



**HAL**  
open science

# L'acrosome du spermatozoïde de sa biogenèse à son rôle physiologique

Virginie Pierre

► **To cite this version:**

Virginie Pierre. L'acrosome du spermatozoïde de sa biogenèse à son rôle physiologique. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS035 . tel-01552681

**HAL Id: tel-01552681**

**<https://theses.hal.science/tel-01552681>**

Submitted on 3 Jul 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 : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Virginie PIERRE**

Thèse dirigée par **Christophe ARNOULT**

préparée au sein du **Laboratoire AGIM CNRS/UJF**  
dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

# L'acrosome du spermatozoïde, de sa biogenèse à son rôle physiologique.

Thèse soutenue publiquement le « **7 mai 2013** »,  
devant le jury composé de :

**Monsieur, François, BOUCHER**

Professeur à l'Université de Grenoble, Président

**Madame Sophie, ZINN**

Directrice de recherche CEA, Rapporteur

**Monsieur Daniel, VAIMAN**

Directeur de recherche INSERM, Rapporteur

**Monsieur Serge, NEF**

Professeur associé, Université de Genève, Membre

**Monsieur Pierre, RAY**

Maître de conférence, Université de Grenoble, Membre

**Monsieur Christophe, ARNOULT**

Directeur de recherche CNRS, Directeur de thèse



## **Remerciements**

Je remercie les membres du jury : le docteur Sophie Zinn et le docteur Daniel Vaiman d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le docteur Pierre Ray, le docteur Serge Nef et le professeur François Boucher pour leur participation à l'évaluation de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement le docteur Christophe Arnoult de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein de son laboratoire. Son encadrement m'a permis de mener cette thèse à son terme avec des publications.

Je remercie les membres de mon ancienne équipe du GIN où j'ai effectué la moitié de ma thèse. Je remercie donc le Dr. Michel De Waard et Michel Ronjat pour les conseils qu'ils m'ont apportés sur certaines difficultés que j'ai rencontrées au cours de ma thèse. Je les remercie particulièrement pour m'avoir permis de continuer à réaliser certaines de mes manipulations au sein du laboratoire après notre installation dans le bâtiment Jean Roget.

Je remercie les membres de mon équipe actuelle le Dr Véronique Sartre et le Dr Sylviane Hennebic pour m'avoir permis de m'ouvrir au monde de la recherche médicale et de leurs applications cliniques.

Je remercie les étudiants et thésards qui m'ont aidé à installer le matériel de notre nouveau laboratoire. Je remercie Eloi, Guillaume, Charles, Sophie, Roland, Léa, Kostis.

Je remercie tout particulièrement Sandra, en stage de master 2, qui m'a aidée dans l'acquisition des résultats pour la réponse aux critiques du papier sur la protéine DPY19L2. Bonne poursuite en thèse...

Je remercie Caroline stagiaire de M1 et future psychiatre avec qui je partage la passion du vol en parapente et j'espère que l'on aura encore de nombreuses occasions de partager un coin de ciel.

Merci à mes amis, maintenant éparpillés aux 4 coins du monde et ceux avec qui j'ai fait mes premières bulles au sein de l'école de plongée des universités de Grenoble. Je remercie particulièrement Jean-Marc qui m'a poussée à encadrer au sein de cette école, une très bonne thérapie pour dépasser sa timidité et un vrai plaisir de transmettre sa passion.

Une pensée pour Lionel sur son vélo. Allez! Plus que 13 000 km avant d'atteindre le Pamir!

Un grand merci à mes colocataires passés et surtout actuels qui m'ont supportée et soutenue au cours de cette rédaction. Merci à Claire, Max pour le ravitaillement en chocolat, mon carburant au cours de cette rédaction.

Et bien sûr un merci tout particulier à ma famille, mes parents, ma sœur et mes frères, cette thèse leur est dédiée.

## ABREVIATIONS

ATP: adénosine triphosphate  
EOR: espèces réactives de l'oxygène  
FISH: hybridation fluorescente in situ  
IP3: inositol tri-phosphate  
kDa: kilo Dalton  
KO: Knock Out  
MAE: membrane acrosomale externe  
MAI: membrane acrosomale interne  
mA: milli Ampère  
mM: mili Molaire  
ms: milli seconde  
mV: milli Volt  
nM: nano Molaire  
NLS: nuclear localization signal  
OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
PI: pièce intermédiaire  
PIP2: phosphatidyl inositol diphosphate  
PMA: procréation médicalement assistée  
PP: pièce principale  
PRM: protamines  
PSA: prostate Specific Antigen  
PT: pièce terminale  
RA: réaction acrosomique  
SDS: Sodium dodecyl sulfate  
SNARE: Soluble NSF Attachment Protein  
ZP: zone pellucide

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>6</b>
DESCRIPTION GENERALE DE LA FECONDATION .....	6
I. LE SPERMATOZOÏDE, UNE CELLULE HAUTEMENT SPECIALISEE.....	7
1) <i>Anatomie cellulaire du spermatozoïde</i> .....	7
1.1) L'acrosome .....	8
1.2) Le noyau.....	9
1.3) La thèque périnucléaire .....	9
1.4) Le flagelle .....	9
1.5) Structures cellulaires de l'ovocyte interagissant avec le spermatozoïde.....	12
1.5.1) Le cumulus oophorus .....	12
1.5.2) La zone pellucide .....	12
2) <i>La physiologie spermatique</i> .....	13
2.1) La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme .....	14
2.2) La capacitation .....	15
2.2.1) Les modifications de la composition lipidique de la membrane plasmique .....	15
2.2.1.1) La composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde .....	15
2.2.1.2) L'efflux de cholestérol.....	16
2.2.1.3) Le bicarbonate activateur de la voie de signalisation AMPc/Protéine Kinase A (PKA).....	16
2.2.2) Une modification de la concentration ionique intracellulaire.....	17
2.2.2.1) Le rôle du calcium .....	17
2.2.2.2) Les canaux calciques dans le spermatozoïde .....	18
2.2.3) L'hyperactivation flagellaire.....	21
2.3) La réaction acrosomique .....	22
2.3.1) Le calcium un acteur clé .....	22
2.3.2) La fusion membranaire .....	23
2.3.3) La réaction acrosomique est aussi contrôlée par les lipides .....	24
2.4) La fusion gamétique et l'activation ovocytaire.....	25
2.5) Les phospholipases un acteur de la physiologie spermatique.....	27
II LA PRODUCTION DE SPERMATOZOÏDE .....	30
1) <i>Les testicules : un tissu multicellulaire</i> .....	30
1.1) L'espace interstitiel .....	31
1.2) Les cellules de Leydig.....	31
1.3) Les cellules myoïdes .....	32
1.4) Les cellules de Sertoli .....	32
1.5) La barrière hémato-testiculaire.....	33
2) <i>La spermatogénèse</i> .....	35
2.1) Les différentes étapes de la spermatogénèse .....	35
2.1.1) Phase mitotique .....	35
2.1.2) La phase méiotique .....	35
2.1.3) La spermiogénèse.....	36
2.1.4) Organisation de la spermatogénèse .....	36
2.2) La condensation de la chromatine .....	37
2.2.1) Le nucléosome .....	37
2.2.2) La compaction de l'ADN est polarisée .....	39
2.3) La biogénèse de l'acrosome .....	39
2.3.1) La phase de Golgi .....	39
2.3.2) La phase de la casquette.....	40
2.3.3) La phase de l'acrosome et de la maturation .....	41
2.3.4) La spermiation .....	42
2.4) Le complexe acrosome –acroplaxome manchette .....	42
2.4.1) Les forces internes exercées sur le spermatozoïde .....	43
2.4.2) Les forces externes exercées sur le spermatozoïde .....	43
3) <i>Emission des spermatozoïdes</i> .....	44
III LES PATHOLOGIES DU SPERMATOZOÏDE .....	45
1) <i>Les différents types d'infertilité masculine</i> .....	46
1.1) L'asthénozoospermie .....	46
1.2) L'azoospermie .....	46
1.3) L'oligospermie .....	47
1.4) La nécrospermie .....	47
1.5) Les tératospermies.....	47
2) Les principales causes génétiques connues .....	47
2.1) Les anomalies chromosomiques.....	48

2.2) Les mutations du gène CFTR.....	48
2.3) Les micro-délétions du chromosome Y.....	48
2.4) Des mutations génétiques sur les autosomes.....	49
3) <i>La globozoospermie</i> .....	50
3.1) Définition.....	50
3.2) Les gènes impliqués dans la globozoospermie humaine et murine.....	50
3.2.1) Les gènes impliqués dans le transport vésiculaire.....	51
2.1.1) CSNK2A2.....	51
2.1.2) GOPC.....	51
2.1.3) ZBP1 et ZBP2.....	52
2.1.4) HSP90B1.....	53
2.1.5) GABA2.....	53
2.1.6) HRB.....	54
2.1.7) PICK1.....	54
2.1.8) SPATA16.....	55
2.1.9) SPACA1.....	55
IV INTERACTIONS DU NOYAU AVEC LE CYTOSQUELETTE DANS LE CONTEXTE DE LA SPERMATOGENESE.....	56
1) <i>L'enveloppe nucléaire, ses rôles</i> .....	56
1.1) La lamine.....	57
1.2) Le rôle des lamines.....	58
1.3) Les protéines de la membrane nucléaire.....	59
1.3.1) Les protéines LINC.....	59
1.3.1.1) Les protéines KASH.....	60
1.3.1.2) Les protéines SUN.....	61
1.3.2) Les protéines LINC impliquées dans la transmission des forces.....	62
1.3.3) Les protéines SUN dans la spermatogénèse.....	63
1.3.3.1) SUN1 et SUN2.....	63
1.3.3.2) SUN3 à SUN5.....	64
1.3.3.3) Les autres rôles des protéines LINC.....	66
<b>RESULTATS.....</b>	<b>67</b>
ARTICLE 1. LA PHOSPHOLIPASE A2 SECRETEE DE GROUPE X DIMINUE LA MOBILITE SPERMATIQUE CHEZ LA SOURIS.....	68
1) <i>Contexte de l'étude et question scientifique</i> .....	68
2) <i>Méthodologie sur les mesures de la mobilité spermatique</i> .....	70
3) <i>Principaux résultats et discussion</i> .....	71
ARTICLE 2. UNE DELETION RECURRENTE DU GENE DPY19L2 EST A L'ORIGINE D'UNE INFERTILITE MASCULINE PRESENTANT UN BLOCAGE DE L'ELONGATION DE LA TETE DU SPERMATOZOÏDE AINSI QUE DE LA FORMATION DE L'ACROSOME.....	83
1) <i>Contexte de l'étude et question scientifique</i> .....	83
2) <i>Méthodologie et découverte du gène DPY19L2</i> .....	83
3) <i>Discussion</i> .....	84
4) <i>Perspectives : compréhension de la pathogénie moléculaire</i> .....	85
ARTICLE 3. L'ABSENCE DE DPY19L2, UNE NOUVELLE PROTEINE DE LA MEMBRANE NUCLEAIRE INTERNE, EST RESPONSABLE DE LA GLOBOZOOSPERMIE EN EMPECHANT L'ANCRAGE DE L'ACROSOME SUR LE NOYAU.....	98
1) <i>Contexte de l'étude et question scientifique</i> .....	98
2) <i>Méthodologie et principaux résultats</i> .....	98
3) <i>Perspectives</i> .....	99
4. DPY19L2, UNE PROTEINE PARTENAIRE DE LA PROTEINE SUN5.....	116
1) <i>Découvertes de mutations sur le gène DPY19L2</i> .....	116
1.1) La mutation Q342.....	117
1.2) La mutation M358K.....	117
1.3) La mutation R290H.....	117
2) <i>Stratégie de recherche de partenaires moléculaires</i> .....	117
2.1) Matériel et méthodes.....	118
2.1.1) Culture cellulaire et transfection.....	118
2.1.2) Dissociation des cellules spermatogéniques.....	118
2.1.3) Purification des noyaux et extraction des protéines.....	118
2.1.4) Les peptides R26 et H26.....	118
2.1.5) Pull Down.....	119
2.1.6) Anticorps.....	119
2.1.7) Western blot.....	119
3) <i>Résultats</i> .....	119
4) <i>Discussion et perspectives</i> .....	121

<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>124</b>
I) PROJET SPLA2 .....	124
1.1) <i>Discussion et conclusion</i> .....	124
1.2) <i>Les perspectives à court termes concernant le projet sPLA2 spermatiques</i> .....	126
1.2.1) Recherche de la sPLA2 spécifique au spermatozoïde humain.....	126
1.2.2) Identification du mécanisme de sélection des spermatozoïdes par mGX .....	126
1.2.3) Quel est le profil lipidique des spermatozoïdes sensibles aux sPLA2s.....	127
II) PROJET Dpy19L2.....	127
1.1) <i>Discussion et conclusion</i> .....	127
1.2) <i>Les perspectives à court terme concernant le projet Dpy19l2</i> .....	128
1.2.1) Confirmer la topologie de la protéine Dpy19l2 .....	128
1.2.2) Rechercher les protéines partenaires de Dpy19l2 .....	128
1.2.3) Etude de l'impact de Dpy19l2 sur la compaction et la fragmentation de l'ADN .....	129
1.2.4) Améliorer les résultats d'ICSI pour les patients globozoopermiques .....	130
III) CONCLUSION GENERALE.....	131
 <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	 <b>132</b>
 ANNEXES Les autres articles auxquels j'ai participé.....	 150
 RESUME.....	 178

# **Partie 1**

## **INTRODUCTION**



## INTRODUCTION

### *Description générale de la fécondation*

La fécondation correspond à l'ensemble des étapes permettant la fusion de deux cellules possédant chacune la moitié du matériel génétique nécessaire à la formation d'un nouvel individu. Ces cellules sont appelées gamètes et leur formation passe par une étape de méiose qui est la première étape du brassage génétique généré par la reproduction sexuée. Chez les mammifères le gamète femelle, appelé ovocyte, reste dans les voies génitales femelles, tandis que les gamètes mâles, appelés spermatozoïdes, sont expulsés des voies génitales mâles et déposés à l'entrée des voies génitales de la femelle. Les spermatozoïdes parcourent la totalité des voies génitales femelles où ils subissent plusieurs mécanismes de sélection pour parvenir jusqu'à l'ovocyte. En effet, plusieurs dizaines à plusieurs centaines de millions de spermatozoïdes sont déposées mais moins d'une centaine atteindra l'extrémité distale de l'oviducte, où les ovocytes sont localisés. Au cours de cette traversée, ils vont subir un ensemble de modifications biochimiques ainsi qu'une réorganisation de la membrane plasmique, qui correspond à une étape de maturation appelée aussi «*capacitation*». La capacitation va permettre entre autre au spermatozoïde d'acquérir une plus grande mobilité lui permettant de traverser le cumulus constitué d'un amas de cellules nourricières qui entoure l'ovocyte (figure 1). Au cours de la capacitation, les protéines nécessaires à la réaction acrosomique sont rendues fonctionnelles, soit par des modifications chimiques comme des phosphorylations, soit par leur relocalisation. La réaction acrosomique, nécessaire au pouvoir fécondant du spermatozoïde, est une étape d'exocytose qui permet au spermatozoïde de traverser la zone pellucide qui forme une barrière de glycoprotéines entourant l'ovocyte. Cette étape est suivie de la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte. Une fois que les gamètes mâle et femelle ont fusionné, les deux pronucléus vont se rejoindre et s'associent pour former une cellule diploïde possédant la totalité du matériel génétique nécessaire à la formation d'un nouvel individu après un long processus de développement.

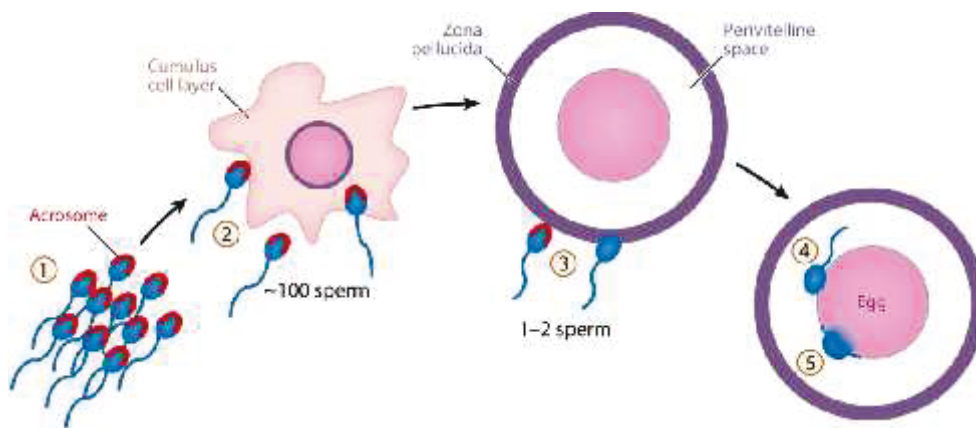


Figure 1: Processus de fécondation. 1) les spermatozoïdes sont déposés à l'entrée du tractus génital femelle et les remontent. 2) les spermatozoïdes passent à travers la couche de cellules folliculaires qui constituent le cumulus. 3) les spermatozoïdes en contact avec la zone pellucide réalisent leur réaction acrosomique qui leur permet de traverser cette barrière et d'entrer dans l'espace péri vitellin. 4) le spermatozoïde se lie à la membrane plasmique de l'ovocyte. 5) le spermatozoïde fusionne avec l'ovocyte. (Claw and Swanson, 2012)

## I. Le spermatozoïde, une cellule hautement spécialisée

### 1) Anatomie cellulaire du spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée. Elle est constituée de deux parties : la tête et le flagelle. La tête contient deux structures étroitement liées : le noyau hyper compacté qui contient le matériel génétique paternel sur lequel est fixée une vésicule géante de sécrétion appelée acrosome. Le flagelle lui permet de se déplacer, c'est donc une cellule mobile (Figure 2).

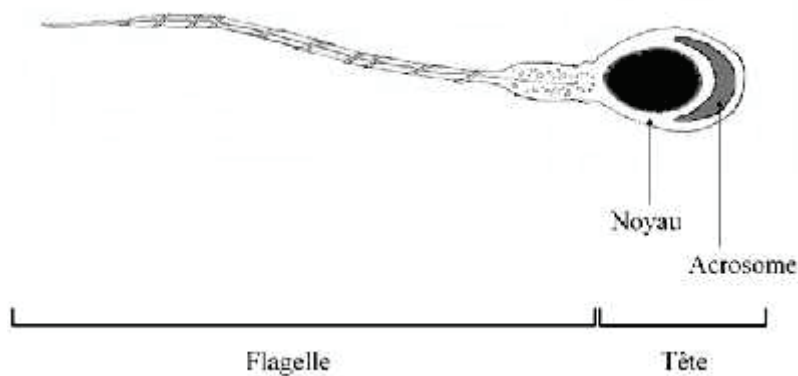


Figure 2: Anatomie du spermatozoïde de mammifère

## 1.1) L'acrosome

C'est une grande vésicule issue de l'appareil de Golgi contenant des enzymes hydrolytiques et protéolytiques comme la  $\beta$ -N-acétylglucosaminidase, les hyaluronidases Spam1, Hyal5 et Hyalp1, la phosphatase acide et l'acrosine qui elle coupe les pontages entre ZP1, ZP2 et ZP3 de la zone pellucide entourant l'ovocyte. L'exocytose de cette vésicule, appelée réaction acrosomique, est déclenchée par la liaison de récepteurs spermatiques aux glycoprotéines de la zone pellucide. ZP3 est chez la souris la protéine qui déclenche la réaction acrosomique (*Arnoult et al., 1999*).

La membrane qui entoure l'acrosome est divisée en deux parties : la membrane de l'acrosome interne (MAI) et la membrane de l'acrosome externe (MAE). La MAI est la partie la plus interne de l'acrosome, située juste au dessus du noyau. Elle est ancrée à la surface du noyau grâce à une structure de cytosquelette, la thèque périnucléaire (*Yoshinaga and Toshimori, 2003*).

La membrane de l'acrosome externe (MAE) correspond à la partie de la membrane qui sépare l'acrosome du cytoplasme. Au cours de la réaction acrosomique la MAE fusionne avec la membrane plasmique grâce au complexe de protéines spécialisées dans la fusion membranaire, les protéines SNARE. Après la RA, il ne reste plus que la MAI qui demeure intacte jusqu'à la fusion du spermatide avec l'ovocyte (*Ramalho-Santos et al., 2002*); (*Yoshinaga and Toshimori, 2003*). Il faut noter qu'afin d'assurer l'intégrité de l'homéostasie cellulaire, la MAI fusionne avec la membrane plasmique dans la partie postérieure de l'acrosome. La MAI joue alors le rôle de membrane plasmique jusqu'à la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (figure 3).

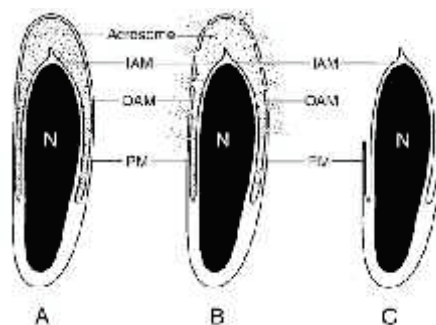


Figure 3 : Schéma de la réaction acrosomique (RA). (A) acrosome intact, (B) au cours de la RA et (C) après la RA. La vésicule de l'acrosome est constituée de la membrane externe de l'acrosome (MEA) située sous la membrane plasmique (MP) et la membrane interne de l'acrosome (MIA) collée au noyau (N).

## 1.2) Le noyau

Le noyau du spermatozoïde est caractérisé par une compaction extrêmement importante de l'ADN, qui ne permet pas les mécanismes de transcription et traduction. Le noyau est donc dans un état quiescent. L'ADN spermatique est hyper condensé grâce au remplacement des histones par des protamines de deux types PRM1 et PRM2 (**Pradeepa and Rao, 2007**).

## 1.3) La thèque périnucléaire

La thèque périnucléaire est une structure qui se trouve à l'interface noyau acrosome. Elle se forme au stade tardif de la spermiogénèse. Elle est majoritairement constituée de cytosquelette et est insoluble au SDS (**Oko and Sutovsky, 2009**).

Sa structure se compose de deux parties, une partie subacrosomique située sous l'acrosome et une partie post acrosomique située en périphérie de l'acrosome. La thèque périnucléaire pourrait jouer un rôle dans l'ancrage de l'acrosome, dans le remodelage du noyau et enfin dans l'activation ovocytaire.

Elle est constituée de calcine, de cycline I et II (**Lecuyer et al., 2000**), (**Rousseaux-Prevost et al., 2003**), de CAP (capping actine protéine alpha 3 et beta 3) (**Hurst et al., 1998**), (**von Bulow et al., 1997**), et de Arp-T1 et T2 (actin related protein) (**Heid et al., 2002**) et FSCN3 (**Tubb et al., 2002**). Ce sont des protéines qui interagissent avec l'actine. On y retrouve aussi des histones somatiques (**Tovich et al., 2004**) ou encore des variants d'histones tel que subH2Bv (**Aul and Oko, 2002**), ainsi que des protéines CYPT (CYsteine-rich Perinuclear Theca protein) (**Kitamura et al., 2004**).

## 1.4) Le flagelle

Le flagelle est responsable de la mobilité du spermatozoïde. Il présente trois parties, la pièce intermédiaire (PI), la pièce principale (PP) et la pièce terminale (PT) (Figure 4). La PI se trouve juste derrière la tête et c'est une partie plus épaisse que la PP. La PP se trouve dans le prolongement de la pièce intermédiaire et elle représente 5/6 de la longueur totale du spermatozoïde.

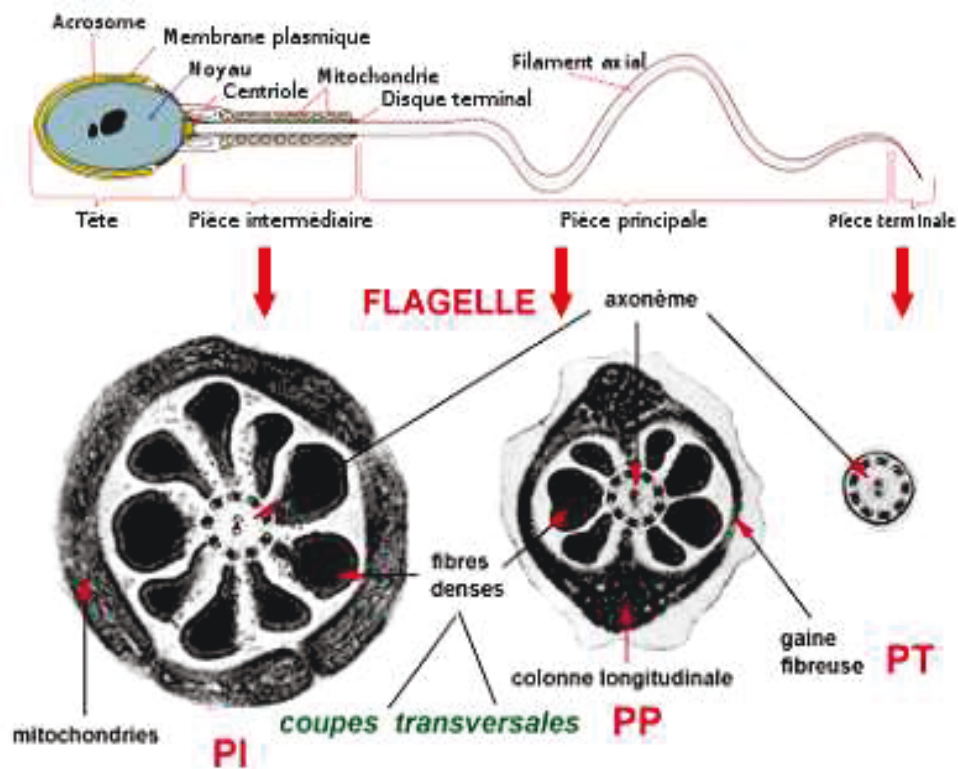


Figure 4: Structure du flagelle d'un spermatozoïde humain. Coupes transversales en microscopie électronique. Le flagelle se compose de trois parties: la pièce intermédiaire, contenant les mitochondries, la pièce principale et la pièce terminale. L'axonème, en position centrale, parcourt tout le flagelle. Des structures périaxonémales sont observables : les fibres denses dans la pièce intermédiaire et principale, et la gaine fibreuse dans la pièce principale seulement. (Ben Khelifa, 2013)

La pièce intermédiaire est composée de deux types de structures: la gaine de mitochondries qui va produire une partie de l'énergie grâce à la phosphorylation oxydative qui produit de l'ATP et l'axonème qui se prolonge dans la pièce principale protégée par une gaine fibreuse. L'extrémité de l'axonème qui se trouve au niveau de la pièce intermédiaire est isolée du cytoplasme par des fibres denses. Au niveau de la PP, une structure supplémentaire est présente, la gaine fibreuse (Figure 4). La gaine fibreuse et les fibres denses sont constituées principalement des mêmes constituants: des polypeptides, des protéines de filaments intermédiaires ainsi que des protéines riches en cystéines et en prolines. La gaine fibreuse possède en plus l'enzyme Akap4 (A-Kinase Anchor Protein 4) (Moretti et al., 2007) ainsi que des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique. C'est d'ailleurs à cet endroit que la production énergétique nécessaire au glissement des microtubules se réalise principalement (>80%), le blocage de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries, n'affecte pas le battement flagellaire. Les fibres denses de la gaine fibreuse pourraient être aussi impliquées dans le soutien de la structure et de l'élasticité du flagelle (Oko, 1988); (Shao et al., 1997).

L'axonème est une structure hautement spécialisée (Figure 5). Elle est constituée de 9 doublets de microtubules organisés en cercle et de deux microtubules centraux. La formation de l'axonème débute par la polymérisation des microtubules à partir d'un des deux centrioles qui a migré sous le noyau du côté opposé à l'acrosome.

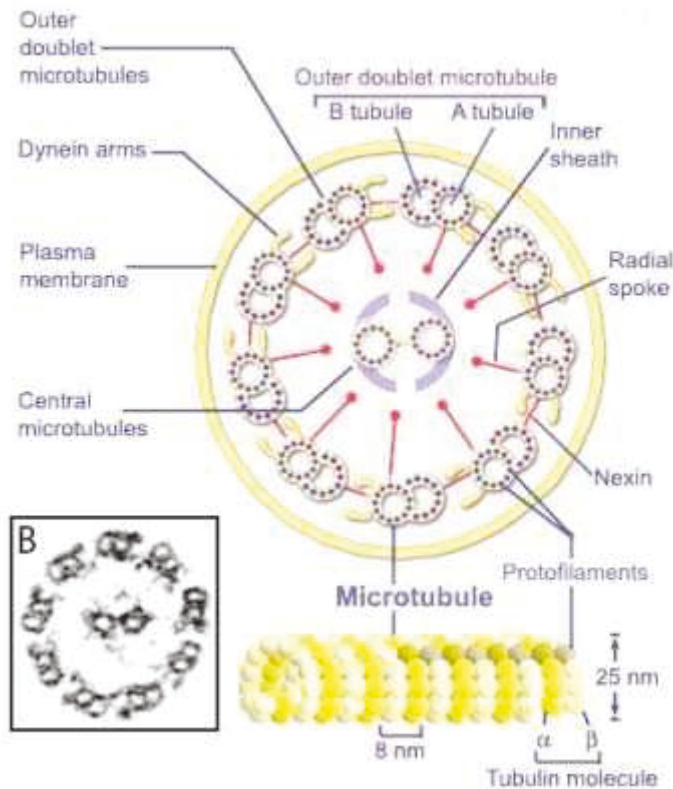


Figure 5: L'axonème du flagelle de spermatozoïde. Schéma de l'axonème du flagelle de spermatozoïde. 9 doublets de microtubules reliés entre eux par de la nexine entourent une paire centrale de microtubules. Les microtubules sont constitués de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , disposés alternativement et font 25 nm de diamètre. Le doublet de microtubule est constitué d'un tubule A qui est lié à la gaine centrale par des fibres radiales et elle porte les bras de dyneine. (Inaba, 2007)

Lorsque les spermatozoïdes sont relâchés dans la lumière des tubules séminifères ils possèdent un flagelle fonctionnel mais qui se trouve à l'état quiescent. Il n'est pas mobile et n'est pas encore capable de réaliser l'exocytose de l'acrosome et d'être fécondant. Une première maturation a lieu dans l'épididyme où le spermatozoïde va acquérir son mouvement flagellaire de base. Il subira une deuxième activation lors de sa remontée des voies génitales femelle, cette étape s'appelle la capacitation.

