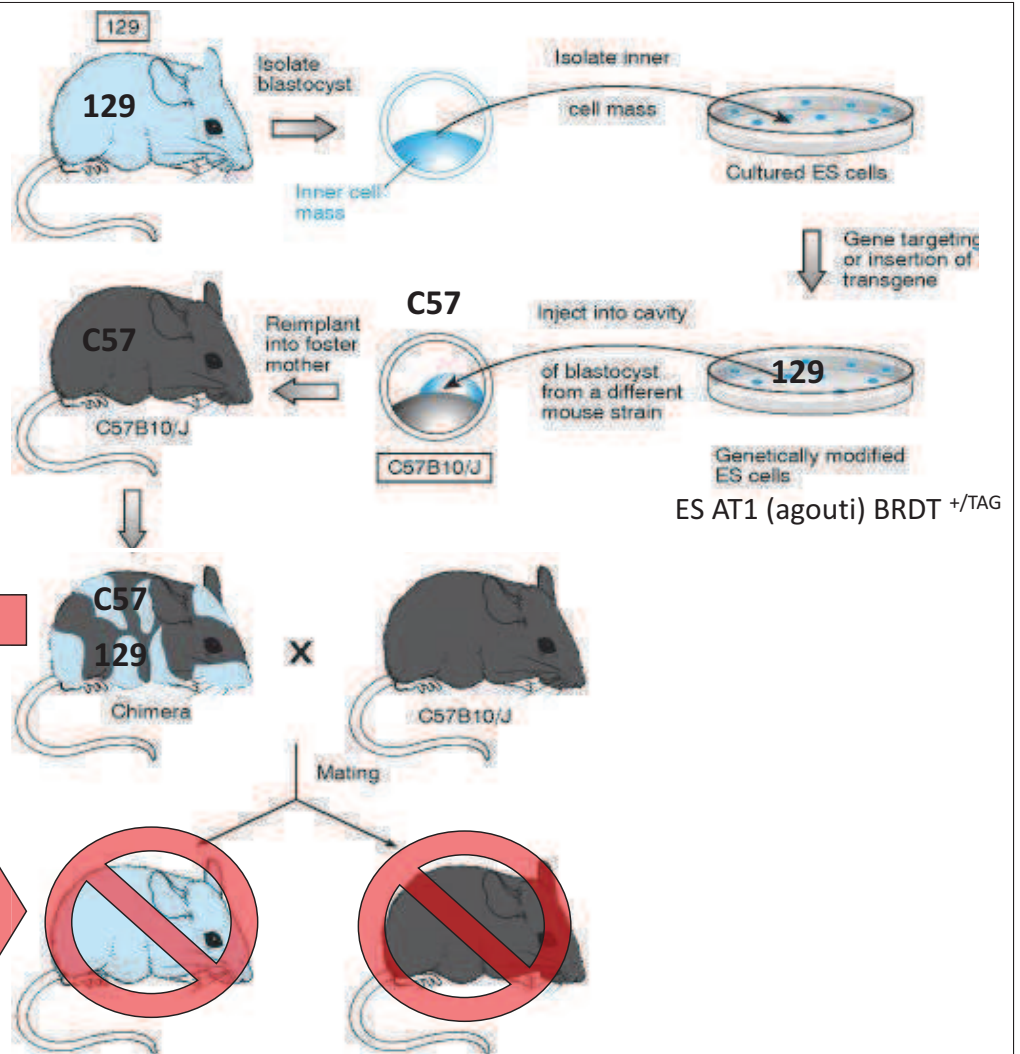
Plateforme microscopie IAB/GIN
Alexei Grichine
Jacques Mazzega

Structural studies
Jeanne Morinière
Christoph W. Müller
Carlo Petosa
(EMBL, Grenoble FR, Heidelberg GER)

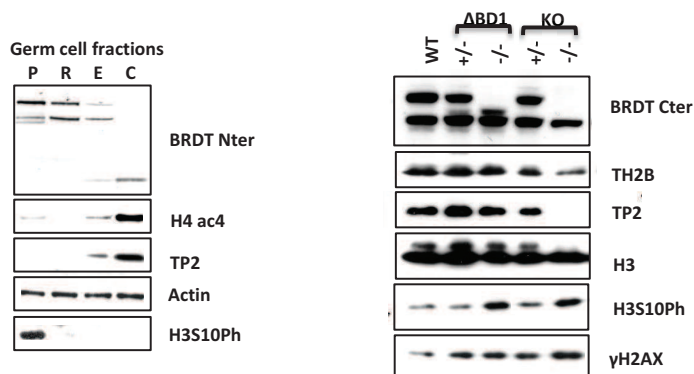
Region Rhones-Alpes
Financement 3ans

ARC
Financement 1an

Souris transgénique



➡ Its expression is testis specific



BRDT endogène interagit avec un peptide H4 tetraacétylé via BD1