## **1.5) Structures cellulaires de l'ovocyte interagissant avec le spermatozoïde**

### ***1.5.1) Le cumulus oophorus***

L'ovocyte mature est entouré d'une couche de cellules folliculaires qui forment une sorte de matrice appelé le cumulus oophorus. Ces cellules ont un rôle nourricier de l'ovocyte et elles communiquent avec l'ovocyte notamment lors de l'initiation de l'ovulation. Cette zone est riche en acide hyaluronique. Les spermatozoïdes possèdent des enzymes spécifiques leur permettant de traverser cette zone comme Hyal5. Cette barrière n'est pas indispensable à l'initiation de la fécondation mais les ovocytes ayant conservés cette couche de cellules présentent de meilleurs taux de fécondation dans les techniques de fécondation in vitro. Il semblerait que le cumulus soit capable de préparer le spermatozoïde à réaliser la réaction acrosomique. Ces cellules libèrent aussi un chimioattractant qui a été identifié très récemment, la progestérone. Cette molécule est capable d'activer la mobilité spermatique via un canal calcique appelé Catsper (*Lishko et al., 2011*).

### ***1.5.2) La zone pellucide***

C'est une matrice extracellulaire appelée zone pellucide qui entoure l'ovocyte. La zone pellucide est constituée de glycoprotéines qui forment un maillage. Ces glycoprotéines jouent un rôle majeur dans la reconnaissance du spermatozoïde avec un ovocyte de la même espèce. Chez l'humain il existe 4 types de ZP : ZP1, ZP2, ZP3 et ZP4 chez la souris seules les 3 premières ZP sont présentes. ZP2 et ZP3 sont les ZP qui sont retrouvées communément dans une majorité d'espèces, ce qui laisse supposer qu'elles jouent un rôle majeur dans l'initiation de la réaction acrosomique ou dans le blocage de la polyspermie. De plus, il a été montré que des mutations de ZP2 comme de ZP3 entraînent une zone pellucide mal formée. Les mutants pour ZP1 montrent eux une sous fertilité (*Rankin and Dean, 2000*).

## 2) La physiologie spermatique

Le spermatozoïde est produit dans les tubules séminifères du testicule et se retrouve dans la lumière des tubules. A ce stade, même si le processus de différenciation est terminé, les spermatozoïdes sont des cellules immatures, incapables de féconder les ovocytes. Au cours de leur descente dans le tractus génital mâle, puis lors de leur traversée du tractus génital femelle, ils vont acquérir l'ensemble des compétences leur permettant d'assurer pleinement leur mission de fécondation.

Lors de l'éjaculation, les spermatozoïdes passent par les canaux déférents puis dans l'urètre (Figure 6). Le long de ce parcours les spermatozoïdes vont être associés aux sécrétions de différentes glandes. Les premières glandes débouchant sur les canaux déférents sont les vésicules séminales sécrétant près de 70% du liquide séminal. Leurs sécrétions ont pour fonction la coagulation du sperme, chez l'homme c'est la protéine Semenogelin I qui joue ce rôle (**De Lamirande, 2007**). La production de fructose qui produit une partie de l'énergie nécessaire à la mobilité spermatique. D'autres protéines régulatrices de la mobilité spermatique sont aussi présentes. La production de vitamine C qui protège les spermatozoïdes des agents oxydants. La prostate produit près de 20% du liquide séminal contenant de la *Prostate specific antigen* (PSA) qui par son action protéolytique va lever l'inhibition de la Semenogelin I sur la mobilité spermatique. Précédant l'éjaculation, les sécrétions des glandes bulbo-urétales ou glandes de Cooper permettent de lubrifier et de neutraliser l'acidité du tractus urogénital. Ces sécrétions sont aussi riches en Zinc (**De Lamirande, 2007**). Les glandes préputiales sécrètent du sébum ainsi que des phéromones retrouvées dans les urines. Elles sont aussi présentes chez la femelle.



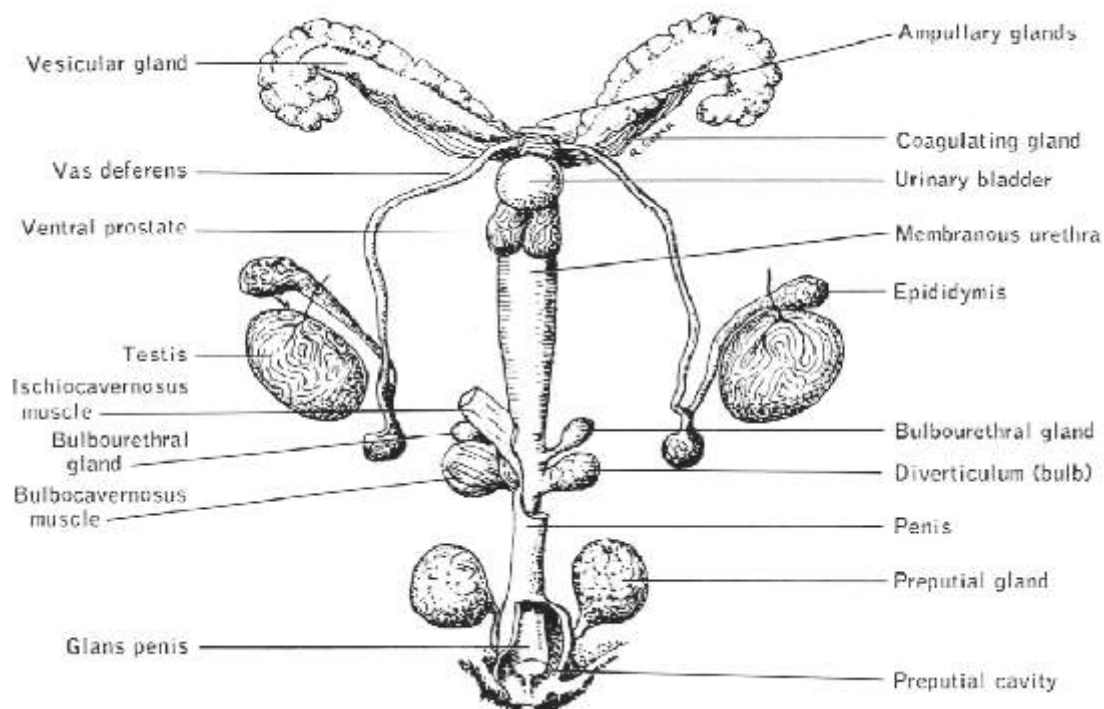


Figure 6: Dessin de l'appareil reproducteur mâle de souris adulte. On distingue deux types d'organes. Les glandes excrétrices qui participent entre autre à la production des spermatozoïdes et à la constitution du liquide dans lequel ils sont émis. Les glandes excrétrices sont les testicules, les vésicules séminales, la prostate, les glandes bulbo-urétales et les glandes préputiales. Et de l'autre côté on trouve l'ensemble des canaux qui permettent d'acheminer le sperme, ce sont les canaux excréteurs qui sont dans l'ordre les canaux éférents, les canaux épидидymaires, les canaux déférents et l'urètre. (Biology of the Laboratory Mouse, 2013)

## 2.1) La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme

Lors de leur passage dans l'épididyme les spermatozoïdes vont subir les premières modifications biochimiques nécessaires à l'acquisition de leur pouvoir fécondant. Les observations les plus notables sont une acquisition progressive de la motilité et une diminution de la taille du noyau. La composition de la membrane plasmique va aussi être modifiée (Jones *et al.*, 2007). Il semblerait que la phospholipase A2 de groupe III joue un rôle fondamental dans la recombposition de la membrane plasmique (Sato *et al.*, 2010). On observe :

-La quantité de certaines protéines va augmenter suite à la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme ; la protéine heat-shock 70, l'actine, la  $\beta$ -tubuline, l'acide lactique déshydrogénase, les protéines mitochondriale telles que l'aconitase et la sous unité  $\beta$  de l'ATPase F1 (Aitken *et al.*, 2007). Le reste de cytoplasme présent sous forme d'une gouttelette présente au niveau de la pièce intermédiaire est éliminé ainsi que les cellules en dégénérescence (Marengo, 2008).

-La compaction du noyau a lieu lors de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme. Des ponts disulfures sont créés entre les protamines ce qui contribue à protéger l'ADN de la dégradation par les molécules oxydantes présentes en grande quantité dans l'épididyme où elles participent à la maturation des spermatozoïdes. En effet les espèces réactives de l'oxygène (EOR) sont nécessaires à la formation liaison entre les groupements SH via le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui libère du dioxygène (O<sub>2</sub>) (*Noblanc et al., 2012*).

## **2.2) La capacitation**

La capacitation correspond à l'ensemble des modifications physiologiques post éjaculation qui vont permettre au spermatozoïde d'acquérir son pouvoir fécondant. A la suite de la capacitation il va être capable de réaliser la réaction acrosomique nécessaire à la pénétration de la zone pellucide. Il devient aussi capable d'entrer dans un état d'hyperactivation flagellaire qui lui permettra de progresser dans le cumulus et de traverser la zone pellucide. Cette étape a lieu lors de la traversée des voies génitales femelles par le spermatozoïde. L'ensemble des processus qui rentrent en jeu dans ce phénomène ne sont pas connus, mais certains mécanismes ont été mis à jour. Ils sont ici rassemblés en 2 grandes parties ; les modifications de la composition lipidique de la membrane plasmique et le rôle du calcium.

### ***2.2.1) Les modifications de la composition lipidique de la membrane plasmique***

#### **2.2.1.1) La composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde**

La membrane plasmique des spermatozoïdes possède un taux élevé de cholestérol (*Mack et al., 1986*); (*Alvarez and Storey, 1995*); (*Martinez and Morros, 1996*) ainsi que des glycérophospholipides et des sphingomyélines. La membrane plasmique avant la capacitation est rigidifiée par la présence du cholestérol. La composition lipidique de la membrane plasmique du spermatozoïde varie beaucoup en fonction de l'espèce. Néanmoins les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE) sont les composants majoritaires chez toutes les espèces et quel que soit l'état de capacitation. Le cholestérol lui est le deuxième composant majeur de la membrane spermatique. Il est 26 fois plus présent dans la membrane spermatique que dans la membrane des autres cellules. Le cholestérol en présence de glycérophospholipide et de sphingomyéline a tendance à former des radeaux lipidiques qui limitent la diffusion des lipides (*Martinez and Morros, 1996*) et contribue à

rigidifier la membrane (*Schroeder et al., 1991*). Les échanges de phospholipides entre les deux feuilletts de la membrane sont ainsi limités. Tout comme la perméabilité de la membrane aux ions. Il se crée ainsi une asymétrie de la répartition des différents lipides entre les deux feuilletts. Les phosphatidylsérines (PS) et phosphatidyléthanolamines (PE) sont majoritairement retrouvées dans le feuillet interne tandis que les phosphatidylcholines (PC) et sphingomyélines sont en majorité dans le feuillet externe (*Flesch et al., 2001a*); (*Flesch et al., 2001b*); (*Gadella et al., 2008*). Deux mécanismes, l'entrée de bicarbonate dans le spermatozoïde ainsi que l'efflux de cholestérol, entraînent des modifications majeures de la composition de la membrane plasmique du spermatozoïde.

### **2.2.1.2) L'efflux de cholestérol**

C'est l'étape majeure d'initiation de la capacitation. Le liquide du tractus génital femelle possède des protéines ayant une forte affinité pour les lipides. Ces protéines vont piéger le cholestérol et l'extraire de la membrane plasmique du spermatozoïde. L'albumine présente dans les voies génitales femelles joue ce rôle (*Martinez and Morros, 1996*); (*Nolan and Hammerstedt, 1997*); (*Harrison and Gadella, 2005*); (*Visconti et al., 1999a*).

Des HDL (high density lipoproteins) sont aussi présentes au niveau du liquide folliculaire et de l'oviducte (*Visconti et al., 1999b*). Le liquide séminal avec lequel sont mélangés les spermatozoïdes au moment de leur émission possède lui aussi des protéines lipophiles, exemple les BSP (bovine séminal plasma) chez le bovin. Ces deux types de protéines pourraient être aussi associées et avoir une action synergique (*Therien et al., 2001*).

### **2.2.1.3) Le bicarbonate activateur de la voie de signalisation AMPc/Protéine Kinase A (PKA)**

La diminution du cholestérol entraîne des changements de perméabilité de la membrane plasmique du spermatozoïde. Une augmentation importante de la concentration cytoplasmique du bicarbonate est observée lors de l'étape de capacitation du spermatozoïde. L'entrée de bicarbonate se fait suivant le gradient de concentration des ions. En effet le spermatozoïde est initialement maintenu dans le liquide de l'épididyme qui à une concentration en bicarbonate comprise entre 3 et 4 mM. Le liquide présent dans le tractus génital femelle lui est supérieur à 20 mM. Le flux entrant de bicarbonate passe par les canaux échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  et les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  ce qui induit une baisse temporaire de la concentration cytoplasmique en ions chlore ( $\text{Cl}^-$ ) et sodium ( $\text{Na}^+$ ) (*Wang et al., 2003*).

Cette entrée du bicarbonate est une des toutes premières étapes de la capacitation, elle

va induire l'activation adénylate cyclase soluble. Celle-ci va alors produire de l'AMPc à partir des molécules d'ATP disponibles. L'AMPc ainsi produite sera alors capable d'activer la protéine kinase A. Cette protéine une fois activée est capable de phosphoryler des protéines et ainsi de les rendre actives. Elle va ainsi phosphoryler les scramblases des protéines transmembranaires (*Darszon et al., 2006*); (*Vadnais et al., 2007*). Celles-ci sont capables de modifier la répartition des lipides membranaires entre les deux feuillettes en externalisant les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines. Elle va aussi activer les protéines Akap ou encore la dynéine axonémale.

### **2.2.2) Une modification de la concentration ionique intracellulaire**

L'entrée des ions bicarbonate fait augmenter le pH interne du spermatozoïde (*Arnoult et al., 1996b*). Cette augmentation du pH interne va activer des canaux qui vont faire sortir du potassium K<sup>+</sup> (*Darszon et al., 2006*) entraînant l'hyperpolarisation de la membrane qui passe de -35/45 mV à -80 mV (*Arnoult et al., 1999*). Ce qui a pour effet de lever l'inactivation des canaux calciques dépendants du voltage, dont l'activation aurait lieu au cours de l'étape suivante, la réaction acrosomique. Cette étape s'accompagne d'une augmentation modérée de la concentration de calcium cytoplasmique, qui passe de 70 nM à 250 nM (*Fraser, 1987*); (*Baldi et al., 1991*); (*Marin-Briggiler et al., 2003*). Ceci est permis grâce à l'activation de pompes calciques ATP dépendantes et de canaux dépendants de l'AMPc ainsi que des échangeurs d'ions Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (*DasGupta et al., 1993*); (*Visconti et al., 1995*); (*Jagannathan et al., 2002*); (*Visconti et al., 2002*).

#### **2.2.2.1) Le rôle du calcium**

Le calcium joue deux rôles majeurs dans la capacitation du spermatozoïde. Il a un rôle de messenger secondaire en activant plusieurs enzymes dont l'activité calcium dépendante va entraîner la potentialisation (par phosphorylation) de plusieurs protéines. Le calcium entraîne ainsi l'activation de l'adénylate cyclase ainsi que d'une PLA2 intracytoplasmique. La production d'AMPc par l'adénylate cyclase entraîne la phosphorylation en cascade de protéines sur leurs résidus tyrosines. La phospholipase C est ainsi activée suite à sa phosphorylation.

Cette entrée du bicarbonate est une des toutes premières étapes de la capacitation, elle va induire l'activation adénylate cyclase soluble. Celle-ci va alors produire de l'AMPc à

partir des molécules d'ATP disponibles. L'AMPc ainsi produite sera alors capable d'activer la protéine kinase A. Cette protéine une fois activée est capable de phosphoryler des protéines et ainsi de les rendre actives. Elle va ainsi phosphoryler les scramblases des protéines transmembranaires (*Darszon et al., 2006*); (*Vadnais et al., 2007*). Celles-ci sont capables de modifier la répartition des lipides membranaires entre les deux feuillettes en externalisant les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines. Elle va aussi activer les protéines Akap ou encore la dynéine axonémale.

#### **2.2.2.2) Les canaux calciques dans le spermatozoïde**

L'augmentation de calcium au sein de la cellule s'effectue généralement par la mobilisation des deux stocks que sont le calcium situé dans le réticulum endoplasmique et le calcium extracellulaire. Les canaux calciques sont des canaux constitués de nombreux segments transmembranaires qui permettent un transport passif du calcium selon leur gradient électrochimique. C'est-à-dire que le passage du calcium s'effectue en fonction de la différence de concentration ionique ainsi que de la différence du potentiel électrique de part et d'autre de la membrane plasmique. Les canaux calciques appartiennent à la famille des canaux ioniques qui font passer sélectivement les ions potassium ( $K^+$ ), chlore ( $Cl^-$ ), sodium ( $Na^+$ ) et calcium ( $Ca^{2+}$ ). L'ouverture de ces canaux peut être due soit à la liaison d'un ligand spécifique directement sur le canal possédant un récepteur ou sur une protéine couplée au canal, soit par un changement de potentiel de la membrane pour les canaux voltage dépendants.

##### a) Les SOC pour « Store Operated Channel »

Les canaux SOC sont activés par la vidange des stocks calciques intracellulaires, les TRP (Transient receptor Protein) sont leurs principaux représentants. Ils permettent une entrée importante de calcium lorsque des signalisations calciques soutenues sont nécessaires et fournissent le calcium pour remplir à nouveau les stocks calciques intracellulaires. Plusieurs membres des TRP ont été décrits dans le spermatozoïde (*Jungnickel et al., 2001*). Les canaux TRPC2 sont impliqués dans la réaction acrosomique. D'autres, comme TRPC1 ou TRPC3, ont des rôles encore mal compris (*Stambouljian et al., 2005*).

L'activation des SOC qui fait suite à la vidange des stocks calciques intracellulaires implique des protéines très particulières appelées STIM et est encore l'objet d'études

approfondies. L'activité des TRPs peut être modulée par des médiateurs lipidiques.

b) Le récepteur à l'inositol 1.4.5 triphosphate (IP3R)

L'IP3R est un canal de la membrane intracellulaire et est responsable de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks internes. Au niveau du spermatozoïde, on le retrouve majoritairement au niveau de la vésicule acrosomique (*Walensky and Snyder, 1995*) mais aussi dans un réseau membranaire spécifique du spermatozoïde situé dans le prolongement des membranes nucléaires au niveau de la pièce intermédiaire (*Ho and Suarez, 2001*). Ce canal récepteur tétramérique est activé par la liaison de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) qui est généralement généré suite à l'hydrolyse de PIP2 par la PLC. L'activation des PLC est induite par la stimulation de récepteurs couplés aux protéines G ou d'un récepteur aux tyrosines kinases. Le récepteur à l'IP3 est aussi capable de générer des oscillations de calcium suite à des cycles de phosphorylation-déphosphorylation de ce dernier (*Lee et al., 2006*).

c) Les canaux dépendants du voltage (VDCCs)

Ces canaux calciques sont activés par une dépolarisation de la membrane. Ils sont classés en fonction de leurs caractéristiques biophysiques, pharmacologiques et phylogéniques (*Nargeot and Charnet, 1994*). Ainsi six canaux ont été identifiés et regroupés en deux familles.

Les canaux HVA (High Voltage-Activated) qui sont activés par de fortes dépolarisations membranaires de -90 à 0 mV. Ces canaux appartiennent aux sous-familles  $\text{Ca}_v1.x$  et  $\text{Ca}_v2.x$ .

Les Canaux LVA (Low Voltage-Activated) qui sont activés par de faibles dépolarisations membranaires de -90 à -50 mV. Ces canaux sont de type T (Transient), ils sont caractérisés par un courant transitoire qui s'inactive avec des constantes de temps de l'ordre de 10 à 50 ms. Ces canaux appartiennent aux sous-familles  $\text{Ca}_v3x$ .

Au niveau des spermatozoïdes, des membres de ces deux familles sont présents ( $\text{Ca}_v1.2$ , 2.2, 3.1, 3.2) (*Escoffier et al., 2007*). Ils sont essentiellement impliqués dans la réponse calcique au cours de la réaction acrosomique et du mouvement flagellaire (Figure 7).

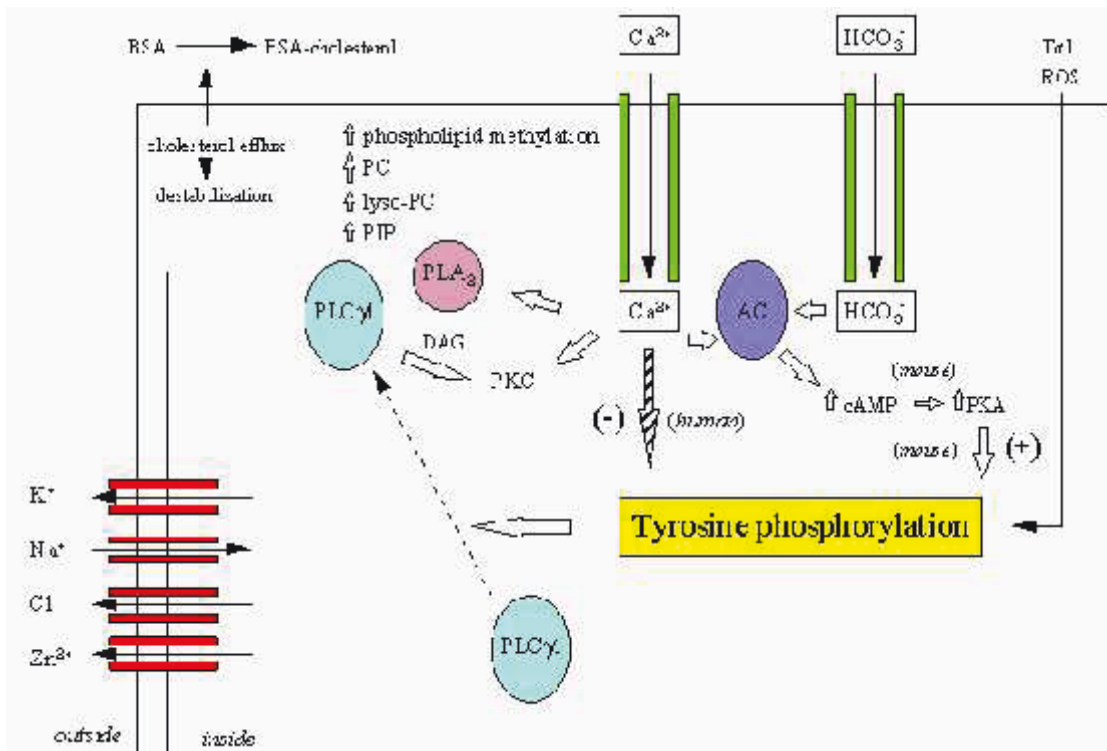


Figure 7: Schéma montrant les différents événements moléculaires connus au cours de la capacitation. D'après (Baldi et al., 2002)

#### d) Le canal CatSper

Le canal CatSper est un canal calcique essentiel à la mobilité du spermatozoïde (*Ren et al., 2001*). Sa structure est similaire à celle des canaux potassiques et forme un pore constitué de 4 sous-unités différentes (CatSper 1-4), chacune comportant 6 segments transmembranaires (*Qi et al., 2007*). Au moins 2 sous-unités accessoires (CatSper  $\beta$  et  $\gamma$ ) sont liées à ce canal et sont nécessaires à son fonctionnement (*Wang et al., 2009*); (*Chung et al., 2011*). Ce canal est dépendants du voltage et est fortement activé par une alcalinisation intracellulaire (*Kirichok et al., 2006*). Il est localisé dans la pièce principale du flagelle du spermatozoïde et est responsable de l'hyperactivation nécessaire à la traversée de la couche protectrice de l'ovocyte appelée zone pellucide (ZP). Des souris *knock out* déficientes pour n'importe quelle sous-unité du canal CatSper sont totalement stériles car leurs spermatozoïdes sont incapables de traverser la ZP. Grâce à la technique de *patch clamp*, les courants ioniques traversant la membrane plasmique du spermatozoïde peuvent être mesurés, et plus particulièrement les courants portés par l'ouverture du canal CatSper (*Kirichok et al., 2006*). L'ouverture du canal CatSper peut également être objectivée par la mesure de la concentration du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) interne par l'intermédiaire de sondes fluorescentes spécifiques au  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ***2.2.3) L'hyperactivation flagellaire***

L'hyperactivation flagellaire est nécessaire à la remontée du spermatozoïde dans les voies génitales femelles. Cette hyperactivation a normalement lieu au niveau de l'oviducte et est caractérisée par des battements asymétriques et de grande amplitude du flagelle. Ces battements génèrent des mouvements de nage circulaires ou en hélices (*Yanagimachi et al., 1993*) dans un milieu dont la viscosité est faible. Les spermatozoïdes fraîchement éjaculés ont un battement flagellaire qui est symétrique et de faible amplitude conduisant à une nage lente et rectiligne. L'hyperactivation est souvent considérée comme appartenant à la capacitation (*Visconti, 2009*). Elle joue plusieurs rôles, elle permet aux spermatozoïdes associés aux cellules de l'oviducte qui les maintiennent en vie plus longtemps de se détacher (*Pacey et al., 1995*); (*Suarez and Pacey, 2006*). L'hyperactivation permet aussi au spermatozoïde de progresser à travers le mucus de l'oviducte et de traverser le cumulus qui entoure l'ovocyte (*Suarez and Dai, 1992*); (*Quill et al., 2003*). Elle permet enfin au spermatozoïde de pénétrer la zone pellucide jusqu'à l'ovocyte (*Stauss et al., 1995*). Le calcium joue un rôle central dans l'hyperactivation, l'élévation de la concentration interne de calcium est requise pour initier les battements flagellaires puis pour les maintenir. Le calcium extracellulaire via les canaux CatSper (comme le calcium intracellulaire) sont mobilisés lors de l'hyperactivation (*Chang and Suarez, 2011*). Une entrée initiale de calcium extracellulaire par les canaux CatSper va entraîner le relâchement du calcium des stocks calciques présents dans la pièce intermédiaire vers le cytoplasme (Figure 8). CatSper est un canal sensible au pH et voltage dépendant uniquement exprimé dans les cellules germinales masculines. Il est situé sur la pièce principale du spermatozoïde au niveau de la membrane plasmique. Les KO de CatSper sont infertiles et ne peuvent être hyperactivés (*Ho et al., 2009*). Les facteurs qui impliquent l'hyperactivation ne sont pas tous connus mais il a été récemment montré que la progestérone sécrétée par les cellules du cumulus active le canal CatSper et joue ainsi un rôle de chimio attractant.



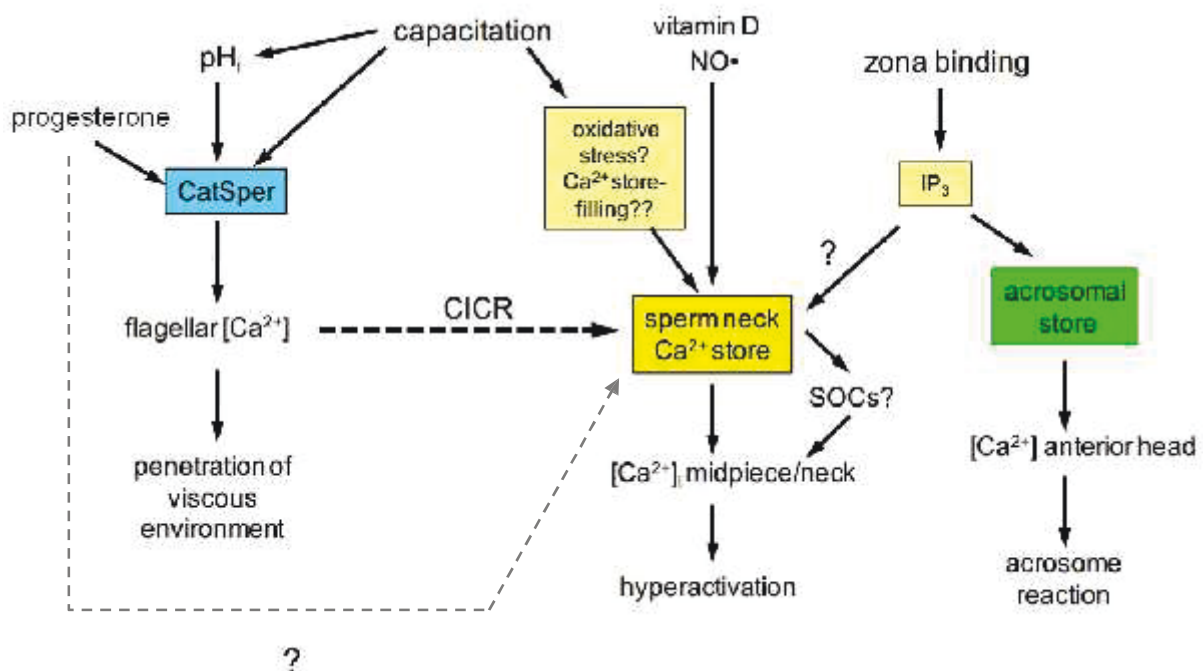


Figure 8: Modèle de l'interaction des entrées de calcium médiées par CatSper (carré bleu) et des relâchements des stocks internes de calcium situés dans la région du cou (carré jaune). Les stocks internes de calcium sont aussi représentés (carré vert). CatSper permet une entrée de Ca<sup>2+</sup> qui induit le relâchement de Ca<sup>2+</sup> (CICR) des stocks internes. La voie de signalisation pour mobiliser les stocks internes de calcium pourrait passer par les canaux SOCs (Lefievre et al., 2012). La flèche en gris montre la mobilisation possible des stocks calciques du cou par la progesterone indépendamment des canaux CatSper (d'après (Alasmari et al., 2013) modifié)

## 2.3) La réaction acrosomique

### 2.3.1) Le calcium un acteur clé

La réaction de l'acrosome correspond à l'exocytose de la vésicule géante présente dans la tête du spermatozoïde. Comme la majorité des exocytoses elle est dépendante d'une augmentation de calcium intracellulaire. Elle est initiée par la liaison de récepteurs présents sur la membrane plasmique de la tête du spermatozoïde avec un composant de la zone pellucide (Figure 9). La zone pellucide est constituée de ZP1, ZP2 et ZP3 chez la souris (Bleil and Wassarman, 1980), l'homme possède une quatrième glycoprotéine, ZP4 (Gupta et al., 2009). C'est la glycoprotéine ZP3 qui semble être le ligand de ces récepteurs. Un récepteur couplé à une protéine G qui va activer la phospholipase Cδ4 (PLCδ4) qui va induire une cascade de signalisation qui va mobiliser les stocks calciques intracellulaires (Fukami et al., 2001); (Fukami et al., 2003). Le second récepteur à la zone pellucide connu est une tyrosine kinase couplée à la phospholipase Cγ (Doherty et al., 1995). L'activation de protéine Gi (Ward et al., 1992) entraîne l'activation d'une pompe à proton/sodium qui va alcaliniser le milieu intracellulaire. La voie de signalisation implique ensuite l'adénylate cyclase qui va

produire de l'AMPc qui va activer à son tour la protéine kinase A (PKA). Celle-ci va phosphoryler un ensemble de protéines et ainsi les activer et induire l'exocytose de la vésicule de l'acrosome. Il a aussi été montré que les canaux calciques dépendants du voltage jouent un rôle important dans l'initiation de la vague calcique induite par ZP3. La présence de canaux calciques voltage dépendants (VOCCs) de type L (*Jose et al., 2010*) et T (*Bailey and Storey, 1994*); (*Arnoult et al., 1996a*) a été démontrée sur la tête du spermatozoïde. Seuls les spermatozoïdes présentant une hyperpolarization permettant l'activation des VOCCs répondent à l'activation par la ZP3 (*Arnoult et al., 1999*). Cette entrée initiale de calcium extracellulaire va permettre de recruter le calcium présent dans les stocks calciques intracellulaires. Dans les cellules somatiques ces stocks sont constitués par le réticulum endoplasmique mais dans le spermatozoïde, cet organite ayant été éliminé, c'est essentiellement dans l'acrosome que le calcium intracellulaire est stocké. C'est donc l'activation des canaux calciques récepteurs à l'inositol tri phosphate (IP3R) présents majoritairement sur l'acrosome qui va permettre une seconde augmentation massive de calcium. La vidange des stocks de calcium intracellulaire va entraîner l'activation des canaux SOC présents sur la membrane plasmique qui vont augmenter la concentration de calcium intracellulaire de façon massive (jusqu'à 10  $\mu$ M) et soutenue par une entrée de calcium extracellulaire. Chez la souris, ce canal est le canal TRPC2 (*Jungnickel et al., 2001*). Chez l'homme, il n'a pas été caractérisé car TRPC2 est dans cette espèce un pseudogène.

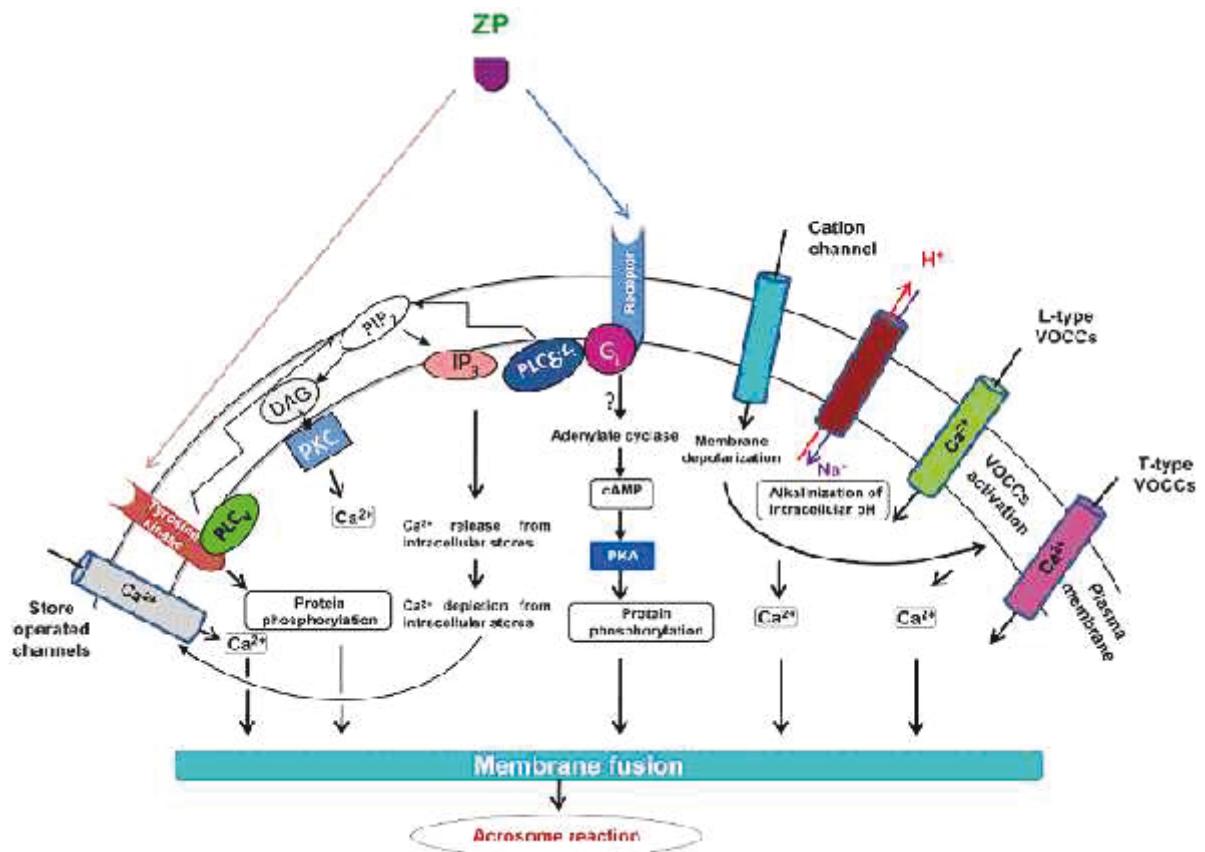


Figure 9: Schéma représentant les cascades de signalisation impliquées dans la réaction acrosomique suite à la liaison du spermatozoïde à la zone pellucide. Deux voies de signalisation majeures sont connues. Une voie impliquant la PLC $\beta$ 1 couplée à une protéine G. L'autre voie de signalisation connue implique une tyrosine kinase couplée à la phospholipase C $\gamma$ . L'activation des récepteurs induit aussi l'activation de l'adenylate cyclase qui va produire le l'AMP cyclique qui est responsable de l'activation de protéines kinases A (PKA) qui va ensuite phosphoryler et activer un ensemble de protéines. La liaison de l'agoniste active aussi des canaux cationiques de la membrane plasmique qui vont induire une dépolarisation membranaire qui va activer les canaux des VOCCs de type L et T. L'alcalinisation du pH intracellulaire est le résultat de l'activation de la pompe échangeur sodium/proton. L'activation de la PLC $\delta$ 4 et de la PLC $\gamma$  hydrolyse PIP2 présent dans la membrane et génère de l'IP3 ainsi que des DAG. Les DAG vont induire la translocation de PKC vers la membrane plasmique et son activation. D'après (Gupta and Bhandari, 2011) modifié.

### 2.3.2) La fusion membranaire

La dernière étape de la réaction de l'acrosome est la fusion de la membrane plasmique avec la membrane externe de l'acrosome. Cette fusion a lieu en de multiples points ce qui va générer des microsomes membranaires (Tomes, 2007). Cette exocytose va permettre la libération dans le milieu extracellulaire du contenu acrosomique et exposer les protéines situées sur la membrane interne de l'acrosome (Wassarman, 1999) dont certaines seront nécessaires à la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (protéine Izumo). Cette fusion des membranes implique un ensemble de protéines présentes sur les deux membranes et qui sont capables de s'associer pour former un complexe dit SNARE (Soluble NSF Attachment protein REceptors). Les protéines SNAREs lorsqu'elles vont s'associer vont permettre un rapprochement physique étroit entre les deux membranes. Ce rapprochement est responsable

d'un fort dégagement d'énergie qui va permettre la fusion membranaire. Dans le cas de la réaction de la vésicule de l'acrosome les protéines SNAREs (*Tomes et al., 2002*) sont la syntaxine 1 et SNAP-25 qui sont ancrées dans la membrane plasmique ainsi que la synaptobrevine (VAMP3) est ancrée dans la membrane externe de l'acrosome (*Tsai et al., 2010*). Les protéines SNAREs réalisent des cycles d'association/dissociation régulés dont l'énergie est fournie par la protéine NST qui possède une activité AAA1-ATPase. Les SNAREs possèdent une structure en hélice  $\alpha$  de 60 à 70 acides aminés qui va leur permettre de s'associer entre elles. Quatre autres petites protéines sont connues pour jouer des rôles clés dans la régulation de l'association de ce complexe. Munc 18 et Munc 13 préparent l'assemblage du moteur du complexe SNARE. La synaptotagmine ancrée sur la membrane externe de l'acrosome et la complexine qui change de conformation pour interagir avec la synaptotagmine (*Krishnakumar et al., 2011*) initie l'assemblage calcium dépendant. La complexine serait responsable du contrôle de l'exocytose.

### 2.3.3) La réaction acrosomique est aussi contrôlée par les lipides

Les acides gras sont capables de réguler la fusion membranaire. En effet certaines protéines du complexes SNAREs voient leur conformation modifiée par l'addition de lipides. Ainsi la syntaxine en position inactive peut passer en conformation active suite à l'exposition à l'acide arachidonique.



Figure 10: L'acide arachidonique est capable de faire passer de la syntaxine en conformation active en présence de Munc18. (Darios et al., 2007)

De plus lors de la capacitation les protéines SNARE se relocalisent dans des régions riches en radeaux lipidiques au niveau de la tête du spermatozoïde. L'élimination du cholestérol de la membrane plasmique est nécessaire à cette relocalisation (*Tsai et al., 2007*) ; (*van Gestel et al., 2005*).

## 2.4) La fusion gamétique et l'activation ovocytaire

Une fois que le spermatozoïde a réalisé sa réaction acrosomique au contact de la zone pellucide et traversé cette dernière, il entre en contact avec la membrane plasmique de

l'ovocyte avec laquelle il doit fusionner. Le mécanisme de la fusion du spermatozoïde et de l'ovocyte n'est pas bien connu. Des protéines présentes sur la partie équatoriale de la tête du spermatozoïde rentrent en jeu.

La protéine Izumo est localisée dans cette zone équatoriale. Elle fait partie de la famille des immunoglobulines. Les mâles KO pour cette protéine ont des spermatozoïdes de morphologie normale mais ils ne sont pas capables de fusionner avec l'ovocyte et restent bloqués dans l'espace périvitellin après avoir traversé la zone pellucide (*Inoue et al., 2005*). La protéine Izumo subit une relocalisation suite à la réaction acrosomique, elle passe de la partie antérieure de la tête vers la partie postérieure de l'acrosome. Une protéine est impliquée dans cette relocalisation, c'est la protéine Tssk6. Elle fait partie de la famille des sérines kinase et la souris KO pour ce gène ne présente pas de relocalisation d'Izumo et les mâles sont infertiles (*Sosnik et al., 2009*).

Les protéines de la famille ADAM sont impliquées dans cette fusion. Entre autre la fertiline  $\beta$  (ADAM2), un hétérodimère qui permet au spermatozoïde d'interagir avec la membrane de l'ovocyte. Le KO de ce gène voit son taux de fécondation diminué de 50% (*Kim et al., 2006*). Des intégrines sont aussi présentes dans la membrane plasmique de l'ovocyte. L'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  est capable d'interagir avec la fertiline  $\beta$  présente sur le spermatozoïde (*Chen and Sampson, 1999*) mais son rôle dans la fusion gamétique n'est pas très bien compris.

L'intégrine  $\alpha 6 \beta 1$  est associée avec la tétraspanine CD9 dans la membrane de l'ovocyte. La protéine CD9 est essentielle à la fusion gamétique, les ovocytes ne possédant pas cette protéine ne peuvent être fécondés in vitro (*Kaji et al., 2000*) ; (*Le Naour et al., 2000*). Les tétraspanines jouent un rôle important dans de nombreux phénomènes : l'adhésion cellulaire, la différenciation la migration et la transduction de signal. Deux autres tétraspanines sont exprimées dans l'ovocyte CD81 et CD151 mais leur rôle n'est pas connu (*Tanigawa et al., 2008*); (*Ziyyat et al., 2006*).

Suite à la fusion du spermatozoïde dans l'ovocyte une protéine présente dans le spermatozoïde va être à l'origine de l'activation ovocytaire qui se traduit par une succession de vagues calciques. Cette protéine est l'enzyme PLC $\zeta$  qui hydrolyse le lipide PIP2 présent dans la membrane plasmique de l'ovocyte et libère dans le cytosol de l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) qui va activer les canaux calciques des stocks internes de calcium et va conduire à une augmentation cyclique de calcium responsable de l'activation du zygote (figure 11).

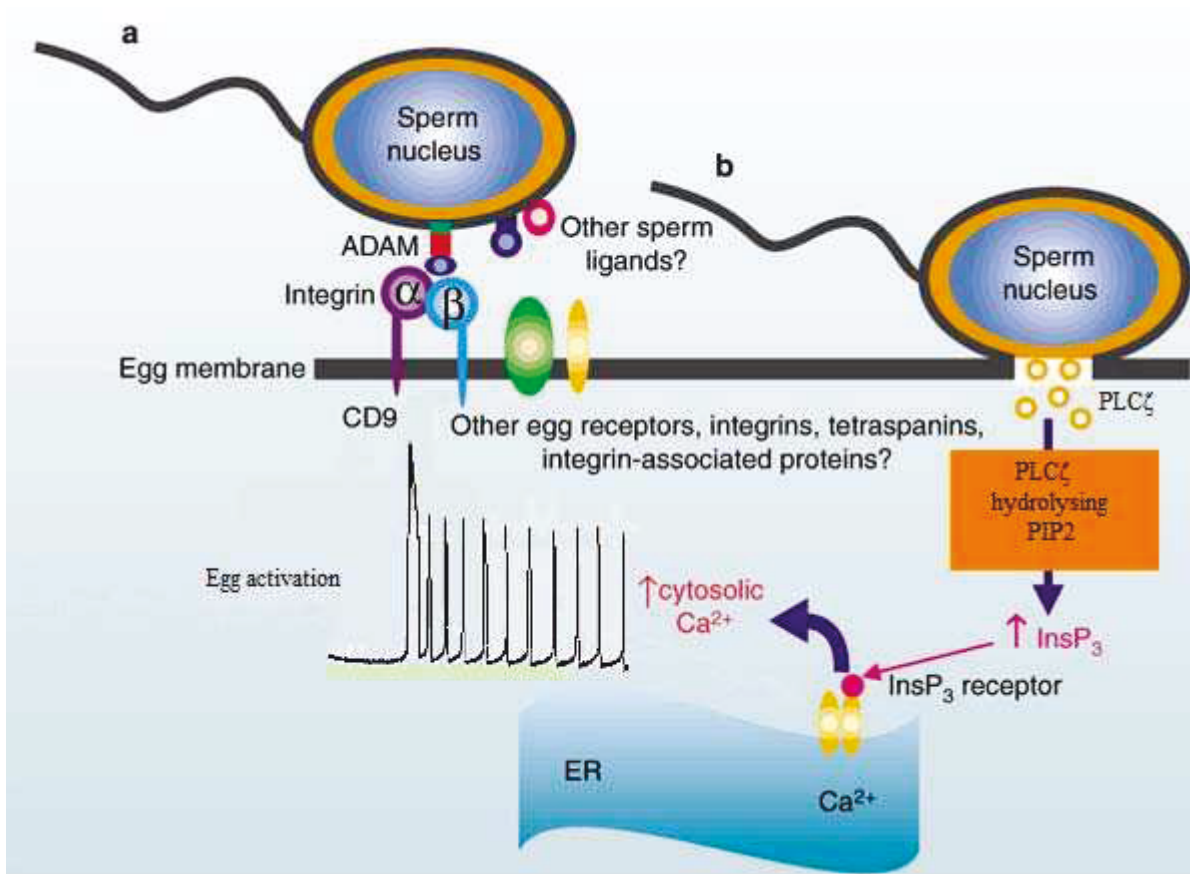


Figure 11: Schéma de l'adhésion et de la fusion gamétique suivie de l'activation du zygote. a) L'adhésion du spermatozoïde sur l'ovocyte est médiée par l'interaction de la protéine spermatique ADAM avec l'intégrine spermatique. D'autres ligands pourraient entrer en jeu. Les protéines de la membrane plasmique du spermatozoïde sont associées à l'intégrine comme CD9 et peut-être à d'autres tetraspanines. CD9 est essentielle à la fusion gamétique. b) après la fusion de la membrane du spermatozoïde avec celle de l'ovocyte, le zygote est activé. La PLC $\zeta$  va hydrolyser les lipides PIP2 présents dans la membrane plasmique de l'ovocyte et produire de l'IP3 responsable de la mobilisation du calcium contenu dans les stocks calciques intracellulaire (Evans and Florman, 2002) modifié.

## 2.5) Les phospholipases un acteur de la physiologie spermatique

Dans les grandes étapes de la physiologie spermatique, les phospholipases jouent des rôles importants. Elles permettent la production de messagers secondaires tels que l'IP3, l'acide arachidonique et contribuent au remodelage de la membrane plasmique nécessaire à l'activation de perméabilités ioniques. Elles jouent ainsi un rôle dans les voies de signalisation induisant la capacitation, l'activation de la mobilité flagellaire ainsi que la réaction de l'acrosome.

Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les glycérophospholipides (GPL) qui font partie des constituants majeurs des membranes lipidiques. Les GPL sont composés d'une queue hydrophobe sous forme de 2 longues chaînes qui correspondent à des acides gras saturés ou non. Cette queue est surmontée d'une tête hydrophile constituée d'un résidu glycérol, d'un résidu phosphate et d'un résidu polaire. Ce résidu polaire peut être constitué

de la choline, de la sérine, de l'éthanolamine, d'un inositol biphosphate, d'un autre glycérol ou d'un autre acide phosphatidique. La choline et l'éthanolamine sont les résidus polaires les plus fréquents au niveau spermatique.

Ces GPL peuvent être hydrolysés par la famille des phospholipases constituée de 4 types de phospholipases regroupées en fonction de leur site d'hydrolyse des GPL (figure 12). On distingue ainsi les phospholipases de type A1 (PLA1) qui hydrolysent les GPL en position sn-1 du glycérol. Les phospholipases de type A2 (PLA2) qui hydrolysent les GPL en position sn-2 du glycérol. L'hydrolyse de la PLA1 comme celle de la PLA2 libère un acide gras et un lysophospholipide. Les phospholipases de types B (PLB) hydrolysent les GPL en position sn1 et sn2 ce qui va libérer deux acides gras et un glycérophosphate.

Les PLC hydrolysent le phosphatidylinositol-4.5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) qui se trouve dans la membrane des cellules en diglycérade et inositol-1.4.5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et un diacylglycérol (DAG) qui reste dans la membrane. Ce dernier est capable d'activer les canaux calciques responsables de la mobilisation des stocks calciques intracellulaires. Il en existe 6 sortes qui sont activées par différentes voies. La PLC<sub>β</sub> est activée par les récepteurs couplés aux protéines G. La phospholipase C<sub>γ</sub> est activée par des récepteurs ayant une activité enzymatique de type tyrosine kinase et va phosphoryler des molécules intracytoplasmiques. La phospholipase C<sub>δ</sub> est activée par l'IP<sub>3</sub>. Finalement, la phospholipase C<sub>ε</sub> est activée par G Rap. Les phospholipases de type D (PLD) se situent dans la membrane plasmique et hydrolysent les phosphatidyles cholines en acide phosphate (PA) et libèrent une choline soluble dans le cytoplasme.

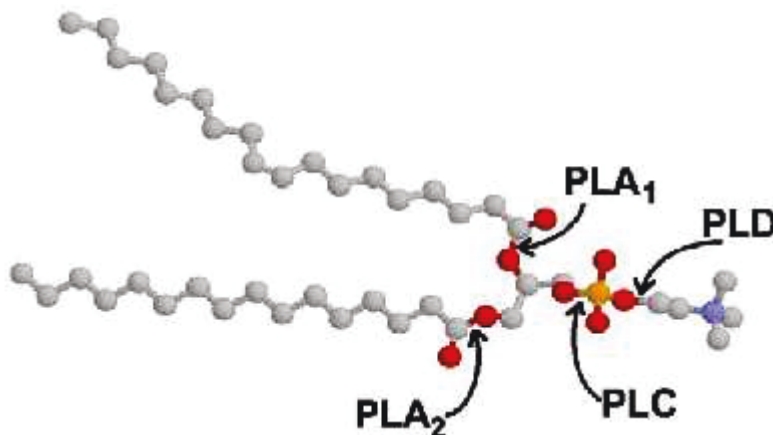


Figure 12: Les sites d'hydrolyse des différentes phospholipases sur la molécule d'un 1,2-diacylglycérolphospholipide. L'action de la phospholipase B n'est pas représentée, elle correspond au lieu d'hydrolyse de la PLA1 ainsi que celui de la PLA2. (Rodrigo G., 2012)

Les phospholipases peuvent aussi être sécrétées. Les phospholipases de type A2 sécrétées sont retrouvées dans de nombreux venins. Cette enzyme est retrouvée à l'état naturel

dans un très grand nombre de cellules telles que les macrophages, les plaquettes, la rate, les muscles lisses, le placenta, le liquide synovial et l'exsudat inflammatoire. Elle est donc très intéressante médicalement et scientifiquement notamment pour ses implications dans diverses maladies inflammatoires et dans la toxicité des venins. La première sPLA2 à été identifiée dans le venin de serpent Naja, c'est un composant majeur des venins de serpent. Elles sont responsables d'effets physiopathologiques sévères causés par l'empoisonnement par ces venins tels que des effets neurotoxiques, cardiotoxiques, myotoxiques, cytotoxique et des activités hypotensive et anticoagulante. (*Dennis et al., 2011*) ; (*Gutierrez et al., 1984*); (*de Paula et al., 2009*); (*Soares et al., 2004*); (*Rodrigues et al., 2004*)

Dans le spermatozoïde la phospholipase A2 sécrétée de groupe X (sPLA2-GX) est présente dans l'acrosome. A la fin de la capacitation un certain nombre de spermatozoïdes aura eu une réaction acrosomique sans qu'il y ait eu de liaison avec la zone pellucide. C'est ce que l'on appelle la réaction acrosomique spontanée. Ce pourrait être le résultat d'une surcapacitation d'une partie de la population spermatique. Cette réaction acrosomique spontanée pourrait jouer un rôle paracrine en libérant dans le milieu extracellulaire la sPLA2-GX qui est capable d'augmenter le taux de spermatozoïdes ayant eu une réaction acrosomique spontanée. Ce serait une boucle d'amplification (figure 13). Cet effet paracrine pourrait permettre une sélection des spermatozoïdes. En effet l'inhibition de la sPLA2-GX entraîne une baisse du taux de fécondation dans des conditions de fécondation in vitro. En parallèle il est aussi observé une diminution du taux de développement normal des embryons (*Escoffier et al., 2010*). Cette augmentation de la quantité de spermatozoïdes ayant réagi de façon spontanée pourrait être le résultat de la production d'acide arachidonique par la sPLA2-GX. Celui-ci pouvant comme montré précédemment faire passer les protéines du complexe SNARE-synaptogamine en position active et ainsi faciliter la réaction acrosomique.



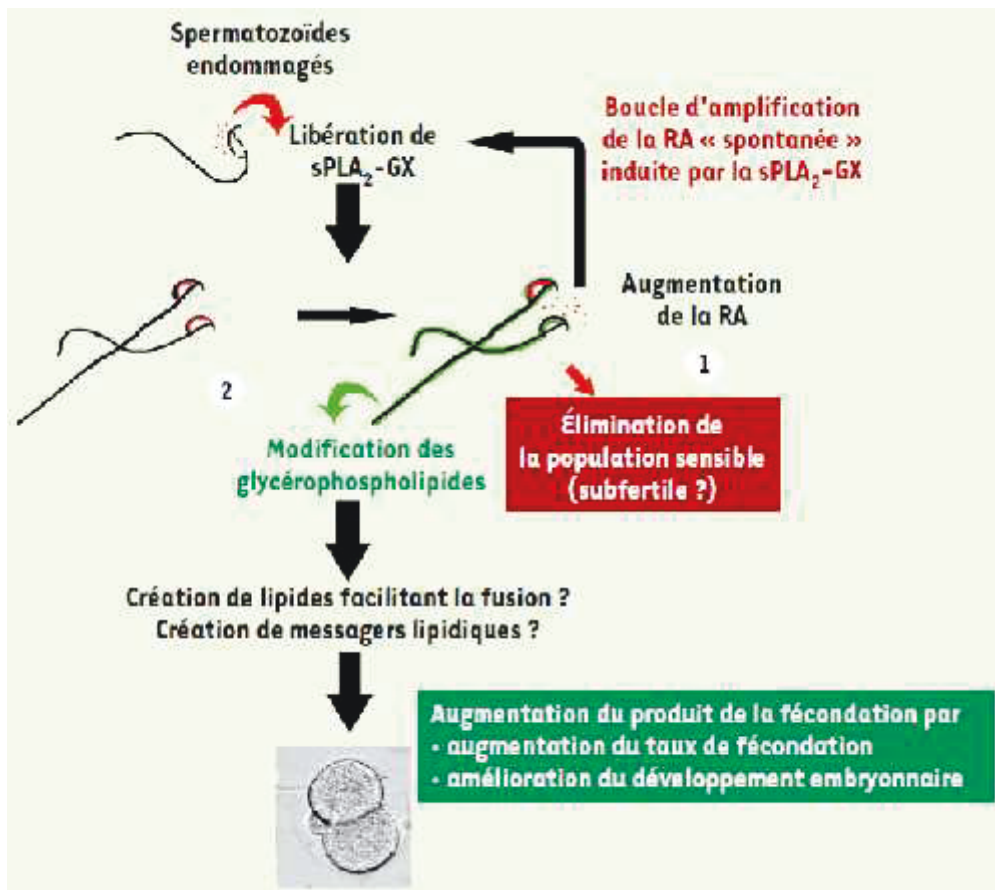


Figure 13: Les possibles rôles physiologiques de la phospholipase A2 sécrétée de groupe X sur le spermatozoïde et le développement embryonnaire. Voie 1) La sPLA2-GX est libérée par une partie de la population spermatique endommagée et cette dernière va agir sur des spermatozoïdes sensibles qui vont alors déclencher une réaction acrosomique spontanée. Ceux-ci ne pourront plus traverser la zone pellucide et donc participer à la fécondation ce qui permet une sélection spermatique. Voie 2) Les spermatozoïdes qui n'ont pas eu de réaction acrosomique spontanée ont leur composition lipidique membranaire modifiée par la sPLA2-GX ce qui augmente le succès du développement embryonnaire. (Arnoult et al., 2012)

## II La production de spermatozoïde

Les spermatozoïdes sont produits dans les testicules au niveau des tubes séminifères qui se rejoignent au niveau du *rete testis*. Les canaux efférents, au nombre de 5, partent du *rete testis* pour rejoindre l'épididyme qui est constitué du canal épидидymaire enroulé sur lui-même sous forme de pelote. L'épididyme est constitué de 3 parties que sont la tête, le corps et la queue. La principale fonction de l'épididyme est de stocker les spermatozoïdes jusqu'au moment de l'éjaculation. Les autres fonctions de l'épididyme seront détaillées plus loin.

### 1) Les testicules : un tissu multicellulaire

Les testicules sont deux structures ovales jumelées, chez de nombreuses espèces elles sont situées dans une poche de peau appelé scrotum. Cette externalisation des

testicules permet leur maintien à une température plus basse que le corps nécessaire à la spermatogénèse. Les testicules sont encapsulés dans un tissu conjonctif dense et épais connu sous le nom de tunique albuginée (figure 14). Elle est constituée de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses responsables de contractions rythmiques spontanées qui participent à la propulsion des spermatozoïdes et du liquide testiculaire hors du testicule. L'intérieur du testicule contient des tubes séminifères enroulés ainsi que du tissu entre les tubules appelé l'espace interstitiel.

Les tubes séminifères sont de longs tubes compactés sous forme de boucles et dont les deux extrémités débouchent sur le *rete testis*. Ils sont constitués d'un épithélium composé de deux types de cellules: les cellules germinales et les cellules de Sertoli qui leur servent de soutien. Les cellules germinales sont à différents stades de leur différenciation en gamète. Les cellules souches sont situées à la base du tube puis viennent les spermatogonies, les spermatocytes primaires et secondaires, les spermatides rondes et allongées et enfin les spermatozoïdes. Ceux-ci se trouvent sur la partie la plus interne de l'épithélium d'où ils sont libérés dans la lumière du tube.

Les cellules de Sertoli ont leur corps cellulaire situé contre la membrane basale qui entoure les tubules séminifères. Ces cellules possèdent des prolongements cytoplasmiques s'étirant jusqu'à la lumière du tube.

Au niveau de la membrane basale constituée de tissus conjonctifs se trouvent des cellules contractiles myoïdes.

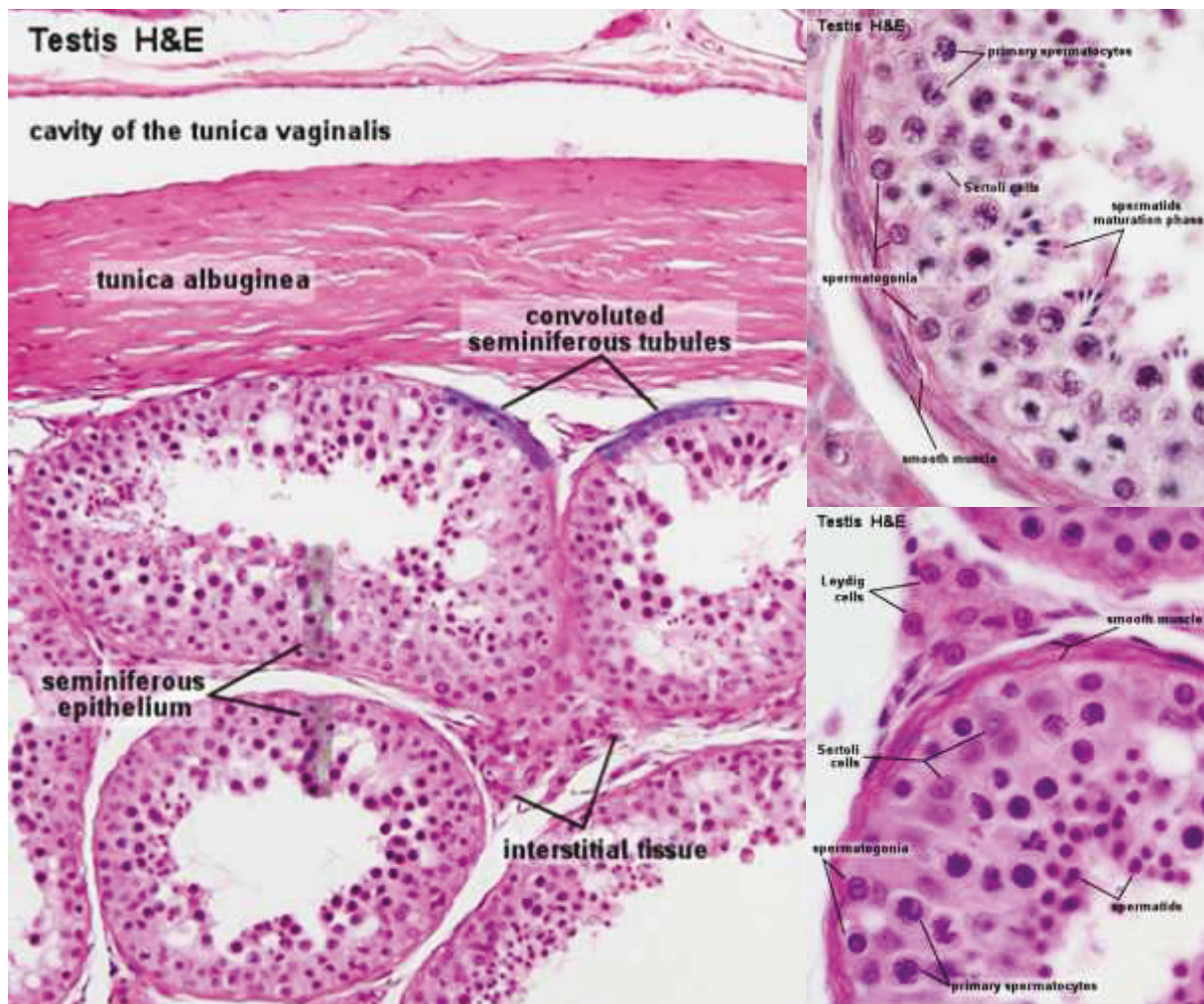


Figure 14: Coupe histologique de testicules et de tubes séminifères. (UWA Blue Histology, 2013)

### 1.1) L'espace interstitiel

L'espace interstitiel du testicule situé entre les tubes séminifères est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs du parenchyme testiculaire. Les cellules de Leydig responsables de la sécrétion de testostérone ainsi que des macrophages et des mastocytes sont les autres composants de cet espace interstitiel.

### 1.2) Les cellules de Leydig

Le tissu interstitiel testiculaire est le tissu qui est situé entre les tubes séminifères et il est composé en majorité par les cellules de Leydig. Ce sont des cellules de forme polygonale avec un noyau rond et nucléolé, elles possèdent des vacuoles lipidiques ainsi que des cristaux (cristalloïdes de Rinke). Elles sont isolées ou rassemblées en îlots autour des vaisseaux sanguins d'où elles ont accès au cholestérol sanguin. En effet les cellules de Leydig sont

les principales productrices des hormones androgènes dont le cholestérol est un précurseur. Leur stimulation directe par l'hormone lutéinisante (LH) est responsable de la biosynthèse de la testostérone. La testostérone produite va diffuser dans l'épithélium des tubes séminifères où elle va se lier aux récepteurs aux androgènes situés dans les cellules de Sertoli. Elle va ainsi réguler la spermatogénèse. Les cellules de Leydig synthétisent aussi de l'ocytocine et des cytokines impliquées dans la régulation paracrine des fonctions testiculaires.

### **1.3) Les cellules myoïdes**

Les cellules myoïdes contractiles sont issues de cellules musculaires lisses et sont situées à la base des tubes séminifères. Leur rôle serait d'aider à la circulation du fluide des tubes séminifères et donc au drainage des spermatozoïdes vers le *rete testis* (**Russell et al., 1989**). Elles participent avec la membrane basale des tubes séminifères, à la barrière hémato- testiculaire.

### **1.4) Les cellules de Sertoli**

Leurs rôle est de servir de soutien à la lignée germinale, de les nourrir, de contrôler leur développement et de participer à leur différenciation morphologique. Une cellule de Sertoli peut ainsi soutenir jusqu'à cinquante cellules germinales à différents stades de maturation. Elles sont aussi responsables de la phagocytose des cellules germinales dégénérantes ainsi que des corps résiduels résultant du cytoplasme des cellules germinales éliminés au cours de la spermiogénèse. Elles sont aussi impliquées dans la production de protéines régulant et/ou répondant à la libération d'hormones hypophysaires ainsi que l'activité mitotique des spermatogonies. Elles possèdent un récepteur à la FSH qui va réguler leur activité (**Gromoll and Simoni, 2005**). Il a aussi été montré grâce à des souris KO pour le récepteur aux œstrogènes que ces derniers étaient nécessaires à une spermatogénèse normale (**Akingbemi, 2005**). C'est encore grâce à une souris KO que la preuve de la régulation de la spermatogénèse par les récepteurs aux androgènes situés dans les cellules de Sertoli a été démontrée (**De Gendt et al., 2004**); (**Verhoeven, 2005**). La spermatogénèse est ainsi régulée par le système endocrinien de manière paracrine et autocrine (**Huleihel and Lunenfeld, 2004**); (**Holdcraft and Braun, 2004**); (**Abd-Elmaksoud and Sinowatz, 2005**); (**Perrard et al., 2007**) dont les cibles principales sont les cellules de Sertoli.

## 1.5) La barrière hémato-testiculaire

Chaque cellule de Sertoli est en contact avec près d'une douzaine d'autres cellules de Sertoli. Entre les cellules de Sertoli adjacentes, des jonctions serrées constituent une barrière entre deux compartiments (la barrière hémato-testiculaire, figure 15). Cette barrière sépare les spermatogonies et les spermatocytes primaires préleptotènes, situés dans le compartiment basal, des autres stades des cellules spermatogéniques, situés dans le compartiment adluminal. Un relâchement des jonctions serrées permet la migration des spermatocytes primaires préleptotènes dans le compartiment adluminal. Cet arrangement crée une barrière immunologique qui sépare les cellules germinales en cours de différenciation. Elle apparaît seulement à la puberté, afin d'empêcher le système immunitaire d'être stimulé par les protéines spermatiques très immunogènes et de générer une réponse auto-immune. Cette barrière est maintenue dans l'épididyme.

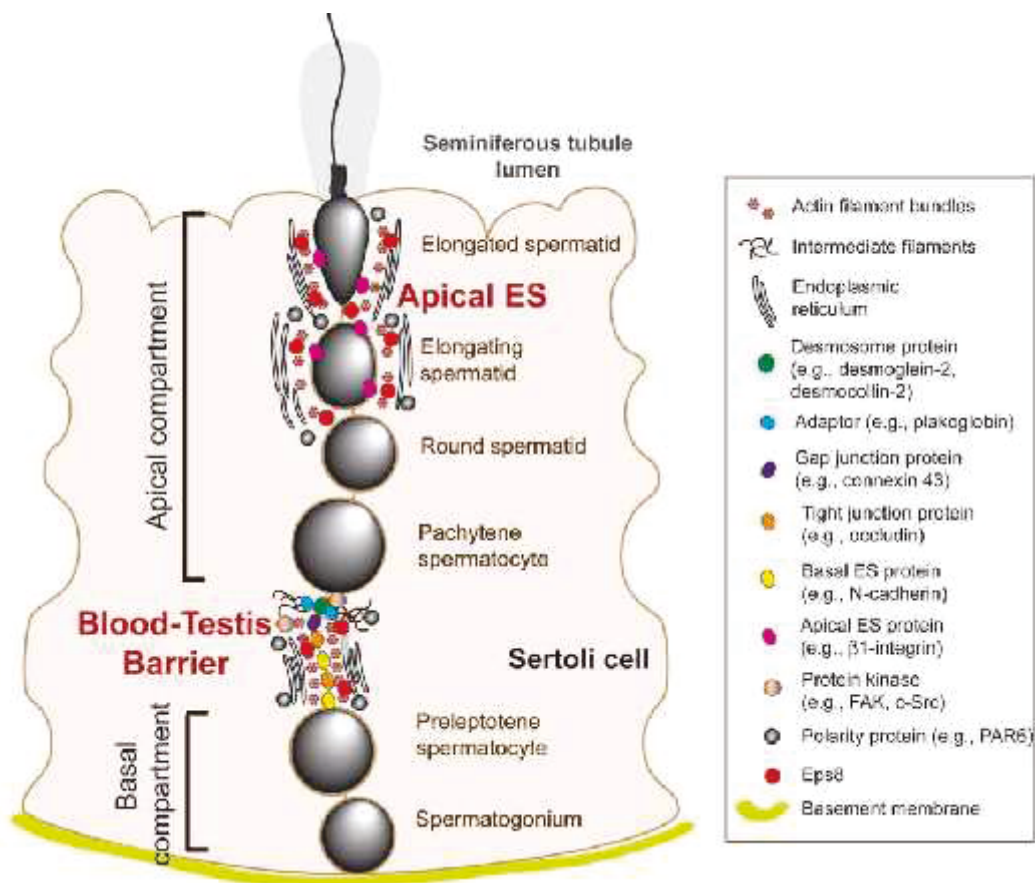


Figure 15: Schéma de la barrière hémato-testiculaire de l'épithélium des tubes séminifères dans des testicules de mammifère adulte. De manière anatomique, la barrière testiculaire divise le tube séminifère en deux compartiments, le compartiment basal et le compartiment apical. Les tubes séminifères sont composés de cellules de Sertoli et de cellules germinales. La barrière testiculaire est constituée de jonctions serrées (tight junction), de desmosomes et de jonctions communicantes et de spécialisations ectoplasmiques basales. La barrière hémato-testiculaire est souvent associée à des filaments d'actine parallèles à la membrane plasmique de deux cellules de Sertoli adjacentes et prise en sandwich en deux citernes de réticulum endoplasmique ces structures sont appelées les spécialisations ectoplasmiques basales (Cheng et al., 2011).

## **2) La spermatogénèse**

La spermatogénèse correspond à l'ensemble des processus biologiques qui vont permettre la formation d'un spermatozoïde, une cellule hautement spécialisée, à partir d'une cellule souche germinale. Elle se fait de manière centripète au niveau des tubes séminifères dans les testicules. Elle est constituée de 3 phases successives : la phase mitotique de prolifération, la phase méiotique et la phase de la différenciation en spermatozoïde ou spermiogénèse.

### **2.1) Les différentes étapes de la spermatogénèse**

#### ***2.1.1) Phase mitotique***

Cette phase permet de conserver un stock de cellules souches grâce à des divisions mitotiques symétriques. Au cours de l'embryogénèse les premières cellules souches spermatogéniques (SSCs) migrent au niveau des futurs testicules. Elles continuent à proliférer puis s'arrêtent au stade quiescent (G0/G1). A la puberté, la mitose asymétrique démarre suivie des étapes de différenciation de la spermatogénèse. Cette mitose produit les spermatogonies A, le premier type de cellules en différenciation de la spermatogénèse. Elles évoluent en spermatogonies intermédiaires puis en spermatogonies B. Ensuite les spermatogonies B après avoir subi de nombreuses divisions entrent en méiose, on les appelle alors des spermatocytes I.

#### ***2.1.2) La phase méiotique***

Les spermatocytes I débutent leur méiose par une longue prophase qui est habituellement divisée en plusieurs étapes. L'ADN est répliqué au stade préleptotène, les chromosomes sont ensuite condensés au stade leptotène. Les chromosomes sont alors constitués de deux chromatides liés par leur centromère. Au stade zygotène les chromosomes homologues sont appariés le long de la ligne équatoriale. Les recombinaisons entre les chromosomes homologues paternels et maternels se font au stade pachytène c'est un stade qui dure deux semaines chez l'homme. Les chromosomes se séparent ensuite au stade diplotène. Après cette phase les deux divisions de la méiose surviennent rapidement pour former quatre spermatides rondes haploïdes.

### 2.1.3) La spermiogénèse

La spermiogénèse regroupe l'ensemble des processus biologiques qui vont permettre la transformation d'une cellule ronde haploïde en une cellule hautement spécialisée, le spermatozoïde (figure 16).

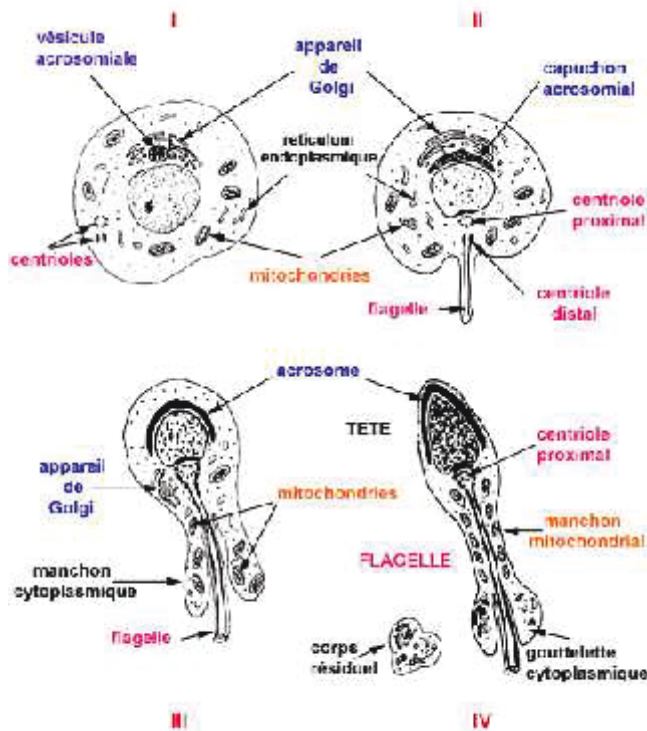


Figure 16: Schéma de la spermiogénèse. On distingue ici les 4 stades. I) La phase de Golgi ; II) la phase de la casquette ; III) la phase de l'acrosome et IV) la phase de la maturation. Spermiogénèse

### 2.1.4) Organisation de la spermatogénèse

Une cellule de Sertoli est en contact avec des cellules germinales qui sont à différentes étapes de différenciation. Ces étapes de la spermiogénèse sont classées en 16 étapes (figure 17). L'étape 1 correspond à la spermatide ronde au début de sa différenciation, l'étape 16 permet de désigner des spermatides en fin d'élongation dont le l'excès de cytoplasme est éliminé. Les étapes de différenciation les plus tardives se trouvent près de la lumière du tubule séminifère. Ces associations constantes des étapes de différenciation des cellules germinales ont permis de les classer en stades de I à XII chez la souris. Ces stades se répartissent par petites sections le long du tubule séminifère.

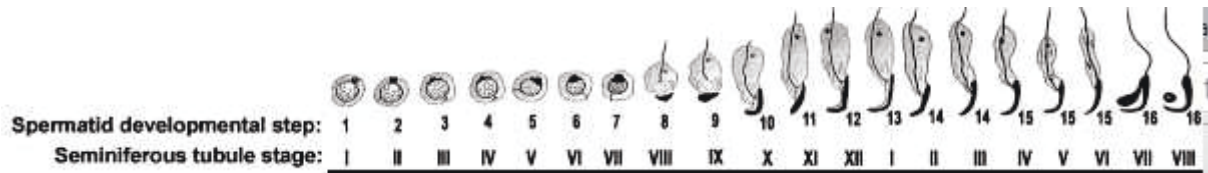


Figure 17 : Les différentes étapes de la spermiogénèse chez la souris. Chez la souris on en identifie 16. Les stades correspondent à aux associations de cellules germinales à différentes étapes de la spermatogénèse dans l'épithélium des tubes séminifères. Chez la souris on retrouve 12 stades (I à XII). (Yan, 2009)

## 2.2) La condensation de la chromatine

Les spermatozoïdes doivent traverser les voies génitales femelles, ce qui représente une distance considérable pour une cellule de cette taille. De plus, au cours de ce voyage, la cellule est soumise à des stress oxydatifs, qui peuvent endommager l'ADN. Pour répondre à ces deux difficultés, le spermatozoïde va subir une compaction de son matériel génétique puis une élimination de l'excès de cytoplasme au cours de la spermiogénèse. En effet le spermatozoïde est une cellule où la transcription et la traduction sont stoppées. La cellule n'a donc plus besoin de l'appareil de Golgi, du reticulum et d'une grande partie de son cytoplasme. C'est au stade précoce de la spermatide ronde que débute la compaction de l'ADN. La réduction maximale de son volume cellulaire lui permet de remonter plus facilement avec des besoins plus faibles en énergie.

### 2.2.1) Le nucléosome

L'ADN des spermatides est initialement enroulé par unité de 146 paires de bases autour d'un octamère d'histones dis de cœur (H2A, H2B, H3 et H4). Cette association forme le nucléosome.

L'ADN des spermatides subit une réorganisation chromatiniennne importante au cours de la spermatogénèse afin d'augmenter sa compaction. Cette compaction extrême du génome paternel à plusieurs rôles. Il permet de réduire la taille du noyau, mais aussi de protéger l'ADN d'agents de dégradation. Cette réorganisation s'articule en trois temps (figure 18). Les histones sont remplacées par des variants des histones canoniques (H2A, H2B et H1 (*Gaucher et al., 2010*)), les histones canoniques étant les histones incorporées lors de la réplication. L'incorporation de ces variants va déstabiliser les nucléosomes. Puis une hyper acétylation de la chromatine ainsi que des variants d'histones va ouvrir la chromatine (*Govin et al., 2004*). L'acétylation s'effectue sur certains résidus des histones tels que la lysine 16 de l'histone H4 ou encore celle de la lysine 56 de l'histone H3 qui est capable à elle seule de modifier la structure de la chromatine en la faisant passer d'un état condensé à un état



décondensé.

L'ubiquitination de l'histone H2A joue aussi un rôle majeur dans la déstabilisation des nucléosomes. Cela permet, à partir de l'étape 12 de la spermiogénèse, le remplacement de plus de 90% des variants d'histones par des protéines basiques, les protéines de transition (PT) puis des protamines (Prm), protéines encore plus basiques, riches en arginines et cystéines (Balhorn, 2007); (Oliva, 2006); (Rousseaux et al., 2008). Ce qui a pour résultat l'hypercompaction de l'ADN des spermatozoïdes. Seul 1% du génome chez la souris reste compacté sous forme de nucléosome (van der Heijden et al., 2005), chez l'homme cette proportion est estimée entre 10 et 15% (Brykczynska et al., 2010); (Gatewood et al., 1987). Le remplacement des histones par des protamines serait potentiellement réalisé par la protéine Bdf1 (Bromodomaine factor1) (Pivot-Pajot et al., 2003).

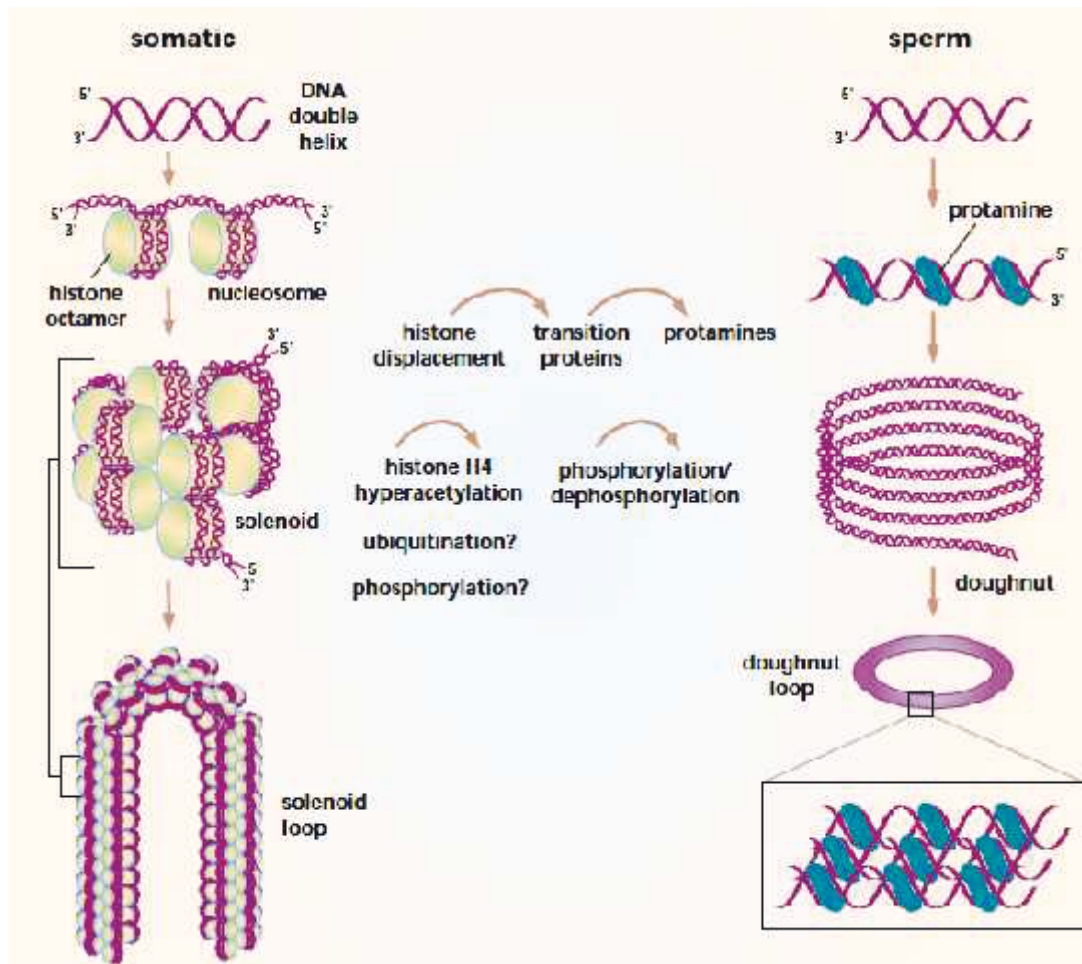


Figure 18 : Schéma de la compaction de l'ADN dans les cellules somatiques et dans les spermatozoïdes. Dans les cellules somatiques, l'ADN est enroulé sous forme de nucléosome. Les nucléosomes vont s'agencer entre eux pour former un solénoïde qui sera attaché à la matrice nucléaire par sa base. Dans le noyau spermatique les nucléosomes sont remplacés par des protamines qui vont compacter l'ADN sous forme de doughnut. Le remplacement des histones est facilité par des acétylations, des ubiquitinations et des phosphorylations. (Braun, 2001)

### **2.2.2) La compaction de l'ADN est polarisée**

L'acétylation de l'histone H4 est la première étape nécessaire au remodelage de la chromatine, ainsi l'acétylation H4K8 et H4K16 sont initialement localisées sous l'acrosome en extension dans les spermatides de souris en élongation (*van der Heijden et al., 2006*). La compaction de l'ADN démarre ensuite à partir de cette zone. Des protéines de remodelage de la chromatine et de réparation PARP1 (DNA repair implicated protein) sont situées dans le noyau juste sous l'acrosome (*Maymon et al., 2006*), (*Meyer-Ficca et al., 2011*), (*Meyer-Ficca et al., 2005*). Deux protéines de la chromatine H1T2 et HMG4 présentent une polarité dans les noyaux des spermatides en élongation, et sont localisées de manière opposée au niveau des pôles. Le variant d'histone H1T2 est situé du côté de l'acrosome à partir de l'étape 5, phase de la casquette (*Catena et al., 2006*), (*Martianov et al., 2005*) et il est capable de se lier avec la méthyle transférase (Ezh2) de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) (*Lambrot et al., 2012*). HMGB4 est dans la partie opposée à l'acrosome à partir de l'étape 9, phase d'élongation (*Catena et al., 2009*). HMGB4 est une protéine présentant un domaine ayant une forte homologie avec le domaine SSRP1 (structure-specific DNA recognition protein) qui est très conservé au cours de l'évolution.

### **2.3) La biogénèse de l'acrosome**

L'acrosome est une vésicule géante qui recouvre entre 40 et 70 % du noyau. Cette vésicule contient de nombreuses enzymes hydrolytiques qui sont libérées lors de son exocytose.

La biogénèse de l'acrosome est composée de trois phases, la phase de Golgi, la phase de la casquette et la phase de l'acrosome et de la maturation. (*Toshimori, 1998*); (*Ramalho-Santos et al., 2002*); (*Moreno and Alvarado, 2006*)

#### **2.3.1) La phase de Golgi**

L'appareil de Golgi produit par exocytose de petites vésicules proacrosomales (*Ho et al., 1999*) qui contiennent déjà une grande partie des constituants de l'acrosome. Une fois produites par le golgi elles transitent par le trans-Golgi puis vont migrer le long de microtubules associées à de l'actine jusqu'à l'acroplaxome situé en face, le long de la membrane nucléaire. Elles vont ensuite fusionner ensemble pour donner la vésicule acrosomale. Un trafic de vésicules vers la membrane plasmique a aussi été observé. Des études récentes classent l'acrosome dans la famille des lysosomes. Lors de cette

phase l'acroplaxome, une plaque de cytosquelette composée d'actine (F-actine) et de kératine5/Sak57 (*Kierszenbaum et al., 2004*), s'étend progressivement sur la membrane nucléaire (figure 19). Cette phase se déroule des stades 1 à 3 de la spermiogénèse chez la souris.

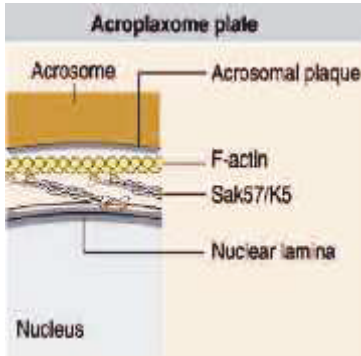


Figure 19: Schéma de l'acroplaxome. L'acroplaxome est une plaque située entre l'acrosome et le noyau et constituée de cytosquelette d'actine (F-actine) et de kératine 5/Sak57. D'après (*Kierszenbaum et al., 2004*)

### 2.3.2) La phase de la casquette

Au cours de la phase de la casquette, la taille de l'acrosome va augmenter suite à la fusion de vésicules issues du Golgi (figure 20) (*Escalier et al., 1991*), (*Moreno et al., 2000*). Puis l'acrosome va commencer à s'étendre le long de l'acroplaxome du côté antérieur du noyau pour former une structure similaire à une casquette. Cette phase se déroule des stades 4 à 7 de la spermiogénèse.

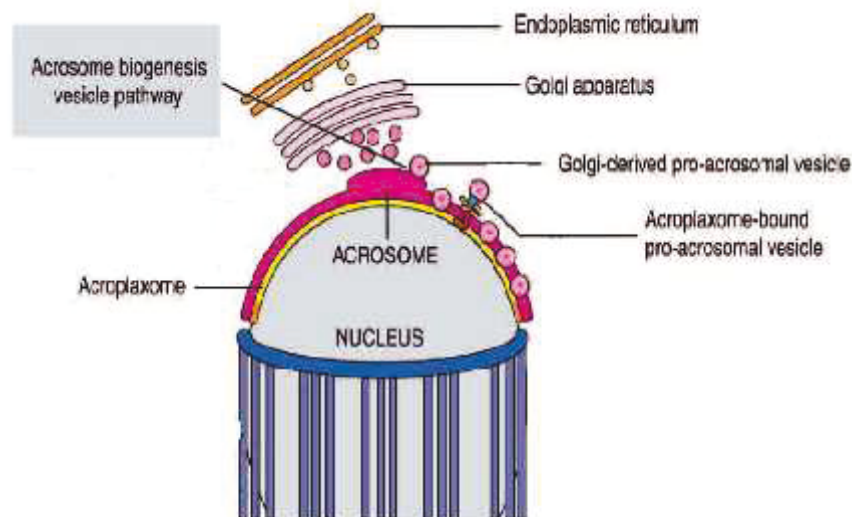


Figure 20: Schéma de la phase de la casquette avec l'extension de l'acrosome le long du noyau. L'acrosome est attaché au noyau grâce à une structure de cytosquelette, l'acroplaxome. Des vésicules proacrosomales continuent d'être produites pas l'appareil de Golgi et viennent fusionner avec l'acrosome en extension. D'après (*Kierszenbaum et al., 2004*)

### 2.3.3) La phase de l'acrosome et de la maturation

L'acrosome acquiert sa forme définitive et la structure du spermatozoïde se met en place au cours de cette phase. Des microtubules se forment autour du noyau et s'organisent en faisceaux formant la manchette. Cette structure transitoire se développe du pôle antérieur vers le pôle opposé. Elle va permettre la migration des mitochondries vers la pièce intermédiaire du flagelle où elles se regroupent pour former le manchon de mitochondries. L'appareil de Golgi arrête la synthèse de protéines et migre aussi via la manchette du côté postérieur avec l'axonème. Ce dernier, une fois positionné du côté postérieur, va alors s'allonger pour former le flagelle.

Les différentes organelles et l'excès de cytoplasme sont éliminés dans le corps résiduel qui va ensuite être phagocyté par les cellules de Sertoli (figure 21).

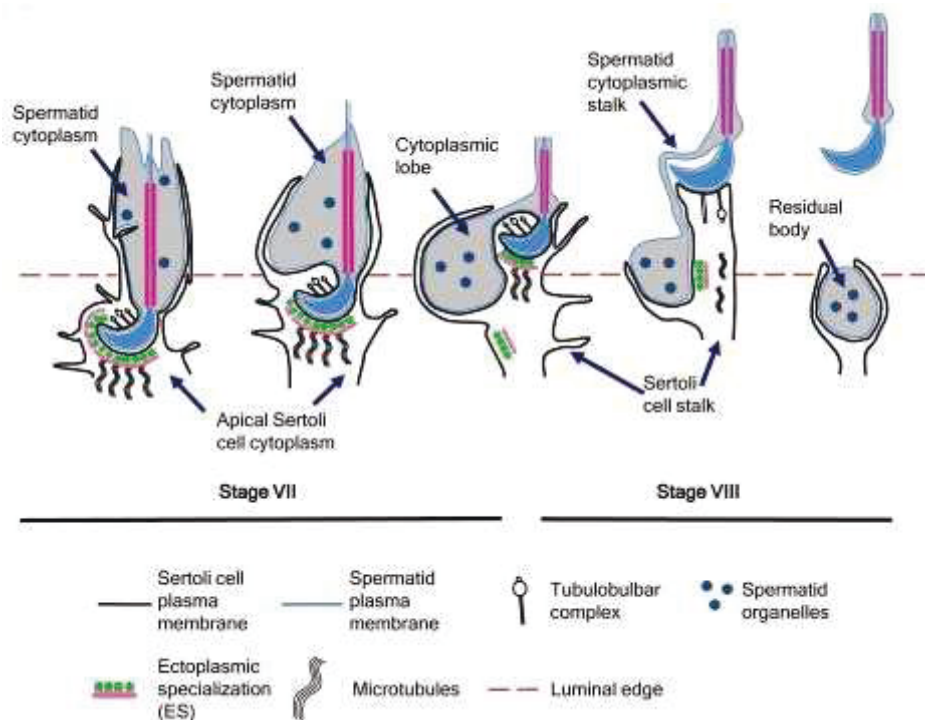


Figure 21: Le processus de spermiation: La spermiation débute au stade VII, le cytoplasme à été repoussé au niveau du flagelle, des complexes tubulo-bulbaires sont présents au niveau de la face incurvée du spermatozoïde. Des spécialisations ectoplasmiques (ES) constituées de citernes endoplasmiques sous lesquelles se situent des boucles d'actine. Au cours de la progression de la spermiation (stade VIII), le cytoplasme est éliminé avec les organelles. La tête du spermatozoïde prolongée du flagelle migre vers la lumière du tubule. La localisation et le nombre des complexes tubulobulbaires changent ils sont moins nombreux et se situent du côté dorsal. La fin de la spermiation se termine avec une élimination rapide des jonctions entre le spermatide et la cellule de Sertoli ainsi que la phagocytose du corps résiduel par les cellules de Sertoli. (O'Donnell et al., 2011)

#### **2.3.4) La spermiation**

La spermiation correspond à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères. Elle est régulée par des hormones, un défaut de FSH comme d'hormones androgènes entraîne une mauvaise spermiation. La testostérone est aussi nécessaire à une bonne spermiation. En cas de niveau de testostérone bas les spermatozoïdes sont plus vite relâchés dans la lumière, ils ne sont alors pas complètement formés. De plus il a été montré qu'une diminution de l'expression de la protéine LKB1 entraînait l'absence de spermiation. Les spermatozoïdes restent accumulés en bordure de la lumière des tubes séminifères (*Denison et al., 2011*).

#### **2.4) Le complexe acrosome –acroplaxome manchette**

L'acquisition de la morphologie de la tête est contrôlée par le complexe acrosome –acroplaxome manchette (*Yoshinaga and Toshimori, 2003*); (*Kierszenbaum et al., 2004*) L'acroplaxome est une structure de cytosquelette constituée de microfilaments d'actine (F-actine) et de kératine (Sak57) positionnés en face de l'appareil de golgi et contre le noyau. L'apparition de cette structure précède l'attachement et la fusion de vésicules proacrosomales auxquelles elle servirait de point d'attachement. Elle se développe et s'étend sur le noyau à partir du stade précoce de spermatide ronde. C'est une structure transitoire qui disparaît remplacée par la thèque périnucléaire dans le spermatozoïde mature. Les bords de cette plaque de cytosquelette constituent un anneau appelé l'anneau marginal. La manchette est constituée de deux structures de tubuline associées. Un anneau de tubuline alpha, l'anneau périnucléaire, entoure le noyau juste en dessous de l'anneau marginal de l'acroplaxome dont il est séparé par une invagination cytoplasmique à laquelle il est attaché. De cet anneau partent d'autres microtubules constitués de tubuline delta. Le noyau va s'allonger suite à des forces externes exercées par la cellule de Sertoli qui l'entoure et par des forces internes à la spermatide.

#### ***2.4.1) Les forces internes exercées sur le spermatozoïde***

Les forces internes de remodelage de la spermatide sont les forces d'élongation engendrées par l'extension de la manchette ainsi que des forces de constriction engendrées par l'anneau d'actine (marginal ring). La chromatine se condense suite au remplacement des histones par des protamines ce qui entraîne une diminution de la taille du matériel génétique dans le noyau. Le matériel génétique ainsi compacté est attaché à la membrane nucléaire par des boucles d'ADN libre, en cas de mauvaise liaison la membrane nucléaire pourrait se détacher du matériel génétique.

#### ***2.4.2) Les forces externes exercées sur le spermatozoïde***

A ce stade de maturation des spermatides, les cellules de Sertoli dans lesquelles sont insérés les spermatozoïdes vont développer des citernes de réticulum endoplasmique sous lesquelles sont associées des boucles de F-actine. Ces boucles ensèrent la tête du spermatozoïde et génèrent des forces qui sont transmises au spermatozoïde grâce à des jonctions adhérentes (figure 22). La dysfonction des molécules responsables des jonctions adhérentes entraîne des malformations de la tête du spermatozoïde. Les nectines font partie de la famille de molécules d'adhérence cellulaire dépendantes du calcium. Chez les souris KO pour les nectines 2 et 3 (NeCl-2, NeCl-3), on observe des dysfonctions majeures au niveau de la membrane où se trouvent les jonctions entre les cellules de Sertoli et la tête du spermatozoïde. Ces jonctions sont donc nécessaires à une morphologie normale de la tête du spermatozoïde (*Ozaki-Kuroda et al., 2002*).

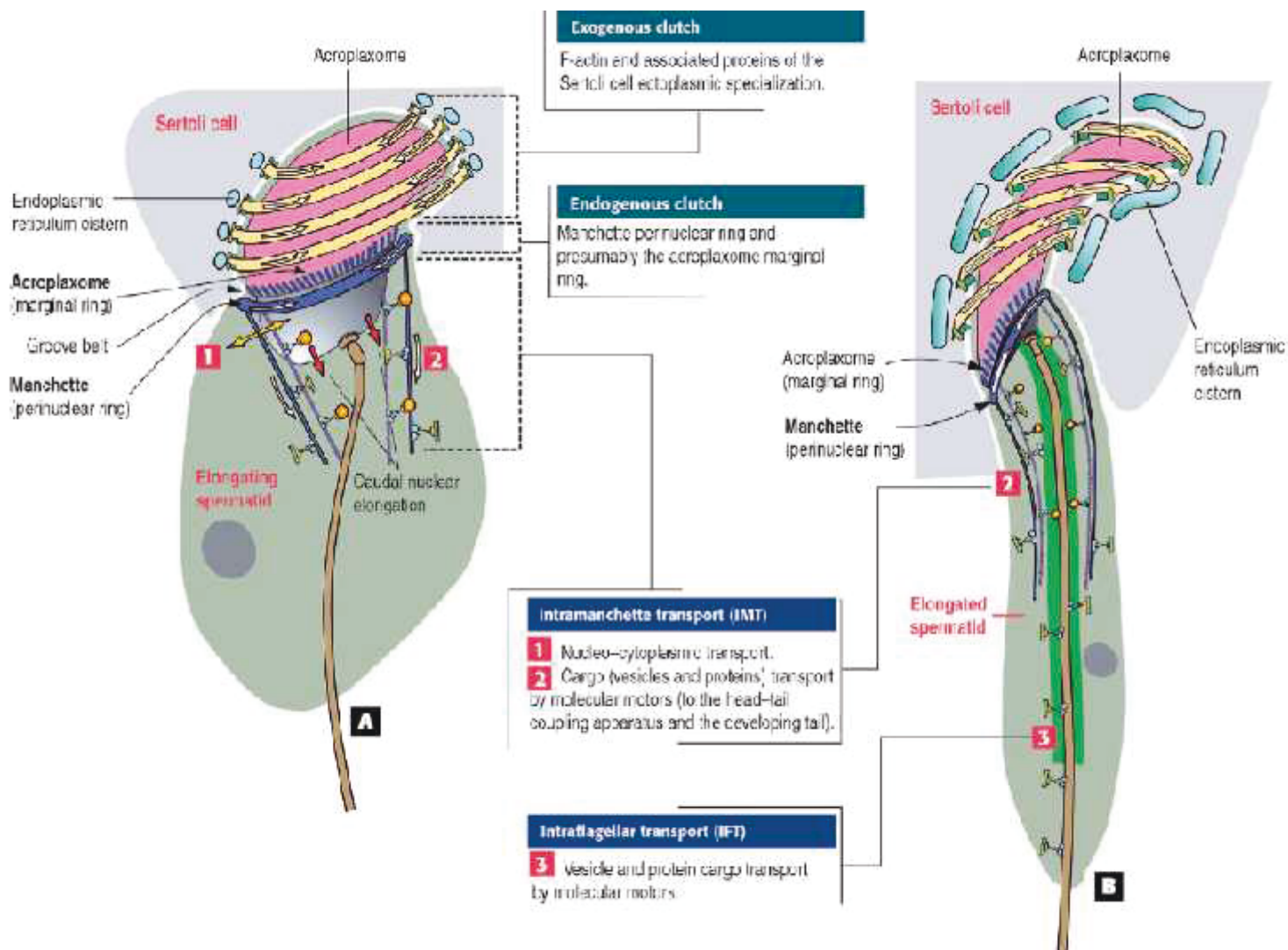


Figure 22: Schéma des forces de constriction endogènes et exogènes ainsi que le transport intra-manchette et intra-flagellaire de protéines au cours de l'élongation de la spermatide. A) La tête de la spermatide en élongation est enveloppée par des boucles parallèles de F-actine et leurs protéines associées qui vont réduire progressivement la taille de ces boucles (flèches). Ces boucles d'actines sont situées dans les cellules de Sertoli, ce sont des forces de constriction exogènes. L'anneau marginal de l'acroplaxome ainsi que l'anneau périnucléaire voient leurs diamètres diminuer au cours de l'élongation de la spermatide. Ils génèrent les forces de constriction endogènes à la spermatide. B) La manchette s'étend progressivement dans le cytoplasme et sert de rail pour le transport de vésicules et de protéines nécessaires au développement du centrosome et du flagelle. (Kierszenbaum and Tres, 2004)

### 3) Emission des spermatozoïdes

Une fois les spermatozoïdes libérés dans la lumière du tube séminifère, ils vont être drainés jusqu'à l'épididyme via le canal efférent. L'épididyme est constitué d'un long canal enroulé qui sert à stocker les spermatozoïdes, ils y subissent une maturation. Puis ils sont acheminés via le canal déférent jusqu'au niveau de l'ampoule déférentielle. Lors de l'éjaculation les spermatozoïdes passent par le canal éjaculateur qui traverse la prostate.

Ils sont alors mélangés aux sécrétions des vésicules séminales et prostatiques qui représentent près de 60% du volume du sperme. Les sécrétions des vésicules séminales contiennent du fructose qui sert à nourrir les spermatozoïdes et des protéines de coagulation ainsi que des prostaglandines. Les spermatozoïdes empruntent ensuite l'urètre où sont accolées les glandes de Littre et de Cowper qui jouent un rôle de défense immunitaire (lactoférine) qui sécrètent un mucus translucide servant à neutraliser l'acidité de l'urine ainsi qu'à déclencher la coagulation du sperme.

### **III Les pathologies du spermatozoïde**

L'augmentation de l'infertilité est en train de devenir une inquiétude mondiale. D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) près de 15 % des couples en âge de procréer rencontrent des problèmes pour concevoir. Un couple est considéré comme infertile après 18 mois d'essais infructueux. Les causes de cette infertilité sont exclusivement féminines dans 30 à 40% des cas et dans 10 à 30% des cas, les causes sont exclusivement masculines (*Van Steirteghem et al., 1999*). Des anomalies présentes chez les deux partenaires sont responsables de 15 à 30% des cas. Les infertilités masculines restent inexplicables dans 30 à 60 % des cas (*Seifer et al., 1999*).

Une des causes majeures de l'augmentation de l'infertilité mondiale est l'augmentation de l'infertilité masculine. La qualité spermatique a été sévèrement affectée ces dernières décennies particulièrement dans les pays développés tant chez l'homme (*Rolland et al., 2013*) que dans les élevages d'animaux (*Royal et al., 2000*). Cela souligne l'implication de facteurs environnementaux tels que les perturbateurs endocriniens dans cette dégradation de la fertilité. Parallèlement il a été découvert de nombreux gènes impliqués dans des infertilités masculines, ce qui permettra à terme une meilleure compréhension des mécanismes complexes impliqués au cours de la spermatogénèse. Ces découvertes permettent d'envisager le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. De plus, l'identification de facteurs génétiques impliqués dans les infertilités masculines devrait permettre de proposer de nouveaux outils de diagnostic, et ainsi permettre de mieux orienter le patient vers les techniques d'aide à la procréation médicalement assistée (PMA) les plus adaptées.



## **1) Les différents types d'infertilité masculine**

L'infertilité masculine est donc impliquée dans l'infertilité des couples dans près d'un cas sur deux. Si les causes peuvent être nombreuses, on distingue deux grandes catégories. Un défaut de sécrétion de spermatozoïde qui est le résultat de l'absence de production de spermatozoïdes. C'est une des causes principales d'infertilité impliquant généralement un défaut de spermatogénèse. La deuxième catégorie implique un défaut d'excrétion, c'est à dire que les spermatozoïdes produits ne sont pas correctement acheminés.

L'identification des causes de l'infertilité masculine chez un patient rencontrant des difficultés à procréer commence par un spermogramme. Cet examen médical permet entre autre de quantifier les spermatozoïdes, d'évaluer leur mobilité ainsi que leur morphologie. Ainsi un spermogramme est considéré comme normal selon la nouvelle norme de l'OMS datant de 2010, si l'éjaculat a un volume supérieur à 1.5 millilitres et que le pH est compris entre 7,2 et 8. La viscosité du sperme est évaluée et le nombre de spermatozoïde doit être au minimum de 39 millions. Au moins 4% des spermatozoïdes doivent présenter une morphologie normale. Il est intéressant de noter que cette quantité minimale de spermatozoïdes ayant une morphologie normale était estimée à 30% par la norme de l'OMS datant de 1999. Cela souligne la baisse de la qualité spermatique au cours de la dernière décennie. Les causes d'infertilité sont ainsi classées en 5 grandes catégories.

### **1.1) L'asthénozoospermie**

L'asthénozoospermie correspond à une diminution de la mobilité des spermatozoïdes. Le pourcentage de spermatozoïdes mobiles doit être supérieur à 60% dans l'éjaculat.

### **1.2) L'azoospermie**

L'azoospermie correspond à une absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Elle peut être le résultat d'une obstruction des canaux acheminant le sperme (Obstructive azoospermia (OA)), dans ce cas ce n'est pas une cause de stérilité définitive. Soit c'est le résultat d'un problème de formation des spermatozoïdes, le sujet est alors stérile (Non-obstructive azoospermia (NOA))

### **1.3) L'oligospermie**

L'oligozoospermie correspond à une quantité anormalement faible des spermatozoïdes. En dessous de 5 millions de spermatozoïdes par millilitre la personne est considérée comme infertile. Cette anomalie est en constante augmentation et touche particulièrement les pays industrialisés. Ce qui suppose qu'une grande proportion de cette anomalie est due à des facteurs environnementaux.

### **1.4) La nécrospermie**

La nécrospermie correspond à la présence de plus de 50% de spermatozoïdes morts dans l'éjaculat. Elle est souvent causée par des infections.

### **1.5) Les tératospermies**

Les tératospermies présentent des spermatozoïdes mal formés. C'est la classification de David qui est utilisée pour classifier les anomalies. On distingue 3 grandes catégories d'anomalies ; les anomalies de la tête, les anomalies de la pièce intermédiaire et les anomalies de la pièce principale. Les anomalies de la pièce principale sont classées en 5 catégories. La pièce principale est absente, écourtée, de calibre irrégulier, enroulée ou multiple. Les anomalies de la pièce intermédiaire sont répertoriées en 3 catégories : avec reste cytoplasmique, grêle et angulée. Les anomalies de la tête sont répertoriées en 7 catégories : allongées, amincies, microcéphales, macrocéphales, multiples, acrosome anormal ou absent. La globozoospermie caractérisée par des spermatozoïdes ayant une grosse tête (macrocéphale) dépourvue d'acrosome, fait partie de cette dernière catégorie et sera développée dans la partie suivante.

Les anomalies ici décrites sont le plus souvent cumulées, on les nomme alors les **oligoasthénotératospermies (OATS)**.

## **2) Les principales causes génétiques connues**

Un diagnostic génétique de l'infertilité masculine est généralement effectué à la suite de ce spermogramme. Ce diagnostic consiste généralement à la recherche de 3 types d'anomalies génétiques majeures.

## **2.1) Les anomalies chromosomiques**

Les anomalies chromosomiques sont détectées par analyse du caryotype ou par analyse FISH (hybridation fluorescente in situ) suite à un prélèvement sanguin. Ces analyses sont généralement effectuées dans les cas d'oligospermie ou d'azoospermie. Les anomalies chromosomiques sont estimées entre 2 et 8% du caryotype. Cette proportion d'anomalie monte à près de 15% chez les patients azoosperme. Elles correspondent à des anomalies du nombre ou de la structure des autosomes mais elles touchent majoritairement les gonosomes dans le cas des infertilités masculines.

## **2.2) Les mutations du gène CFTR**

Les mutations du gène CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), sont recherchées dans le cas d'agénésie des canaux déférents. Ce gène code pour un canal chlorure de la membrane plasmique. Lorsqu'il est muté de façon majeure sur ses deux allèles, il est responsable de la mucoviscidose. Les patients atteints de mucoviscidose sont infertiles avec une absence des deux canaux déférents. Lorsqu'une mutation mineure du gène présente sur l'un des allèles est associée à une autre mutation mineure sur l'autre allèle, le syndrome général de la mucoviscidose peut-être absent. Cependant cette association de mutations mineures peut être responsable de l'absence unilatérale ou bilatérale des canaux déférents.

## **2.3) Les micro-délétions du chromosome Y**

L'analyse des micro-délétions du chromosome Y est effectuée lors du diagnostic d'oligospermie ou d'azoospermie sévères. Des anomalies de ce type sont détectées grâce à une analyse par PCR multiplexe révélant la présence ou l'absence de marqueurs cibles. Ces marqueurs sont situés dans une région appelé AZF qui correspond à de l'euchromatine du bras long du chromosome Y. Cette région possède trois loci AZF a, b et c qui possèdent de nombreux gènes impliqués dans la spermatogénèse tels que les gènes USP9Y et DAZ1. La mutation la plus fréquente est la mutation du locus c.

Le diagnostic génétique permet de fournir une explication de la raison de l'infertilité au patient dans moins de 5 % des cas. En effet une grande partie des gènes identifiés comme responsables des infertilités masculines échappent à ces analyses génétiques. De plus une grande partie des gènes impliqués dans les infertilités masculines n'ont pas encore été identifiées. Or, le diagnostic génétique permet d'orienter l'aide à la procréation médicalement assistée vers les techniques qui seront les plus efficaces et les

moins lourdes pour le couple. Il permettrait ainsi d'augmenter les taux de réussite et ainsi diminuer les couts de la PMA.

## 2.4) Des mutations génétiques sur les autosomes

Des mutations génétiques peuvent aussi affecter les autosomes et être impliquées dans des infertilités masculines. Le gène NANOS1 est impliqué dans une infertilité masculine humaine dite SCOS (Sertoli-cell-only-syndrome) entraînant une oligo-asthénotérazoospermie, et une diminution drastique des cellules germinales dans les testicules (*Kusz-Zamelczyk et al., 2013*). Le gène est situé sur le chromosome 10 et des mutations sur la partie N-ter du gène sont responsables de ce phénotype. Un autre gène a aussi été identifié dans une infertilité masculine HSF2 (heat shock transcription factor 2) situé sur le chromosome 6, qui code le facteur de transcription de choc thermique 2. La protéine mutée est non fonctionnelle et induit un phénotype d'azoospermie idiopathique (IA) (*Mou et al., 2013*). Deux autres gènes SPATA16 et DPY19L2 sont impliqués dans des anomalies de structures des spermatozoïdes, la globozoospermie (voir chapitres suivant).

Type d'azoospermie	Anomalies génétiques
Azoospermie osbtructive (OA)	Mutations du gène CFTR Microdélétions du bras long du chromosome Y (AZF)
Azoospermie non-obstructive (NOA)	Microdélétions du bras long du chromosome Y (AZF), USP9Y Mutations sur le chromosome X: TEX, TAFZL, ARX, KAL-1 Mutations sur les autosomes : HSF2 Translocations Robertsonienne (RT)

Tableau 1: Tableau récapitulatif des anomalies génétiques impliquées dans l'azoospermie humaine. D'après (Hamada et al., 2013)

### **3) La globozoospermie**

#### **3.1) Définition**

La globozoospermie est un cas d'infertilité masculine rare. C'est une tératozoospermie qui correspond à moins de 0,1% des cas d'infertilité masculine. Le phénotype a été décrit pour la première fois par en 1973, les spermatozoïdes sont caractérisés par une tête ronde dépourvue d'acrosome (*Holstein et al., 1973*).

Singh en 1992, a décrit 2 types de globozoospermies : la globozoospermie de type I, caractérisée par des spermatozoïdes présentant une absence totale d'acrosome ainsi que des enzymes acrosomique et la globozoospermie de type II caractérisée par des spermatozoïdes présentant un acrosome partiel (*Singh, 1992*).

L'absence totale d'acrosome implique une infertilité puisque ce dernier contient les enzymes nécessaires au spermatozoïde pour traverser la zone pellucide et fusionner avec l'ovocyte. (*Dam et al., 2007a*).

De plus des études ont montré que l'ADN des spermatozoïdes globozoocéphales présente des anomalies de compaction de l'ADN ce qui entraîne une fragmentation accrue de leur ADN. En effet la mauvaise compaction de l'ADN à pour conséquence une diminution de la protection face aux agents oxydant. Cette mauvaise qualité de l'ADN pourrait expliquer les faibles taux de succès de l'ICSI pratiquée avec ces spermatozoïdes (*Larson et al., 2001*); (*Brahem et al., 2011*).

#### **3.2) Les gènes impliqués dans la globozoospermie humaine et murine**

La globozoospermie est souvent retrouvée chez plusieurs membres d'une même famille en relation avec un fort taux de consanguinité. Cela suggère une origine génétique de la pathologie. Avant ce travail, chez l'homme un seul gène avait été caractérisé comme impliqué dans cette maladie, le gène SPATA16. Par contre, dans les modèles murins, de nombreuses protéines avaient été caractérisées comme importantes dans la formation de l'acrosome et dont l'absence provoque une infertilité caractérisée par des spermatozoïdes de type globozoosperme. Ainsi plusieurs protéines impliquées dans le transport vésiculaire et donc dans la biogénèse de l'acrosome ont été découvertes de cette façon. Les gènes CSNK2A2, GOPC, HRB et PICK1 induisent des spermatozoïdes à tête ronde chez les souris KO. Des gènes sont aussi impliqués dans un défaut d'attachement de l'acrosome au noyau, c'est ce dont nous traiterons en deuxième partie après un rappel des protéines de la

membrane nucléaire.

### ***3.2.1) Les gènes impliqués dans le transport vésiculaire***

#### **2.1.1) CSNK2A2**

Le gène CSNK2A2 code la protéine caséine kinase II (CK2), la protéine possède deux sous unités catalytiques,  $\alpha$  et  $\alpha'$  et deux sous unités régulatrice  $\beta$ . C'est une protéine ubiquitaire hautement conservée qui joue un rôle clef dans la croissance cellulaire, la prolifération et la survie (*Slaton et al., 2004*). Elle est exprimée à un stade tardif de la spermatogénèse et est responsable de la croissance des cellules germinales ainsi que dans la transduction de signal vers la matrice nucléaire au cours de la spermatogénèse. Les souris mâles chez qui le gène CSNK2A2 a été éliminé, présentent des anomalies de développement de l'acrosome et du noyau. Elles ont des spermatozoïdes présentant un acrosome malformé ou complètement absent. Et lorsque l'acrosome est encore présent, il ressemble à un reste d'acrosome détaché du noyau (*Xu et al., 1999*).

#### **2.1.2) GOPC**

Le gène GOPC code une protéine possédant un domaine PDZ, deux motifs en hélice ainsi que deux régions conservées dont la fonction est encore inconnue. Le domaine PDZ interagit avec l'appareil de Golgi. Les domaines en 2 hélices sont impliqués dans le développement de l'acrosome grâce à leur liaison à l'appareil de Golgi (*Yao et al., 2002*). Cette liaison permet le transport des vésicules issues du Golgi vers l'acrosome en formation. Lorsque ce gène est absent chez les animaux KO, le transport des vésicules au niveau du trans Golgi se fait mal et l'on n'observe pas le développement de la vésicule géante de l'acrosome. De plus les vésicules ne sont plus capables de fusionner entre elles (figure 23). Finalement, l'acroplaxome chez ces souris n'est pas complètement formé ce qui induit un défaut d'ancrage de l'acrosome au noyau. Chez ces souris, il a aussi été mis en évidence par microscopie électronique une absence de la thèque périnucléaire qui se trouve sous l'acrosome (PAS pour post acrosomal sheat) dans les spermatozoïdes ayant une tête ronde (*Ito et al., 2009*). Cette structure est possiblement impliquée dans le remodelage de la tête et dans la mise en place de la manchette. L'absence de cette structure induit l'absence ou la malformation de l'anneau postérieur entraînant la persistance du cytoplasme autour du noyau ainsi que des malformations du flagelle, de la pièce intermédiaire et sa gaine mitochondriale (*Suzuki-Toyota et al., 2004*).

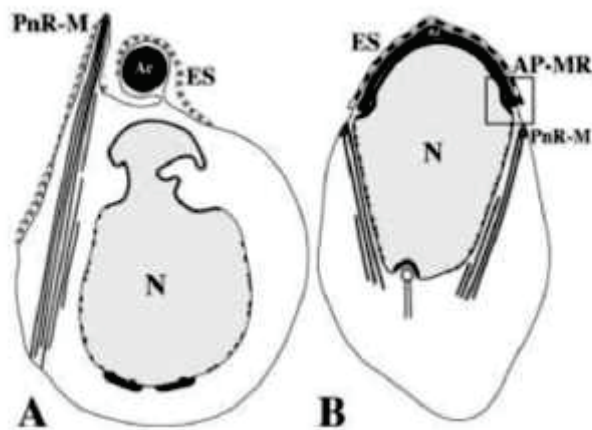


Figure 23: Schéma des défauts induits des spermatides en élongation par l'absence de Gopc chez les souris *GOPC*<sup>-/-</sup> (A) comparé au sauvage (B). L'acrosome (Ac) se détache, formation anormale de l'anneau marginal de l'acroplaxome (AP-MR) et mauvaise localisation du complexe formé par l'anneau périnucléaire et la manchette PnR-M. Les spécialisations ectoplasmiques (ES) sont mal formées. D'après (Ito et al., 2004)

### 2.1.3) ZPBP1 et ZPBP2

Les Zpbp (zona pellucida binding protein) sont les récepteurs aux glycoprotéines ZP1 et ZP2 qui constituent la zone pellucide. Au cours de la spermiogénèse Zpbp1 et Zpbp2 présentent une localisation différente. Zpbp1 est présent dans l'ensemble de l'acrosome tandis que Zpbp2 est présent dans les vésicules proacrosomales. Dans le spermatozoïde mature la localisation de Zpbp1 dans l'ensemble de l'acrosome est maintenue tandis que Zpbp2 a une localisation sur la partie externe de l'acrosome (figure 24) (Lin et al., 2007).

Les KO pour ZPBP1 et pour ZPBP2 ont été développés et leurs spermatozoïdes présentent de manière inattendue des morphologies anormales. Si pour le KO de ZPBP2 les anomalies morphologiques sont légères et les mâles présentent une légère baisse de fertilité, pour le KO de ZPBP1 par contre les mâles sont infertiles et les spermatozoïdes présentent une morphologie de type globozoospermie. Au cours de la spermiogénèse l'acrosome ne va pas se compacter en une fine couche autour du noyau. Il s'étend mais reste sous la forme d'une grosse vésicule ce qui va conduire à sa vésiculation, sa fragmentation et à son élimination. Les jonctions entre les cellules de Sertoli et la spermatide sont endocytées par les cellules de Sertoli avec les fragments d'acrosome (Lin et al., 2007).

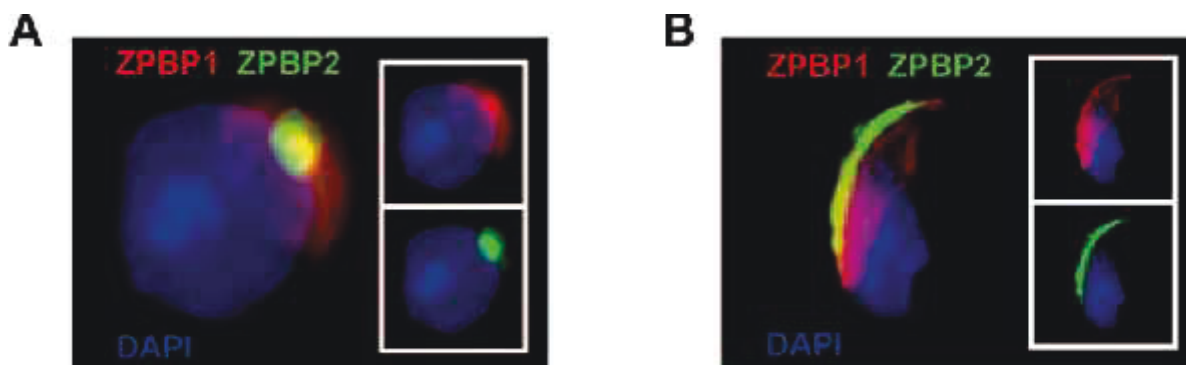


Figure 24 : Les protéines Zpbp1 et 2 sont des protéines internes à l'acrosome. La microscopie à fluorescence montre la différence de localisation de Zpbp1 (rouge) et Zpbp2 (vert) dans la spermatide ronde stade 5 (A) et le spermatozoïde (B) de souris. D'après (Lin et al., 2007)

#### 2.1.4) HSP90B1

Hsp90b1 est une protéine chaperonne endoplasmique appartenant à la famille des protéines Hsp90 (heat shock protein 90). Elle est impliquée dans le repliement des protéines et dans le ciblage des protéines mal repliées pour permettre une dégradation par le réticulum endoplasmique (endoplasmique reticulum associated degradation ERAD). Elle participe également au stockage du calcium. Au delà de ces fonctions de base fondamentales pour la cellule, elle est bien connue pour jouer un rôle dans l'immunité, le cancer et des désordres neurologiques. Hsp90b1 est aussi un gène essentiel au cours du développement embryonnaire, chez la souris KO l'embryon meurt aux environs du 7<sup>ème</sup> jour de gestation, il est incapable de générer le mésoderme. Chez le KO conditionnel, la délétion du gène est présente uniquement dans les cellules germinales du mâle et de la femelle. Les mâles KO sont infertiles et présentent un phénotype de type globozoospermique (*Audouard and Christians, 2011*).

#### 2.1.5) GABA2

Les mâles de la lignée KO pour la B-glucosidase 2 présentent une infertilité et leurs spermatozoïdes sont de type globozoosperme. L'enzyme  $\beta$ -glucosidase ER 2 (GABA2) est majoritairement exprimée au niveau du cerveau du foie et des testicules. Elle présente une activité enzymatique  $\beta$ -glucosidase et une activité transférase. Chez le KO l'activité transférase est complètement éteinte alors qu'une activité  $\beta$ -glucosidase persiste sans doute par un effet de compensation avec la GBA. Le KO ne semble être affecté qu'au niveau de la spermiogénèse avec un fort taux de cellules en apoptose. Près de 80 % de cellules sont en apoptose chez le KO contre 10% chez le WT (*Roy et al., 2006*). L'expression de GABA2 est localisée au niveau des cellules de Sertoli où il est observé une accumulation



anormale de glucosylcéramides dans les lysosomes. Le phénotype de spermatozoïde à tête ronde et sans acrosome peut être le résultat de cette anomalie des cellules de Sertoli mais ce peut être aussi le résultat de la perte du métabolisme des sphingolipides dans les spermatides (*Yildiz et al., 2006*). En effet il est connu que les radeaux lipidiques constitués de micro domaines de cholestérol –sphingolipide sur la bicouche lipidique sont essentiels pour un trafic vésiculaire normal (*Ikonen, 2001*).

#### 2.1.6) HRB

HRB (HIV (human immunodeficiency virus)-1 Rev-binding/Rev-interacting protein) est un gène codant des cofacteurs de la protéine HIV-1 Rev. Cette protéine régule le transport nucléoplasmique de protéines et d'ARN (*Doria et al., 1999*). Hrb est aussi connu sous le nom de Rab (Rev/Rex activation domain-binding protein). Elle est capable d'interagir avec les protéines possédant un domaine homologue d'EPs15 (HE), ce domaine est impliqué dans l'endocytose et le tri de vésicules. Elle se situe à la surface des vésicules proacrosomiques et elle est responsable de l'ancrage de l'acrosome. Elle est aussi nécessaire à la fusion des vésicules proacrosomiques dans l'acrosome grâce au transport nucléocytoplasmique (*Kang-Decker et al., 2001*); (*Juneja and van Deursen, 2005*). En absence de Hrb les vésicules proacrosomales restent accumulées le long de l'acroplaxome. Les souris mâles KO pour ce gène ont des spermatozoïdes globozoospermes présentant une tête ronde dépourvue d'acrosome. Leurs spermatozoïdes présentent aussi un acroplaxome qui est malformé entraînant un mauvais remodelage du noyau. L'acroplaxome de ces souris contient de la F-actine mais pas de kératine 5 (*Kierszenbaum et al., 2004*). C'est donc l'absence de kératine 5 dans l'acroplaxome qui induit sa malformation (*Kierszenbaum and Tres, 2004*). Sans ce composant, qui forme normalement des filaments, l'acroplaxome perd de sa résistance mécanique.

#### 2.1.7) PICK1

Une souris KO pour le gène PICK1 a été créée afin d'étudier le rôle de cette protéine qui est fortement exprimée dans le cerveau, le pancréas et les testicules. Cette souris présente chez les mâles une infertilité totale, le phénotype des souris est le même que chez les patients atteints de Globozoospermie (*Xiao et al., 2009*). Dans le cerveau, Pick1 est impliqué dans la signalisation neuronale. Elle est ainsi retrouvée du côté post et pré synaptique. Cette protéine possède un domaine PDZ qui lui permet d'interagir avec d'autres protéines, comme

la protéine kinase C qui lui a donné son nom. Dans les testicules elle est impliquée dans le transport des vésicules pro-acrosomale dans les stades précoces de la spermiogénèse. Elle colocalise avec Gopc et l'appareil du trans-Golgi où elle permet l'acheminement des vésicules proacrosomales vers l'acrosome en formation.

#### **2.1.8) SPATA16**

Une étude génétique a permis d'identifier le gène SPATA16 comme étant responsable d'un cas de globozoospermie familiale. Cette étude porte sur une famille dont 3 frères sont infertiles avec des spermatozoïdes globozoocéphales et 3 autres frères fertiles. Ce gène, aussi appelé *NYD-SP12* (*Xu et al., 2003*); (*Zhang et al., 2007*) est exprimé dans le testicule humain. L'orthologue de ce gène chez la souris est exprimé dans les spermatocytes et les spermatides. La protéine est plus particulièrement localisée au niveau de l'appareil de Golgi ainsi que dans les vésicules proacrosomales (*Dam et al., 2007b*). Cette protéine possède un domaine TPR responsable d'interactions avec d'autres protéines. Ce domaine pourrait ainsi être responsable d'interaction avec les protéines Gopc et Hrb. C'est ce domaine qui est retrouvé muté dans cette famille.

#### **2.1.9) SPACA1**

C'est une protéine membranaire qui est retrouvée exprimée uniquement dans le testicule. SPACA1 est localisée dans la membrane interne de l'acrosome. Suite à son blocage avec un anticorps, les spermatozoïdes ne sont plus capables de fusionner avec l'ovocyte comme observé pour le KO de la protéine Izumo. Chez le KO de SPACA1 les spermatozoïdes sont de type globozoosperme. Avec une perte de l'acrosome ainsi que de la plaque dense située sous l'acrosome. Le KO de GOPC présente une présence de Spaca1 et de Zbp1 fortement diminuée ce qui est logique puisque les protéines ne sont pas correctement acheminées. Chez le KO de ZBP1 il est observé une perte de l'expression de SPACA1. Chez le KO de SPACA1 par contre l'expression de ZBP1 est conservée. Ce qui a permis de proposer le modèle présenté figure 25 (*Fujihara et al., 2012*).

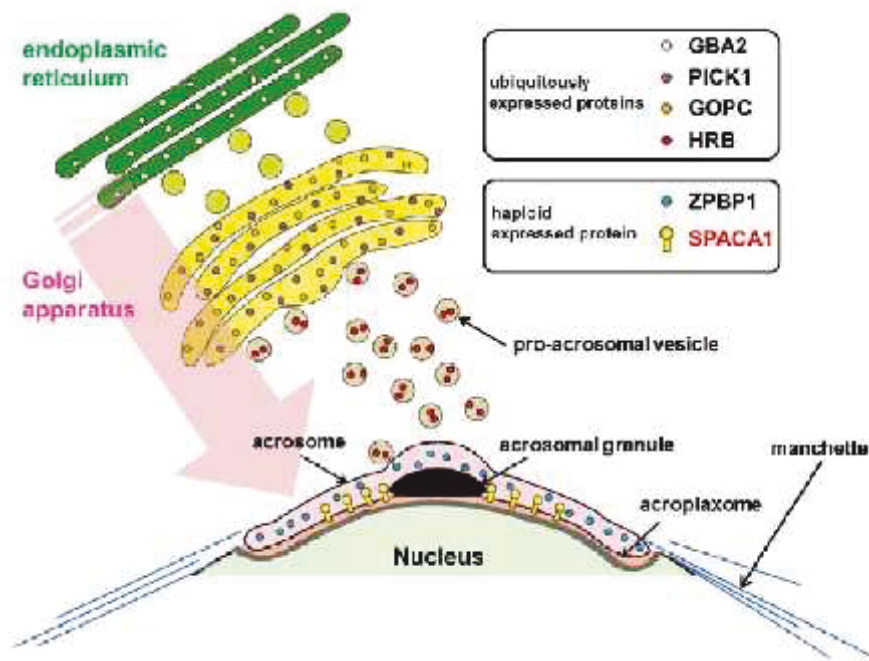


Figure 25: Protéines dont l'altération de l'expression a des effets sur la spermatogénèse et est associée à la globozoospermie chez la souris. Gaba2 est une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique et d'expression ubiquitaire. Pick1 est une protéine membranaire qui est impliquée dans le trafic de protéines. GOPC est une protéine associée à l'appareil de golgi. HRB joue un rôle dans l'attachement et/ou la fusion des vésicules proacrosomales. SPACA1 est une protéine membranaire localisée sur dans la membrane interne de l'acrosome. L'absence de cette protéine entraîne la perte de la zone dense nucléaire située sous l'acrosome. Toutes ces protéines sont exprimées de manière ubiquitaire sauf Pick1 qui a une expression neuronale et testiculaire. D'après (Fujihara et al., 2012)

#### IV Interactions du noyau avec le cytosquelette dans le contexte de la spermatogénèse.

##### 1) L'enveloppe nucléaire, ses rôles

L'enveloppe nucléaire est issue de l'extension du réticulum endoplasmique dans les cellules eucaryotes. Elle est constituée de deux membranes, la membrane nucléaire interne et la membrane nucléaire externe. Ces deux membranes permettent d'isoler physiquement le matériel génétique de la cellule, situé dans le nucléoplasme, du cytoplasme tout en permettant des échanges avec le cytoplasme via les pores nucléaires (*Onischenko and Weis, 2011*). Elle joue aussi un rôle dans l'organisation du matériel génétique, elle est responsable de la localisation de la chromatine, de l'appariement des chromosomes lors de la méiose et du positionnement du noyau dans la cellule (*Mekhail and Moazed, 2010*); (*Stewart et al., 2007*). Elle est le lieu d'interactions du cytosquelette avec le nucléosquelette. Les forces exercées sur le cytosquelette peuvent ainsi être transmises au noyau.

## 1.1) La lamine

Les lamines sont des protéines situées sous l'enveloppe nucléaire dans le noyau où elles forment un maillage dynamique, la lamina, qui constitue une sorte de squelette du noyau (nucléosquelette). Elles participent au maintien de l'intégrité du noyau. Elles appartiennent à la famille des filaments intermédiaires, ce sont des protéines fibrillaires composées d'un domaine central en bâton constitué d'hélices  $\alpha$  et de deux extrémités globulaires. Le domaine central est capable de se lier à la chromatine. Chez l'homme il existe 6 types de lamines A, A $\Delta$ 10, B1, B2, B3 et C codées par 3 gènes LMNA, LMNB1 et LMNB2. Le gène LMNA code 4 isoformes grâce à l'épissage différentiel de l'ARN, les deux isoformes majoritaires la lamine A et C et les deux isoformes minoritaires C2 et A $\Delta$ 10. La lamine B1 est codée par le gène LMNB1 et les lamines B2 et B3 sont codées par le gène LMNB2 suite à de l'épissage alternatif. Les protéines subissent ensuite une maturation complexe qui va consister en l'ajout transitoire d'un groupement farnésyle, très hydrophobe sur le motif CaaX (Caa pour Cysteine aliphatic amino acid et X sert à désigner le groupe des phényles) (figure 26). Ce groupement lui assure un ancrage membranaire nécessaire à son adressage au noyau avec le signal d'adressage au noyau (NLS). La polymérisation se fait entre deux molécules parallèles via le domaine central en hélice. Ces dimères s'organisent ensuite en longs filaments en se mettant bout à bout via les sites d'associations longitudinaux et latéraux.

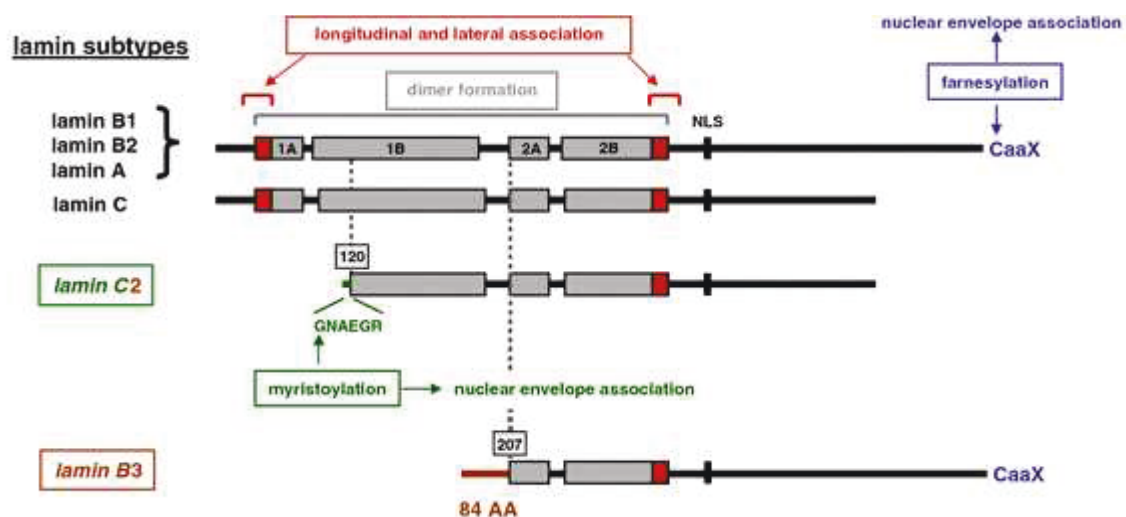


Figure 26 : Structure moléculaire des lamines. Le domaine central permet la formation de dimères. L'association latérale et longitudinale est aussi représentée. (Stuurman et al., 1998)

Les lamines B1 et B2 sont exprimées de manière ubiquitaire tandis que les lamines A et C sont exprimées dans les cellules différenciées ou en cours de différenciation. On les retrouve ainsi dans certaines cellules du système nerveux, de la peau, du cœur, des muscles, des ostéoblastes et des adipocytes. Les protéines de la matrice du noyau dans la lignée des spermatocytes sont très différentes de celles de la lignée somatique. Ainsi la lamine A, C et B2 présentes dans la lignée somatique sont absentes. Les cellules expriment à la place la lamine somatique B1 et la lamine C2, un variant de la lamine A raccourci en N-ter et spécifique de la méiose. La lamine C2 forme des domaines discontinus sous la membrane nucléaire et est enrichi en site de liaison des télomères. La lamine B3 est spécifique des cellules germinales, elle est exprimée au cours de la spermiogénèse (figure 27) (*Schutz et al., 2005*).

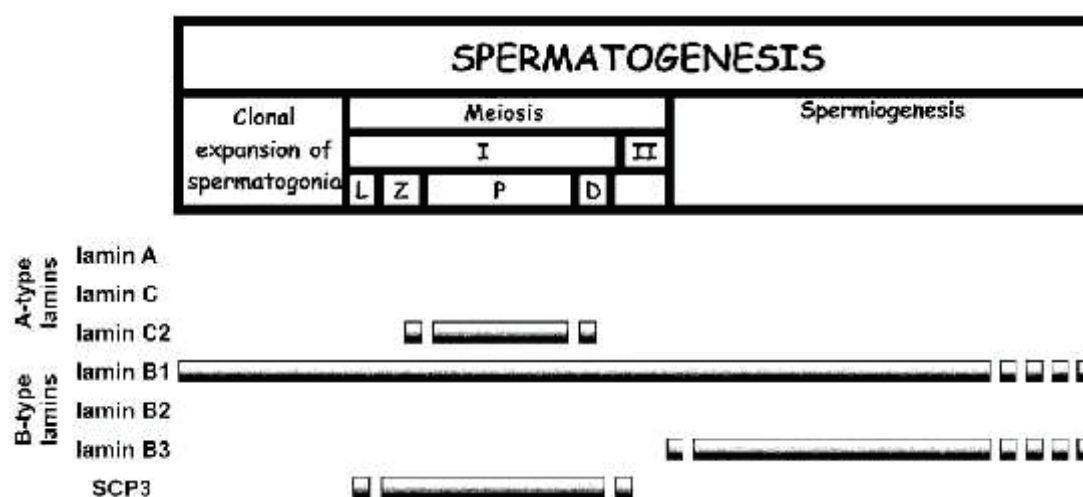


Figure 27 : Pattern d'expression des lamines au cours de la spermatogénèse. Le pattern d'expression de SCP3 marqueur spécifique de la méiose a aussi été montré. L/Z leptotène zygotène, P pachytène, D diplotène. SCP3 synaptonemal complex protein. (*Schutz et al., 2005*)

## 1.2) Le rôle des lamines

Les lamines sont impliquées dans plusieurs maladies génétiques appelées laminopathies (*Worman and Bonne, 2007*) qui affectent les cellules musculaires cardiaques et squelettiques, les neurones, les adipocytes et d'autres tissus. Si la fonction des lamines n'est pas encore complètement comprise, il a été montré qu'elles jouent un rôle majeur dans la morphologie nucléaire (*Rowat et al., 2005*), la réplication de l'ADN, la transcription de l'ARN (*Chakalova et al., 2005*), la régulation du cycle cellulaire (*Zastrow et al., 2004*), la différenciation cellulaire et l'apoptose (*Morris, 2000*). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le mécanisme général impliqué dans ces laminopathies. Cela peut

être le résultat d'un défaut d'expression des gènes suite à une altération de l'interaction des facteurs de transcription ou de la chromatine avec la lamine nucléaire. Une hypothèse suggère une augmentation de la fragilité nucléaire et en cas de stress mécanique le noyau qui se casse (*Burke and Stewart, 2002*). Et enfin un défaut de la signalisation nucléaire entraînant une fonction nucléaire altérée (*Muchir et al., 2007*).

### **1.3) Les protéines de la membrane nucléaire**

Les nucléoporines constituent les complexes des pores nucléaires (NCP). Les protéines de la membrane nucléaire externe sont essentiellement composées de nesprines qui sont des protéines KASH. La membrane nucléaire interne possède plus de 60 protéines dont une grande majorité ne sont pas encore identifiées (*Schirmer et al., 2003*). Parmi ces protéines on retrouve les protéines SUN qui interagissent avec la lamine nucléaire et forment les complexes LINC avec les protéines KASK. On retrouve d'autres protéines qui sont liées à l'hétérochromatine et à la lamine. La protéine LBR (lamin B receptor) se lie à la lamine B ainsi qu'à la protéine de l'hétérochromatine 1 (*Solovei et al., 2013*); (*Ye and Worman, 1996*). Lap2 (lamina-associated polypeptide 2) lie l'hétérochromatine grâce à la protéine BAF (protein barrier-to-autointegration factor) (*Cai et al., 2001*); (*Shumaker et al., 2001*). Lap1 et Man1 sont aussi des protéines de la membrane nucléaire interne qui lient la lamine grâce à leur domaine LEM (Lap, Emerin, Man) (*Gonzalez et al., 2012*). L'Emerin se lie à HDAC3 (histone deacetylase 3) qui régule l'hétérochromatine (*Demmerle et al., 2012*).

#### **1.3.1) Les protéines LINC**

Récemment il a été découvert un lien mécanique entre le cytosquelette et le nucléosquelette, ce lien est constitué d'un complexe de protéines, les protéines LINC (Linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton). Ces protéines sont insérées dans la membrane nucléaire (MN), une protéine LINC se trouve sur la membrane nucléaire interne (MNI) et l'autre protéine LINC se trouve sur la membrane nucléaire externe (MNE). Elles interagissent ensemble au niveau du lumen de la membrane nucléaire (figure 28). La protéine située sur la MNI interagit aussi avec des composants du nucléoplasme, la lamine ou une autre protéine. La protéine située sur la MNE, quant à elle, interagit avec un composant du cytosquelette dans le compartiment du cytoplasme. Ces protéines LINC de la MNI sont

appelées protéines SUN (Sad1 and UNC-84). Les protéines LINC de la MNE sont appelées protéines KASH (Klarsicht, ANC-1, and Syne/Nesprin homology). Les protéines SUN s'associent en trimères et lient intimement trois peptides KASH (*Sosa et al., 2012*). L'association de trois protéines SUN est essentielle pour la bonne conformation du domaine globulaire responsable de la liaison avec les protéines KASH. Sans cette trimérisation la liaison SUN-KASH est perdue.

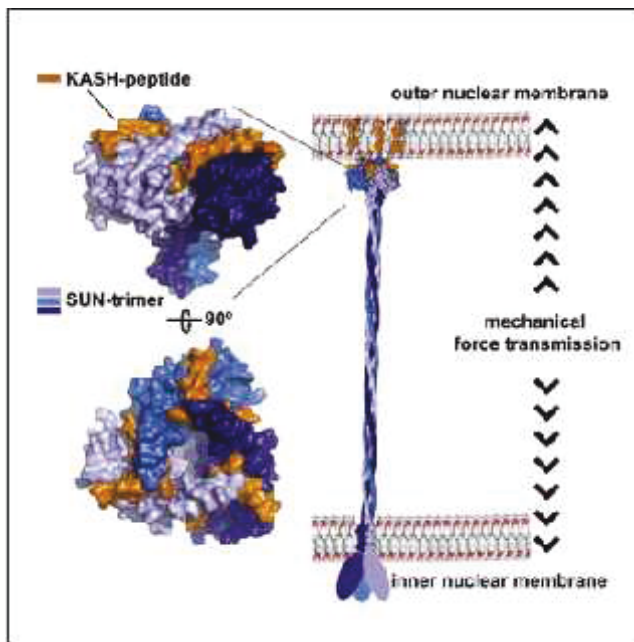


Figure 28: Modèle pour le complexe LINC qui lie les deux membranes de l'enveloppe nucléaire. Les protéines KASH (jaune) et les protéines SUN (bleu) sont des protéines transmembranaires. Le complexe LINC est à l'échelle d'après l'espace inter membranaire de respectivement la membrane nucléaire externe et la membrane nucléaire interne. La membrane interne et la membrane externe sont espacée de près de 45 nm. SUN2 s'associe en trimère sur le domaine en hélice du côté N-ter situé dans l'espace inter membranaire. L'extrémité du complexe forme un domaine globulaire qui lie trois protéines KASH. (*Sosa et al., 2012*)

### 1.3.1.1) Les protéines KASH

Les KASH sont des protéines de la membrane nucléaire externe possédant un long domaine N-ter cytoplasmique capable de lier le cytosquelette. Du côté C-ter, les protéines KASH ont un court peptide, d'environ 30 acides aminés, situé dans l'espace inter membranaire. C'est ce peptide qui porte le domaine KASH. Le domaine KASH est très conservé au cours de l'évolution, il est responsable de la localisation de la protéine au niveau de la membrane nucléaire externe (*Starr and Fridolfsson, 2010*) grâce à l'interaction de ce domaine avec les protéines SUN. Chez les mammifères il a été identifié 4 nesprines (SYNE/Nesprin-1 à -4) qui sont des protéines possédant un domaine KASH. Les nesprines 1 et 2 (SYNE1, 2) possèdent différents isoformes issus de l'épissage alternatif. Les grands isoformes sont ainsi capables de lier les filaments d'actines via leur domaine N-ter. Les

autres isoformes lient des protéines moteurs liées aux microtubules (*Padmakumar et al., 2004*); (*Yu et al., 2011*); (*Zhang et al., 2009*). La nesprine 3 qui est une petite molécule qui interagit avec la plectine, qui est liée au système des filaments intermédiaires, et l'actine. La nesprine 4, elle, n'est exprimée que dans quelques types cellulaires. Elle interagit avec la kinésine-1, une protéine associée aux microtubules (figure 29).

### 1.3.1.2) Les protéines SUN

Les protéines SUN constituent la partie interne du complexe LINC. Elles sont ancrées dans la membrane nucléaire interne par des segments transmembranaires. Leur domaine N-ter se situe dans le nucléoplasme et présente un signal qui permet d'envoyer les protéines SUN à la membrane nucléaire interne (NLS). Mais en l'absence de ce signal la protéine se localise quand même au noyau (*Haque et al., 2010*); (*Hasan et al., 2006*); (*Hodzic et al., 2004*). Ce domaine N-ter permet l'association avec les protéines partenaires du nucléoplasme comme la lamine (*Fridkin et al., 2004*); (*Haque et al., 2006*); (*Lee et al., 2002*), mais seules quelques protéines SUN requièrent la présence de lamines fonctionnelles pour se localiser. La partie N-ter via son interaction avec les lamines ou la chromatine pourraient jouer un rôle dans la régulation des gènes. La partie C-ter des protéines SUN se trouve au niveau du lumen entre les deux membranes lipidiques qui constituent la membrane nucléaire. Ce domaine est constitué d'une région en hélices suivie du domaine SUN très conservé.

Chez les mammifères cinq protéines SUN ont été identifiées jusqu'à présent, les protéines SUN 1 et SUN 2 sont majoritairement exprimées (*Crisp et al., 2006*); (*Wang et al., 2006*) et sont capables de lier les quatre nesprines (*Ketema et al., 2007*); (*Roux et al., 2009*); (*Stewart-Hutchinson et al., 2008*). Les protéines SUN 3, SUN 4 et SUN 5 n'ont pas une expression ubiquitaire, elles sont majoritairement exprimées au niveau du testicule.



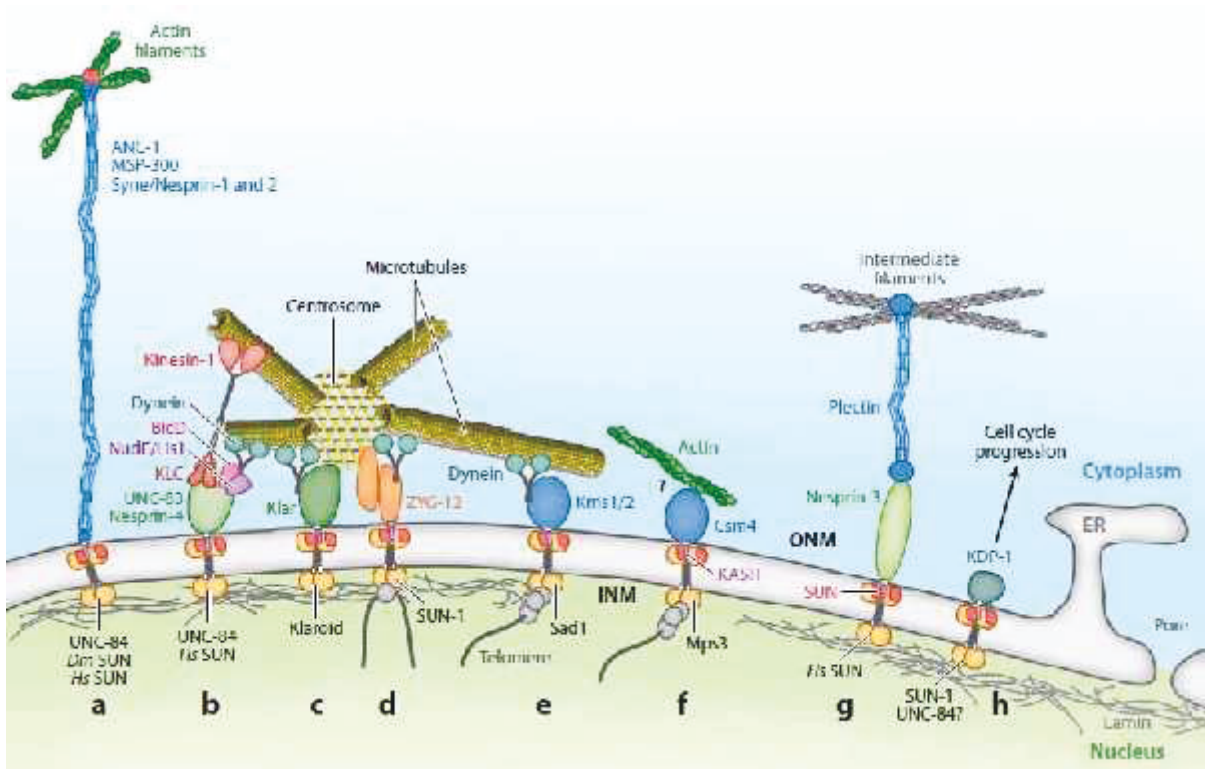


Figure 29: Fonction des complexes SUN-KASH. a) Les nesprines 1 et 2 des protéines géantes de la famille des KASH permettent de lier le noyau à l'actine (vert). b) UNC-83 et la nesprine 4 ont une fonction d'adaptateur spécifique du noyau pour une protéine cargo (kinesine 1) le long des microtubules. UNC-83 lie la dyneine à travers sa liaison avec BicD et le complexe NudE/List1. c) Klarsicht (Klar) interagit avec la dyneine pour la migration du noyau. d-f) le domaine nucléoplasmique des SUN est capable d'interagir avec les chromosomes lors de la méiose via des adaptateurs (cercles gris) et aide ainsi à l'assemblage des paires de chromosomes homologues. d) ZYG-12, chez *C. elegans*, interagit soit avec une isoforme de KASH soit directement avec la dyneine afin de lier le noyau au centrosome. Ce qui permet de positionner le noyau et de faire se déplacer les chromosomes. e) chez la levure KM1 et 2 recrutent la dyneine pour permettre le mouvement du noyau et des télomères au cours de la méiose. f) Csm4 lie l'actine et permet le déplacement des télomères grâce à une protéine intermédiaire inconnue. g) la nesprine3 interagit avec un filament intermédiaire à travers la liaison d'une pectine. h) KDP-1 permet la progression du cycle cellulaire chez le ver. (Starr and Fridolfsson, 2010)

### 1.3.2) Les protéines LINC impliquées dans la transmission des forces

Au cours de processus tels que la migration nucléaire ou le mouvement des chromosomes, les complexes LINC s'organisent en structure et non pas en unité. C'est dans les fibroblastes en culture monocouche que ce type de structure est mise à jour de façon remarquable. En prévision de la migration les fibroblastes sont polarisés par un mouvement vers l'arrière de leur noyau, celui-ci dépend du flux rétrograde de l'actine connecté à la membrane nucléaire via les complexes LINC. SUN2 et la nesprine2 qui sont en temps normal distribuées de façon homogène dans la membrane nucléaire vont ici s'organiser en réseaux linéaires alignés avec les réseaux d'actines. Ils ont été nommés les lignes TAN (Transmembranaire actin-associated nuclear). Il a été montré qu'une autre protéine de la membrane nucléaire interne Samp1 était nécessaire à la stabilisation du complexe LINC en augmentant la force de l'ancrage de SUN2. Samp1 (NET5) interagit avec

SUN2 et les lamines A/C (*Buch et al., 2009*); (*Schirmer et al., 2003*); (*Gudise et al., 2011*) et leur présence est nécessaire à la présence de Samp1 dans la membrane nucléaire (figure 30). Les cellules délétées en Samp1 présentent un défaut de migration du noyau.

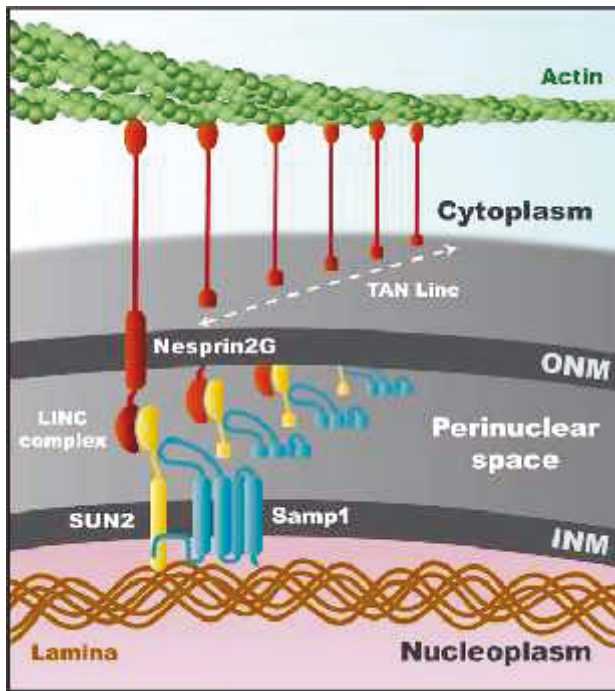


Figure 30: Modèle des lignes TAN et du rôle de Samp1 dans le mouvement du noyau. Samp1 permet de stabiliser les complexes LINC présents au niveau des lignes TAN. Samp1 permet d'ancrer SUN2 dans la membrane nucléaire. Les forces générées par le cytosquelette d'actine sont ainsi transmises à travers le complexe nesprin-2G, SUN2 et Samp1 à la lamina nucléaire ce qui permet le mouvement du noyau. (Borrego-Pinto et al., 2012)

### 1.3.3) Les protéines SUN dans la spermatogénèse

#### 1.3.3.1) SUN1 et SUN2

Les protéines LINC jouent un rôle majeur au cours de la spermatogénèse. On les retrouve ainsi impliquées dans la méiose ou elles participent au mouvement des chromosomes. Les télomères sont ainsi attachés à la membrane nucléaire interne via la protéine SUN1, appelée Sad1 chez *S. pombe* (*Chikashige et al., 2006*). Chez la souris SUN1 semble jouer un rôle majeur dans la spermatogénèse. La souris déficiente en SUN1 est viable mais elle est infertile tandis que la souris déficiente en SUN2 ne présente pas d'anomalie, la souris double KO elle n'est pas viable. Ce qui suggère un effet de compensation entre les protéines SUN1 et SUN2. Chez le mammifère SUN1 et SUN2 sont impliquées dans l'attachement des télomères à la membrane. Mais il semble que seule SUN1 est présente au cours de la gamétogénèse (*Frohnert et al., 2011*). Chez la souris, SUN1 qui est impliquée dans l'attachement des télomères du stade leptotène au stade diplotène au cours de la prophase 1 de la méiose (*Ding et al., 2007*). SUN1 est localisée du côté opposé de l'acroosome au niveau de la membrane

nucléaire interne dans les spermatides rondes et en élongation. Les protéines LINC permettent la transmission au chromosome des forces générées par le déplacement de la dynéine sur les microtubules. Un variant de la protéine SUN1 est retrouvé au niveau de la membrane externe de l'acrosome et colocalise avec la nesprine 3. Ce variant ne possède pas les exons 7 à 10 de la protéine qui sont responsables de la localisation au noyau (*Gob et al., 2010a*).

### 1.3.3.2) SUN3 à SUN5

Bien que la structure globale soit similaire entre toutes les SUN notamment au niveau des domaines homologues typiques des protéines SUN. Les protéines SUN 3 à SUN5 diffèrent de SUN 1 et SUN 2 par plusieurs aspects. Elles possèdent des variations de séquences au niveau de la liaison avec KASH. La cystéine impliquée dans la liaison avec KASH n'est pas conservée. De plus les régions en hélices de la partie luminale sont significativement plus courtes chez les protéines SUN3 à SUN5. Elles font entre 80 et 130 acides aminés contre environ 300 pour les protéines SUN1 et SUN2. Ce qui pourrait impliquer un rapprochement des deux membranes de l'enveloppe nucléaire. D'après des images de microscopie électronique l'espace entre les deux membranes semble plus étroit. Il est de l'ordre de 25 nm (*Rothballer et al., 2013*). Le rapprochement entre les deux membranes pourrait permettre une meilleure stabilité et rigidité nécessaire au bon développement du spermatozoïde et pourrait aider au remodelage du matériel nucléaire.

A l'opposé de l'expression ubiquitaire de SUN1 et SUN2, les protéines SUN3 à SUN5 ont une expression qui est très spécifique au tissu. Elles sont ainsi presque exclusivement exprimées dans les cellules germinales mâles. SUN3 est localisée dans la membrane nucléaire des spermatides en développement où elle s'accumule dans la partie postérieur du noyau, du côté opposé à l'acrosome. En face de SUN3 est localisée la protéine nesprine1 dont on ignore l'identité de la protéine partenaire la liant au cytosquelette. La localisation de SUN3 correspond à la zone de contact entre l'enveloppe nucléaire et une structure spécifique de la spermatide, la manchette. Ce qui laisse penser que des complexes LINC composés de protéine SUN3 pourraient être responsables de la jonction manchette – noyau et joueraient ainsi un rôle dans le remodelage du noyau des spermatozoïdes (figure 31) (*Gob et al., 2010b*).

Sun4 aussi appelé Spag4 (sperm associated antigen 4) a été détectée à l'interaction de structure de microtubules spécifiques des spermatides. Chez *D. melanogaster* son homologue se concentre, au cours de la spermatogénèse, au niveau de régions riches en microtubules

et en centrioles associées à l'enveloppe nucléaire. Elle est ainsi nécessaire à la fixation du centriole au noyau de la spermatide (*Jiang et al., 2011*).

Spag4l aussi appelé Sun5 est fortement exprimée au niveau des spermatocytes et dans les spermatides rondes (*Jiang et al., 2011*).

Un nouvel isoforme de la protéine Spag4l a été identifié, l'isoforme Spag4l-2 est une nouvelle protéine spécifique du testicule impliquée dans la biogénèse des spermatides. Les protéines Spag4l/1-2 sont des protéines transmembranaires localisées au niveau apical de la membrane nucléaire des spermatides en développement, en face de l'acrosome. Son rôle supposé est la jonction de l'acrosome au noyau via la thèque périnucléaire grâce à la formation d'un lien avec une protéine KASH liée au cytosquelette qui compose la thèque périnucléaire (*Frohnert et al., 2011*).

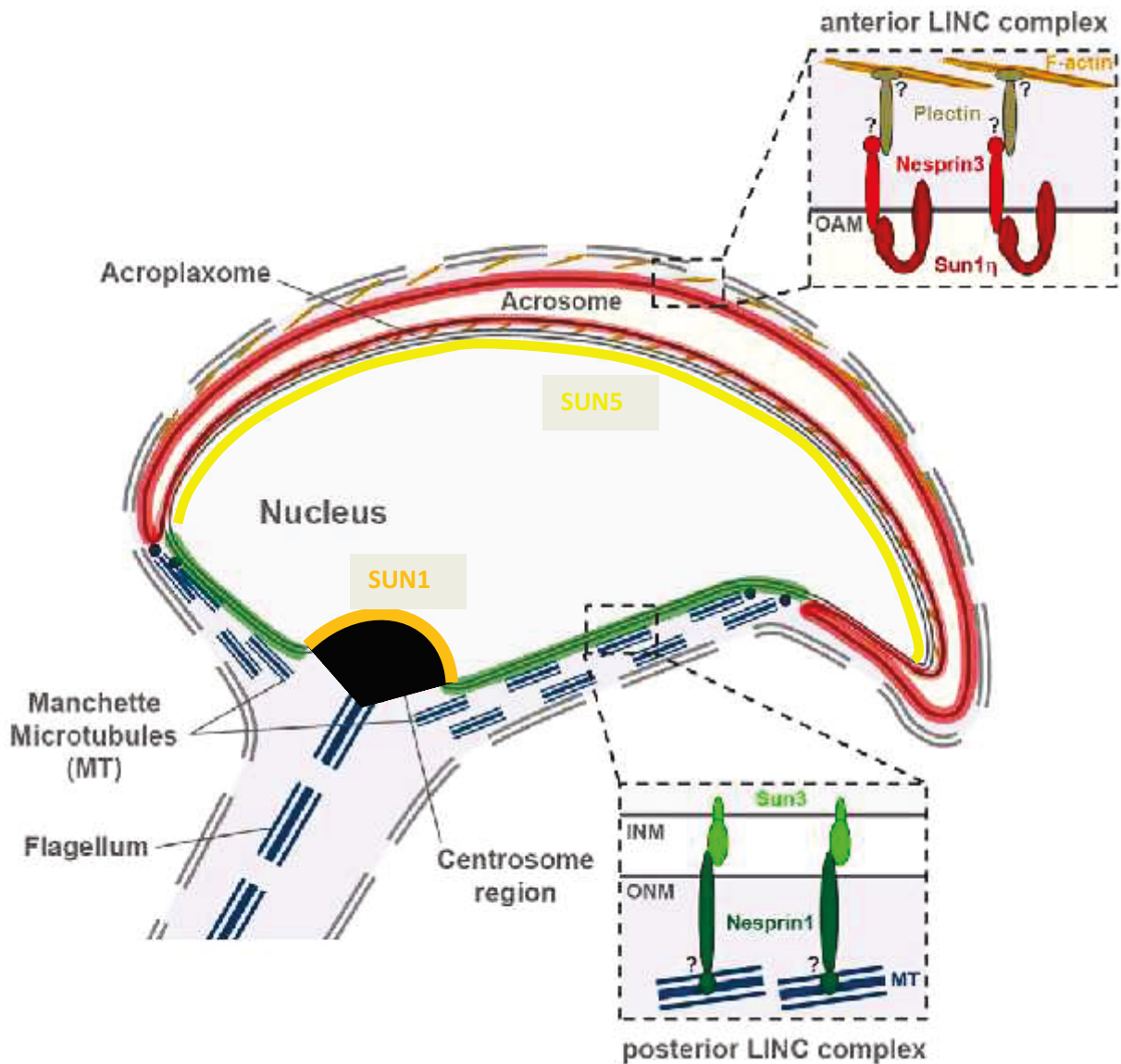


Figure 31: Model illustrant la polarité des complexes LINC au cours de la formation de la tête. D'après (Gob et al., 2010b)

### 1.3.3.3) Les autres rôles des protéines LINC

Les protéines LINC jouent aussi un rôle important dans le développement des cils (*Kyttala et al., 2006*), Syne /Nesprine -2 est ainsi nécessaire à la formation des cils dans les cellules en cultures. Elle interagit avec le centrosome et serait responsable de sa migration. Au cours de la spermiogénèse le mécanisme de développement du flagelle est un mécanisme similaire au développement des cils.

Les protéines LINC jouent encore un rôle crucial après la fécondation, lorsque les pronucléus des deux parents se rencontrent. Chez *C.elegans* la protéine KASH, ZYG-12 et la protéine SUN SUN1/matefin sont essentielles pour la migration des pronucléus. Normalement le pronucléus maternel va à la rencontre du pronucléus paternel en se déplaçant le long de microtubules qui émanent des centrosomes fermement attachés au pronucléus mâle. Chez le mutant *zyg-12*, les centrosomes ne s'attachent pas au noyau et la migration du pronucléus est bloquée.

## **Partie 2**

# **RESULTATS**

## RESULTATS

### ***Article 1. La phospholipase A2 sécrétée de Groupe X diminue la mobilité spermatique chez la souris.***

#### **1) Contexte de l'étude et question scientifique**

Dans l'introduction j'ai détaillé les différentes étapes de la physiologie spermatique que sont la capacitation, l'hyperactivation flagellaire, la réaction acrosomique et la fusion gamétique. Dans chacune de ces étapes, nécessaires à la fécondation en condition naturelle, interviennent des phospholipases. Ces enzymes sont impliquées dans de multiples voies de signalisation, qui sont centrales dans les différentes étapes de la physiologie spermatique. En effet, elles libèrent des messagers secondaires suite à l'hydrolyse de la liaison ester de phospholipides membranaires, qui contrôlent de nombreuses cibles cellulaires comme les canaux calciques, le complexe SNARE, la protéine kinase C (*Kalish et al., 2012*). Parmi toutes ces enzymes différentes, une famille particulière a attiré notre attention, les phospholipases A2 sécrétées (sPLA<sub>2</sub>), car nous nous sommes aperçus au cours d'une étude réalisée précédemment au laboratoire et dont le but était la recherche de nouvelles molécules bioactives sur le spermatozoïde, que les sPLA2 de serpents présentaient des propriétés tout à fait intéressantes (*Escoffier et al., 2010*). De plus, de nombreuses phospholipases A2 sécrétées sont présentes dans le tractus génital mâle (Figure 32) (*Masuda et al., 2004*).

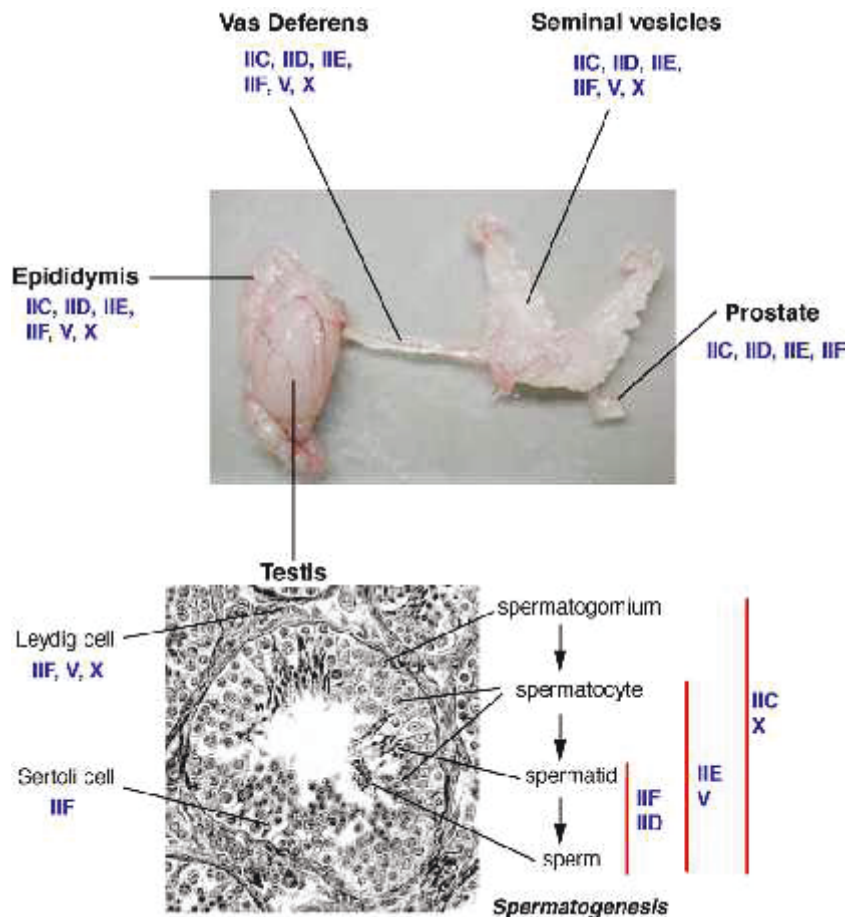


Figure 32: Schéma de la localisation des sPLA2 dans les organes génitaux mâles de souris (Masuda et al., 2004).

Parmi les différentes sPLA2, le laboratoire s'est particulièrement focalisé sur la sPLA2 de groupe X (mGX). Nous avons montré que la sPLA2 mGX est présente dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris. De plus, les sPLA2 sont des inducteurs de la réaction acrosomique. Suite à la réaction acrosomique spontanée de certains spermatozoïdes, elle est donc relâchée dans le milieu extracellulaire qui entoure les spermatozoïdes. La mGX relâchée est capable alors d'induire la RA d'autres spermatozoïdes, ce qui crée une boucle d'amplification pour la réaction acrosomique spontanée et donc augmente in fine la quantité de mGX relâchée. Nous avons ainsi montré que son relâchement est responsable de l'augmentation du taux de réaction acrosomique spontanée après 45 minutes in vitro. Elle joue de plus, des rôles fondamentaux dans le contrôle de la fécondation et le développement embryonnaire précoce. Nous avons ainsi montré, que les souris délétées pour le gène de la sPLA2 mGX présentaient un très faible taux de fécondation in vitro et que le taux de développement embryonnaire en fécondation in vitro suite à l'exposition des spermatozoïdes de souris à la sPLA2 mGX recombinante, après capacitation permettait une amélioration du développement embryonnaire précoce (Escoffier et al., 2010).



Ainsi, les spermatozoïdes au cours de la capacitation sont soumis à des activités enzymatiques de type sPLA2. Nous savons de plus que la mobilité spermatique est fortement dépendante de l'environnement lipidique du flagelle. Il a ainsi été démontré que l'asthénozoospermie humaine était associée à un excès de cholestérol et de desmostérol (*Buffone et al., 2009*); (*Zalata et al., 2009*), une faible concentration d'acides gras comme l'acide docosahéxaénoïque (*Gulaya et al., 2001*); (*Tavilani et al., 2007*) ou une augmentation généralisée du contenu en acide gras (*Ollero et al., 2001*); (*Aksoy et al., 2006*). La problématique était donc de voir si la sPLA2 mGX de souris était capable d'agir sur un autre aspect de la physiologie spermatique, la mobilité flagellaire. J'ai aussi testé d'autres sPLA2 dans cette étude afin de mieux comprendre l'action des sPLA2 sur la mobilité spermatique.

## **2) Méthodologie sur les mesures de la mobilité spermatique**

La mesure de la mobilité spermatique s'effectue à l'aide d'un appareil dédié appelé CASA pour Computer-Assisted Sperm Analysis, et constitué d'une camera fréquentée à 50 Hz, montée sur un microscope et d'un analyseur d'image. Les spermatozoïdes sont filmés par la caméra et les images enregistrées dans un ordinateur puis analysées par un logiciel dédié. Ce logiciel va objectiver le déplacement des spermatozoïdes, en calculant différents paramètres de la mobilité spermatique (figure 33). Seul le déplacement de la tête du spermatozoïde au cours du temps est pris en compte. La trajectoire de la tête fait l'objet d'une analyse précise et les paramètres suivants sont déterminés :

- La VCL : Vitesse curvilinéaire ( $\mu\text{m/s}$ ). C'est la vitesse calculée sur le parcours rouge, qui permet d'évaluer la vitesse absolue.
- La VAP : Vitesse selon la trajectoire moyenne ( $\mu\text{m/s}$ ), calculée sur le parcours noir (VAP), qui permet d'évaluer la vitesse moyenne, tenant compte des déplacements curvilignes.
- La VSL : Vitesse de progression linéaire ( $\mu\text{m/s}$ ). C'est la vitesse moyenne calculée sur le parcours noir (VSL), qui permet d'évaluer la vitesse de progression.
- L'ALH : L'amplitude de déplacement de la tête ( $\mu\text{m}$ ). C'est la distance moyenne entre la position de la tête sur le parcours rouge et sa projection orthogonale sur la courbe VSL. Il permet d'apprécier l'asymétrie du battement flagellaire, qui augmente au cours de la capacitation. C'est donc un paramètre qui augmente au cours de la capacitation.
- La BCF : Fréquence de battement (battement/s). Ce paramètre correspond au nombre de

fois où la courbe rouge coupe la courbe VSL, et est proportionnel à la fréquence de battement flagellaire.

- La MAD : Déplacement angulaire moyen (degrés). Ce paramètre n'est pas utilisé.

Les paramètres sélectionnés pour l'étude sont la VCL, la VAP et l'ALH car ces trois paramètres permettent de suivre les changements du mouvement spermatique au cours de la capacitation.

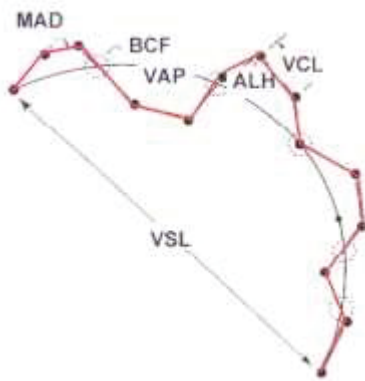


Figure 33: Schéma des paramètres de la mobilité spermatique mesurés par le système CASA. (E Rurangwa, 2013)

### 3) Principaux résultats et discussion

Nous avons testé l'effet de 5 sPLA2 de mammifères sur la mobilité du spermatozoïde : mGIIA, mGIID, mGIIE, mGV et mGX. La seule sPLA2 qui possède une action sur la mobilité spermatique est mGX, celle-ci inhibant la mobilité des spermatozoïdes. Cette inhibition est dépendante de l'activité enzymatique de mGX. Cette activité enzymatique est capable de modifier la composition lipidique du flagelle après la capacitation. Au cours de la capacitation, nous observons une externalisation des phosphatidylsérines au niveau du flagelle, qui disparaît suite à l'exposition des spermatozoïdes capités à la mGX. Ces expériences confirment l'importance de la composition lipidique de la membrane du flagelle dans la mobilité spermatique.

La population spermatique est hétérogène et elle se caractérise par la présence de plusieurs sous populations. Nous avons étudié deux populations qui se distinguent par la vitesse de leur progression, la population lente, caractérisée par une VCL comprise entre 50 et 150  $\mu\text{m/s}$  et une population rapide caractérisée par une  $VCL > 150 \mu\text{m/s}$ . Nous avons montré que le traitement par mGX entraîne une plus forte inhibition de la sous population lente que de

la population rapide. Ce résultat est particulièrement intéressant dans le cadre du rôle de mGX dans la sélection des spermatozoïdes aptes à féconder l'ovocyte. Nous savons que sur les millions de spermatozoïdes déversés dans le vagin, seule une petite dizaine arrivera dans l'oviducte au point de rencontre entre les deux types de gamètes. La première sélection est basée sur la vitesse de mobilité des spermatozoïdes, puisque seuls ceux présentant une mobilité optimale pourront franchir la glaire cervicale. 90% des spermatozoïdes échoueront à cette étape. mGX est présente de façon endogène dans l'acrosome des spermatozoïdes (*Escoffier et al., 2010*) et elle est libérée dans le milieu extracellulaire suite à la réaction acrosomique spontanée d'une sous population de spermatozoïdes. Cette mGX pourrait ainsi participer de manière paracrine à une diminution de la mobilité spermatique des spermatozoïdes les moins aptes à la fécondation.

# Group X Secreted Phospholipase A<sub>2</sub> Specifically Decreases Sperm Motility in Mice

JESSICA ESCOFFIER,<sup>1,2</sup> VIRGINIE J. PIERRE,<sup>1,2,3</sup> IKRAM JEMEL,<sup>4,5</sup>  
LÉA MUNCH,<sup>1,2,3</sup> ZIED BOUDHRAA,<sup>1,2</sup> PIERRE F. RAY,<sup>2,3,6</sup> MICHEL DE WAARD,<sup>1,2</sup>  
GÉRARD LAMBEAU,<sup>4,5</sup> AND CHRISTOPHE ARNOULT<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U836, Grenoble, France

<sup>2</sup>Joseph Fourier University, Grenoble, France

<sup>3</sup>CNRS, FRE3405, Team "Genetic, Infertility and Therapeutic", La Tronche, France

<sup>4</sup>CNRS, UMR6097, Valbonne, France

<sup>5</sup>University of Nice-Sophia Antipolis, France

<sup>6</sup>CHU de Grenoble, UF de Biochimie et Génétique Moléculaire, Grenoble, France

Different mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>s) are expressed in male reproductive organs and/or in sperm cells but their cellular functions are still not fully characterized. Because several reports indicate a link between cellular lipids and sperm motility, we have investigated the effect of mouse group IIA, IID, IIE, V, and X sPLA<sub>2</sub>s on sperm motility. Among these enzymes, only mouse group X sPLA<sub>2</sub> (mGX sPLA<sub>2</sub>) acts as a potent inhibitor of sperm motility that decreases track speed (VCL) and lateral displacement of the head (ALH) of both noncapacitated and capacitated sperm. The inhibitory effect of mGX sPLA<sub>2</sub> is dependent on its enzymatic activity because (i) both the proenzyme form of mGX sPLA<sub>2</sub> (pro-mGX) and the H48Q mutant of mGX sPLA<sub>2</sub> have very weak enzymatic activity and are unable to modulate sperm motility and (ii) LY329722, a specific inhibitor of sPLA<sub>2</sub>s, blocks the inhibitory effect of mGX sPLA<sub>2</sub>. Moreover, mGX sPLA<sub>2</sub> exerts a gradual potency on sperm subpopulations with different velocities, an effect which may be linked to the heterogeneity of lipid composition in these sperm subpopulations. Finally, we found that endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> released during spontaneous acrosome reaction modulates sperm motility of capacitated sperm. Together, our results suggest a new role of sPLA<sub>2</sub> in sperm physiology where the sPLA<sub>2</sub> selects a sperm subpopulation for fertilization based on its effect on sperm motility.

J. Cell. Physiol. 226: 2601–2609, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Asthenozoospermia (sperm with low motility) is one of the major causes of infertility or subfertility in humans. Deciphering the molecular mechanisms and pathways involved in sperm flagellum beat remains a challenging task. Although remarkable progresses have been made with respect to sperm flagellum beat regulations, issues are very complex and control pathways remain poorly characterized. Sperm flagellum beat is complex because the molecular structure of the axonema contains several hundreds of molecules (Escalier, 2006; Eddy, 2007), and even this number could be underestimated (Pazour et al., 2005). Control of flagellum beat is characterized by the importance of phosphorylation/dephosphorylation cycles via protein kinase A (PKA) or tyrosine kinases of numerous structural proteins like dynein chains (Luconi et al., 2004). Calcium and cAMP are key elements controlling PKA activation and play central roles (Esposito et al., 2004; Wang et al., 2007). Calcium is a complex actor since it controls soluble adenylyl cyclase and thus cAMP production (Aoki et al., 1999; Carlson et al., 2007), phosphorylation/dephosphorylation cycles via calmodulin dependent pathways (Marin-Briggiler et al., 2005) and also binds directly to axonema structural component, leading to hyperactivation, a strong modulation of flagellum beat (Suarez, 2008). Interestingly, demembrated sperm or cilia present distinct sensitivity to Ca<sup>2+</sup> or cAMP in comparison to control (Feng et al., 1988; Lansley et al., 1992) and these results suggest that the plasma membrane plays an important role in sperm flagellum beat regulation. Lipids are essential structural components of the plasma membrane which are likely to be important actors of sperm flagellum beat since they are involved in membrane fluidity, membrane potential and represent the precursors for many secondary messengers.

The role of lipid composition of the plasma membrane and of lipid metabolism in sperm motility has been poorly explored so far. A few studies have however suggested that lipid metabolism or sperm lipid content are important for sperm motility. First, human asthenozoospermia has been associated with a defective sperm plasma membrane composition characterized by an excess of cholesterol and desmosterol (Buffone et al., 2009; Zalata et al., 2009), a low concentration of polyunsaturated fatty acids such as docosahexaenoic acid (Gulaya et al., 2001; Tavilani et al., 2007) and an overall increase of fatty acid content (Ollero et al., 2001; Aksoy et al., 2006). These results suggest that lipid composition of the plasma membrane and/or its rearrangement during sperm maturation are important for flagellum beat. Membrane fluidity is directly linked to the lipid composition of

Contract grant sponsor: Agence nationale de la Recherche (ANR).

Contract grant sponsor: Région Rhône-Alpes.

Contract grant sponsor: CNRS.

Contract grant sponsor: INSERM.

Contract grant sponsor: Association pour la Recherche sur le Cancer.

\*Correspondence to: Christophe Arnoult, Grenoble Institute of Neurosciences, INSERM U836, Bâtiment Edmond J. Safra, Université Joseph Fourier-Site Santé, 38706 La Tronche, Cedex, France. E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr

Received 25 April 2010; Accepted 8 December 2010

Published online in Wiley Online Library  
(wileyonlinelibrary.com), 28 December 2010.  
DOI: 10.1002/jcp.22606

the plasma membrane, and any change in lipid composition leads to a change of membrane fluidity which could in turn impact sperm motility. The link between sperm membrane composition and motility is reinforced by the fact that capacitation, the final maturation step of sperm, leads to both major reorganization of the plasma membrane and modification of sperm movement. Cholesterol efflux is the most well-known modification of the plasma membrane and plays a major role in sperm maturation both in vivo and in vitro (Visconti et al., 1999; Travis and Kopf, 2002). Other major lipid changes during capacitation include efflux of desmosterol, changes in sterol sulfates, phospholipids, sphingomyelins, and ceramides (Travis and Kopf, 2002). This remodeling of lipid distribution leads to the formation of membrane microdomains (Gadella and Harrison, 2000; Jones et al., 2007; Gadella et al., 2008). All these events likely contribute to increasing the membrane fluidity by changing lipid packing but also lead to the heterogeneity of the sperm population. Among the different families of lipolytic enzymes involved in these lipid rearrangements (Wang et al., 2004), phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) are good candidates because of their large diversity of action in phospholipid remodeling in a large set of biological situations (Lambeau and Gelb, 2008). The involvement of PLA<sub>2</sub> in sperm motility is reinforced by recent results obtained with knock-out mice where male deficient in group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>β) or mouse group III secreted phospholipase A<sub>2</sub> (mGIII-sPLA<sub>2</sub>) present asthenozoospermia (Bao et al., 2004; Sato et al., 2010).

The PLA<sub>2</sub> superfamily comprises intracellular and secreted PLA<sub>2</sub>s (Schaloske and Dennis, 2006). Intracellular enzymes include Ca<sup>2+</sup>-dependent cytosolic PLA<sub>2</sub>s (group IV), Ca<sup>2+</sup>-independent iPLA<sub>2</sub>s (group VI) and Ca<sup>2+</sup>-independent PAF-acetylhydrolases (group VIII). Secreted PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>s) comprise up to 10 different members classified as group IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, and XIA.

Both intracellular and secreted phospholipases A<sub>2</sub> have been described in mouse male reproductive organs (Koizumi et al., 2003; Yan et al., 2003; Bao et al., 2004; Masuda et al., 2004; Roldan and Shi, 2007). Spermatogenic cells, vas deferens and seminal vesicles express sPLA<sub>2</sub>s of group IIC, IID, IIE, IIF, V, and X; epididymis contains group IIC, IID, IIE, IIF, III, V, and X sPLA<sub>2</sub>s (Sato et al., 2010); prostate expresses group IIC, IID, IIE, and IIF sPLA<sub>2</sub>, and mature sperm specifically express mouse group X sPLA<sub>2</sub> (mGX sPLA<sub>2</sub>) (Sato et al., 2010; Escoffier et al., 2010b). Deciphering the specific roles of each PLA<sub>2</sub> present in male reproductive organs is challenging. Recent studies have revealed new roles for mGIII and mGX sPLA<sub>2</sub>s in sperm maturation. First, mGIII sPLA<sub>2</sub> has been involved in sperm lipid homeostasis in the epididymis and lack of this sPLA<sub>2</sub> leads to defective epididymal maturation, asthenozoospermia and infertility (Sato et al., 2010). Second, mGX sPLA<sub>2</sub> is present in the acrosome of mature sperm and its paracrine secretion during sperm capacitation promotes a premature or spontaneous acrosome reaction (AR) that excludes a suboptimal sperm subpopulation from fertilization (Escoffier et al., 2010b). Third, venom sPLA<sub>2</sub>s from the Australian Taipan snake *Oxyuranus scutellatus* inhibit sperm motility (Escoffier et al., 2010a). These findings led us to evaluate the role of mammalian sPLA<sub>2</sub> in sperm motility. We measured the impact on sperm motility of the mammalian sPLA<sub>2</sub>s which are known to be present in male reproductive organs (Masuda et al., 2004) and in the female tract (Valentin et al., 1999). These include mouse group IIA (mGIIA), mouse group IID (mGIID), mouse group IIE (mGIIE), mouse group V (mGV) and mGX sPLA<sub>2</sub>s. Using recombinant mature enzymes as well as catalytically inactive sPLA<sub>2</sub>s and specific inhibitors, we show for the first time that mouse sperm motility is decreased only by mGX sPLA<sub>2</sub> in an enzymatically-dependent manner. Moreover, we demonstrate that mGX sPLA<sub>2</sub> potency is dependent on sperm velocity and that mGX sPLA<sub>2</sub> is less active on the high

speed sperm subpopulation. Finally, we show that endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> released during capacitation decreases sperm velocity. Altogether, these results reveal a new physiological role for mGX sPLA<sub>2</sub> in the process of sperm sorting.

## Materials and Methods

### Biological preparations

**Sperm preparation.** Sperm cells were obtained by manual trituration of caudae epididymides from OF1 male mice (2–6 months old—Charles River, France). All protocols were reviewed and have been approved by the local ethical committee of Grenoble Institute of Neurosciences. Sperm were allowed to swim in 1 ml of M2 medium for 10 min. Sperm were then centrifugated (600g, 10 min) and resuspended in M16 medium.

**Capacitation and acrosome reaction assay.** Sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid free BSA at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for various times. For sPLA<sub>2</sub> treatment, sperm were incubated with sPLA<sub>2</sub> in M16 medium at 37°C for the last 10 min. Cells were transferred in PBS solution and then fixed with 4% PFA solution for 2 min. Sperm were washed (100 mM ammonium acetate, 2 min), wet-mounted on slides and air dried. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2 min, and finally rinsed. Slides were counted and at least 150 sperm cells were scored.

### Computer-assisted motility analysis

Noncapacitated or capacitated sperm suspension was immediately placed onto an analysis chamber (100 μm depth, Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, the Netherlands) and kept at 37°C for microscopic quantitative study of sperm movement. Sperm motility parameters were measured at 37°C using a sperm analyzer (Hamilton Thorn Research Inc, Beverly MA). The settings employed for analysis were as follows: acquisition rate: 60 Hz; number of frames: 100; minimum contrast: 25; minimum cell size: 10; low static-size gate: 2.4; high static-size gate: 2.4; low static-intensity gate: 1.02; high static-intensity gate: 1.37; minimum elongation gate: 12; maximum elongation gate: 100; magnification factor: 0.70. The motility parameters measured were curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP) and amplitude of lateral head displacement (ALH). At least, 100 motile sperm were analyzed for each assay. Progressive hyperactivated sperm were characterized by VCL > 250 μm/sec, VAP > 70 μm/sec, ALH > 18 μm, LIN < 45 and non-progressive hyperactivated sperm (star spin) by 120 < VCL < 250 μm/sec, VAP < 50 μm/sec and LIN < 30.

Method to trace the theoretical mGX-treated distribution: the sperm subpopulation belonging to the bin  $x \rightarrow y$  will shift to the bin having a velocity of  $((x + y)/2) \times 0.7$ .

### Production of recombinant sPLA<sub>2</sub>s

Recombinant mouse sPLA<sub>2</sub>s group IIA, IID, IIE, V, and X and the H48Q mutant of mGX-sPLA<sub>2</sub> were produced as described previously (Singer et al., 2002; Rouault et al., 2007). Pro-mGX sPLA<sub>2</sub> was produced as for mature mGX sPLA<sub>2</sub> using the pAB3 vector in which the full-length cDNA coding for PromGX sPLA<sub>2</sub> was inserted in frame with the ΔGST protein and the factor Xa cleavage site, which were removed from PromGX sPLA<sub>2</sub> by using the factor Xa protease (Rouault et al., 2007).

### Phospholipids staining/viability test

Control untreated sperm cells (noncapacitated or capacitated for 90 min) or sperm treated for 10 min with 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub> in M16 medium were washed twice with PBS, and then incubated in a staining buffer (from Apoptosis detection kit, Sigma—Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) containing either carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) or 1 μg/ml annexin V-Cy3 for 15 min in the dark at room temperature. After incubation with annexin V-Cy3,

sperm was washed twice with the staining buffer and fixed in PBS with 4% paraformaldehyde. AnnexinV-Cy3 staining was analyzed using a confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

### Chemical compounds

M2 and M16 media, fatty acid free BSA (fraction V) and annexin V-Cy3 (from Apoptosis detection kit) were purchased from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France. LY329722 was a generous gift from Pr. M. Gelb.

### Statistical analyses

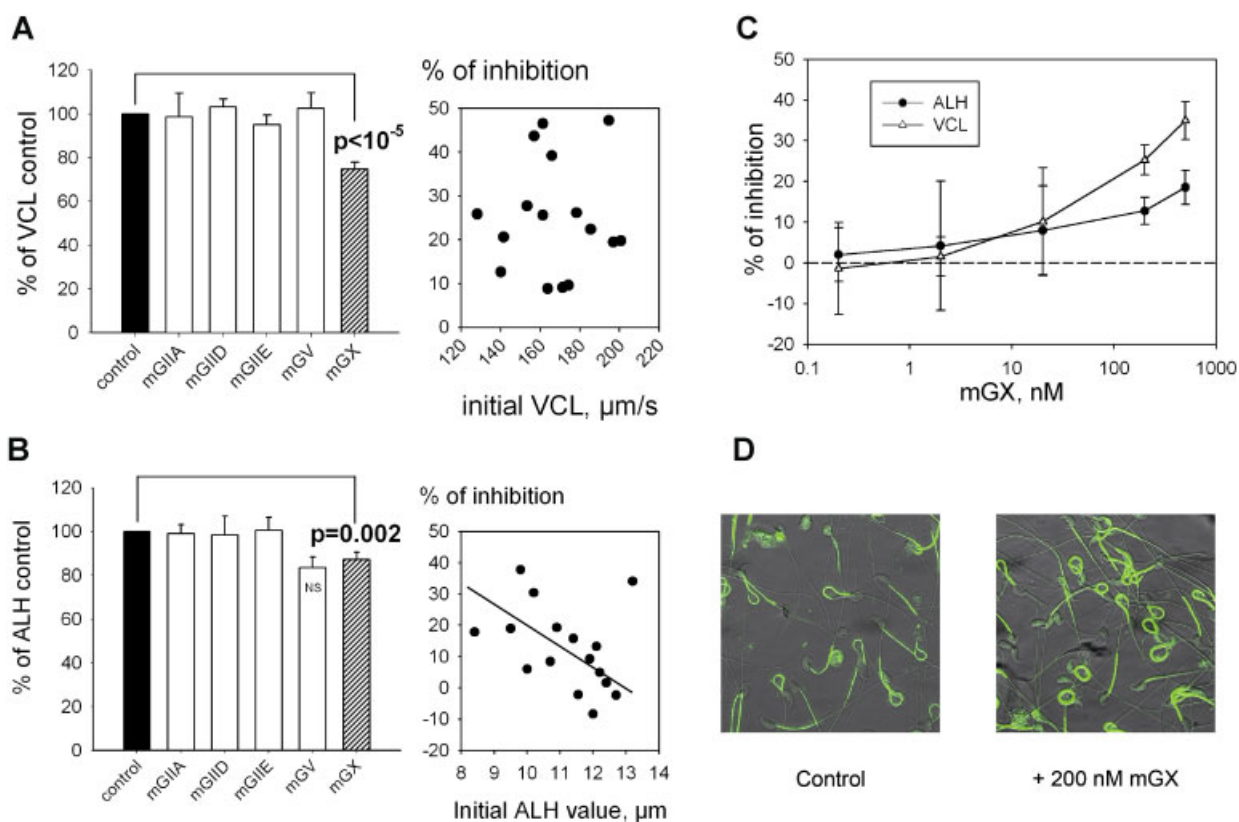
Statistical analyses were performed with SigmaPlot. Paired *t*-test were used to compare the effect of various compounds on AR. Data presented represent mean  $\pm$  SEM. Statistical tests with a two-tailed *P* values  $\leq 0.05$  were considered as statistically significant. Linear regression was calculated with SigmaPlot.

### Results

#### mGX sPLA<sub>2</sub> specifically inhibits sperm motility among five different mouse sPLA<sub>2</sub>s

During its short life, sperm become exposed to several sPLA<sub>2</sub>s, including those present in the seminal plasma and

originating from epididymis and prostate or present in the female genital tract (Valentin et al., 1999; Masuda et al., 2004; Lessig et al., 2008; Sato et al., 2010; Escoffier et al., 2010b). We thus evaluated the effect of five different mammalian sPLA<sub>2</sub>s known to be present in male or female genital tracts on sperm motility using the computer-assisted sperm analysis (CASA) system. These sPLA<sub>2</sub>s are mGIIA, mGIID, mGIIIE, mGV, and mGX. Sperm tracks are characterized with the CASA system by four basic parameters evaluating sperm motility: the track speed (VCL), the progressive velocity (VSL), the path velocity (VAP) and the lateral displacement of the head (ALH). We first focused on noncapacitated sperm and because noncapacitated sperm have mostly linear progressive tracks, only the VCL and the ALH parameters were studied. Sperm were incubated with the 5 different recombinant sPLA<sub>2</sub>s at 200 nM during 10 min in M16 culture medium at 37°C. Figure 1A,B clearly shows that only mGX sPLA<sub>2</sub> was a potent modulator of VCL and ALH: in the presence of 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub>, the mean VCL was decreased by 23%, from  $165.55 \pm 5.44$  ( $n = 19$ ) to  $124.73 \pm 6.65$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  ( $n = 16$ ),  $P < 10^{-4}$  while the mean ALH was decreased by 14%, from  $11.45 \pm 0.35$  ( $n = 19$ ) to  $9.81 \pm 0.54$   $\mu\text{m}$  ( $n = 16$ ),  $P = 0.01$ . The potency of mGX was variable between different males: no correlation between initial VCL values of the sample and the mGX sPLA<sub>2</sub> potency was noticed (Fig. 1A), contrary to ALH



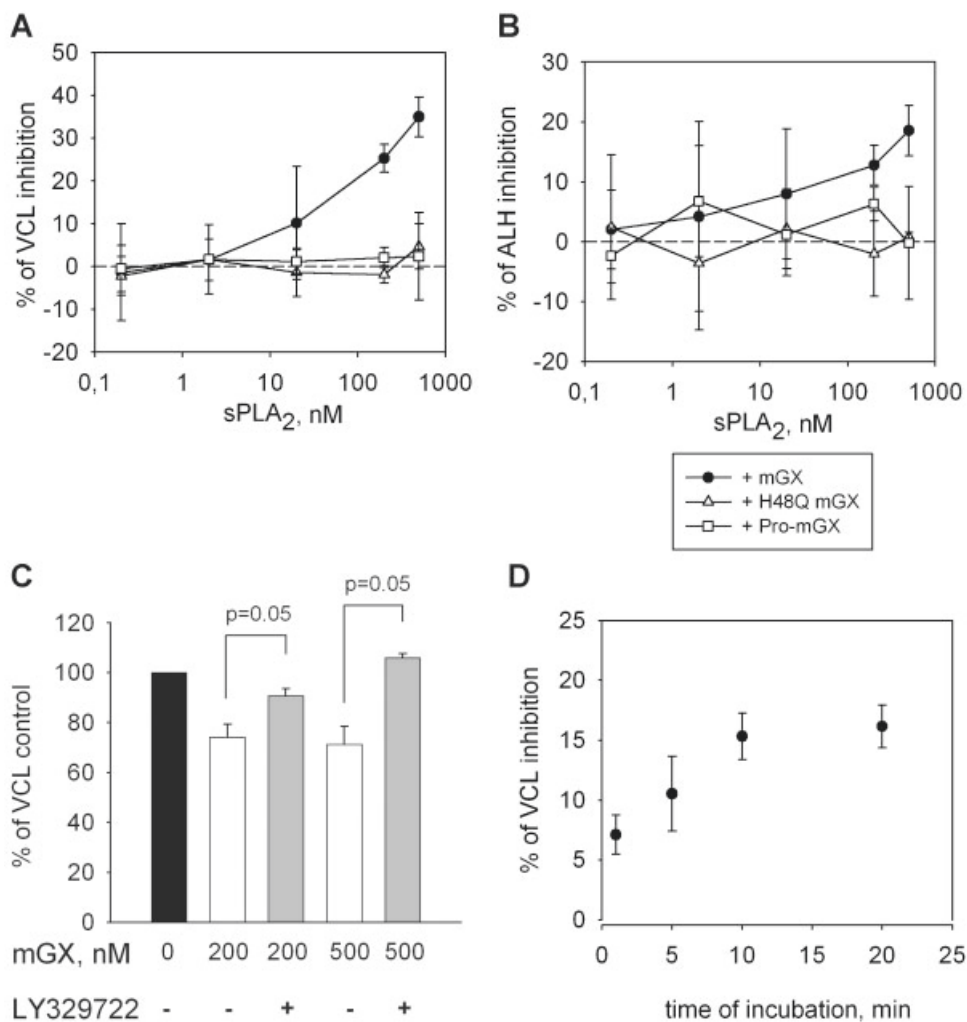
**Fig. 1.** mGX sPLA<sub>2</sub> is the most potent inhibitor of sperm motility among five different mouse sPLA<sub>2</sub>s. **A, B:** The effects of mGIIA, mGIID, mGIIIE, mGV, and mGX sPLA<sub>2</sub>s at 200 nM on sperm motility were analyzed with the Computer Assisted Sperm Analysis system (CASA). Two different sperm motion parameters: “track speed” VCL (**A**) and “lateral displacement of the head” ALH (**B**) are shown. For each sPLA<sub>2</sub>, we compared the values obtained in the presence of the enzyme with those obtained in a control experiment with sperm cells from the same animal;  $n = 16$  for mGX,  $n = 5$  for mGV and  $n = 3$  for mGIIA, mGIID, and mGIIIE sPLA<sub>2</sub>s. The % of inhibition by mGX sPLA<sub>2</sub> (right graphs) was quite variable between the different males, from  $\sim 10\%$  to  $\sim 50\%$  and independent of initial VCL value of the sample. Linear regression is traced for ALH (**B**, right part). **C:** Dose-response curves of mGX sPLA<sub>2</sub> on two different sperm motion parameters ALH ( $\bullet$ ) and VCL ( $\Delta$ ). mGX sPLA<sub>2</sub> concentrations tested were 0.2, 2, 20, 200, and 500 nM. **D:** Sperm viability is not reduced by sPLA<sub>2</sub> treatment. Control or mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm (200 nM), and subsequently incubated with 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA), showed similar strong green fluorescence signal.

values, which appeared to be negatively correlated with control levels (Fig. 1B, correlation coefficient 0.69). In order to better characterize the inhibitory effect of mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm motility, we determined the minimal concentration of mGX sPLA<sub>2</sub> triggering the inhibitory effect in 10 min. Figure 1C shows mGX sPLA<sub>2</sub> dose–response curves for VCL and ALH and indicates that concentrations of mGX sPLA<sub>2</sub> as low as 20 nM affect significantly sperm motility, and more particularly VCL. sPLA<sub>2</sub>, as an enzyme hydrolyzing the lipids of the plasma membrane, may cause a premature cell death, affecting the sperm motility. To test this hypothesis, sperm were first treated with 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub> for 10 min and subsequently incubated with 6-carboxyfluorescein diacetate (6-CFDA) for 15 min. This compound is used as a marker of sperm viability: it enters freely into cells and produces green fluorescence after de-esterification by endogenous esterases only in living cells (Silva and Gadella, 2006). Both control (83.02% ± 1.2, n = 2) and treated sperm (85.42% ± 2.4, n = 2) showed a strong green fluorescence signal (Fig. 1D), indicating that the sperm motility decrease induced by the sPLA<sub>2</sub> was not due to premature cell death during the duration of experiment.

### The effect of mGX sPLA<sub>2</sub> is dependent on its enzymatic activity

To determine whether the enzymatic activity of mGX sPLA<sub>2</sub> is required for modulation of sperm motility, we first analyzed the effect of its H48Q mutant which has a very low enzymatic activity (Surrel et al., 2009). The mGX H48Q mutant was unable to affect sperm VCL (Fig. 2A) or sperm ALH (Fig. 2B). Second, since mGX sPLA<sub>2</sub> is produced as a zymogen (pro-mGX sPLA<sub>2</sub>) which has a very low enzymatic activity (Morioka et al., 2000), we tested the effect of pro-mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm motility and found no change on VCL and ALH (Fig. 2A,B respectively). These results indicate that the enzymatic activity plays a crucial role in the effect of mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm motility. To further confirm these results, we tested the effect of the specific sPLA<sub>2</sub> inhibitor LY329722. This compound is known to inhibit mGX enzymatic activity with an IC<sub>50</sub> of 75 nM (compound A in Smart et al., 2006). Preincubation of mGX sPLA<sub>2</sub> with LY329722 at 1 μM prevented its inhibitory effect on VCL (Fig. 2C).

Finally, we measured the kinetic of VCL inhibition by mGX sPLA<sub>2</sub> at 200 nM. Sperm were incubated with mGX sPLA<sub>2</sub> for



**Fig. 2.** The effect of mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm motility is dependent on its enzymatic activity. **A,B:** The H48Q mutant of mGX sPLA<sub>2</sub> and pro-mGX sPLA<sub>2</sub>, the inactive proenzyme form of mGX sPLA<sub>2</sub> (200 nM) were unable to modulate VCL and ALH sperm motility parameters (n = 3). **C:** LY329722, a specific sPLA<sub>2</sub> inhibitor, blocks the effects of mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm VCL (n = 5, for mGX sPLA<sub>2</sub> at 200 nM and n = 3 for mGX sPLA<sub>2</sub> at 500 nM, p as indicated). **D:** Kinetic of mGX sPLA<sub>2</sub> effect on sperm VCL: at 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub>, the maximal inhibition effect was reached in 10 min (n = 6).

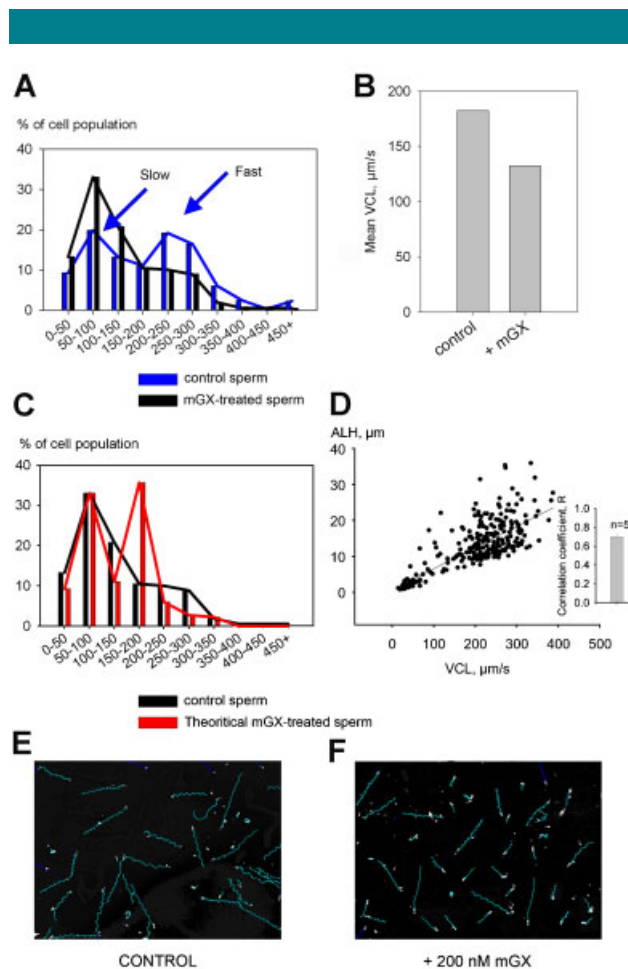
1 to 20 min: the VCL inhibition was proportional to the incubation period up to 10 min, then reached a plateau after 10 min (Fig. 2D). This result reinforces the importance of sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity in sperm velocity decrease and suggests that all substrates were hydrolyzed in 10 min at 200 nM.

### Heterogeneous response of sperm to mGX sPLA<sub>2</sub> treatment

The sperm population presents a high degree of heterogeneity in terms of motility, even in a cell population obtained from a single male. This heterogeneity is displayed by a wide range of VCL and ALH values, indicating different subpopulations of sperm. For instance, values for VCL ranged from 7.5 to 450  $\mu\text{m}/\text{sec}$  in a control cell population (Fig. 3A, blue bars/curve). We noticed the same degree of heterogeneity for ALH, with values ranging between 0 and 40  $\mu\text{m}$  (Fig. 1D). In this study, static sperm cells and slow cells were not counted and only sperm cells with a VAP > 7.5  $\mu\text{m}/\text{sec}$  were analyzed. An important question was to determine whether mGX sPLA<sub>2</sub> inhibits slow (VCL between 50 and 150  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) or fast sperm subpopulations (VCL between 200 and 300  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) with a similar potency (Fig. 3A). To address this question, we first compared the VCL distribution of control and mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm populations, and then the VCL distribution of mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm population versus a theoretical distribution obtained after applying an identical reduction factor for the speed of each bin corresponding to the decrease of mean VCL calculated from the whole population: for this set of experiments we obtained a decrease of 30% (Fig. 3B,  $n = 3$ ). As shown in Figure 3A, adding mGX sPLA<sub>2</sub> modified the VCL distribution of sperm population, essentially by increasing the percentage of sperm with low speed (black bars/curve) and decreasing by a twofold factor the fast sperm subpopulation. We then traced a theoretical VCL distribution mimicking the effect of mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm (Fig. 3C, red bars/line) by applying to all bins of control sperm an identical reduction factor (see Materials and Methods Section) corresponding to the reduction measured on the whole population, which was 30% (Fig. 3B). Comparing the distributions of measured and theoretical mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm clearly shows that the theoretical distribution does not fit with that corresponding to mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm (Fig. 3C, black vs. red curves). A similar discrepancy was observed when the size of the bins was reduced by a twofold factor (Size of 25, data not shown). This result suggests that some sperm subpopulations are differentially affected by the sPLA<sub>2</sub> treatment. In particular, fast sperm were less inhibited by mGX sPLA<sub>2</sub> than expected from the theoretical calculation. Because ALH and VCL amplitudes are correlated (correlation coefficient  $0.6994 \pm 0.025$ ; Fig. 3D,  $n = 5$ ), this result is consistent with our above result showing that mGX-inhibition of ALH appeared to be negatively correlated with its mean initial ALH amplitude (Fig. 1B). The heterogeneity of sperm population is illustrated by the tracks of sperm representing the position of the head of sperm over a period of 1.7 sec measured in control sperm and mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm, respectively (Fig. 3E,F).

### mGX sPLA<sub>2</sub> is involved in phospholipid redistribution at the plasma membrane of the flagellum during capacitation

We have previously demonstrated that endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> is released via spontaneous AR during capacitation, and reaches after 45 min a concentration able to induce AR in a paracrine mode (Escoffier et al., 2010b). This process amplifies spontaneous AR by likely hydrolyzing phospholipids of the sperm plasma membrane right next to the acrosomal membrane. Because mGX sPLA<sub>2</sub> is a potent modulator of



**Fig. 3.** The inhibitory effect of mGX sPLA<sub>2</sub> is stronger on low speed sperm than on high speed sperm. **A:** Sperm velocity is heterogeneous. Histogram of VCL values (in  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) of control sperm (blue bars,  $n = 3$ ; mean sperm counted by condition was 205) and mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm (black bars,  $n = 3$ ; mean sperm counted by condition was 310). For control sperm, VCL values ranged from 0 to 50  $\mu\text{m}/\text{sec}$  to values above 450  $\mu\text{m}/\text{sec}$  (blue bars/line) and allowed to identify slow and fast sperm subpopulations (blue arrows). In the presence of 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub>, we observed a change of sperm VCL distribution (black bars/line), with a twofold decrease of the fast sperm subpopulation. **B:** Bar graph showing a 30% decrease of mean VCL induced by mGX sPLA<sub>2</sub> treatment ( $n = 3$ ). **C:** The VCL distribution of mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm is different from the theoretical mGX sPLA<sub>2</sub>-treated distribution obtained by decreasing the control VCL values of 30% (red bars/line). Thirty percentage corresponds to the decrease of mean VCL in the presence of 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub> (part B). **D:** Positive correlation between ALH and VCL amplitudes. The scatter plot presents the result of the linear regression obtained in a control sperm population. Inset, mean value of correlation coefficient obtained with five independent sperm populations. **E,F:** Effects of mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm tracks (blue lines). Comparison of control sperm tracks (part E) and tracks of sperm incubated with 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub> during 10 min (part F) obtained from the same animal. Note that the length of tracks, which is proportional to the speed of the sperm cell, is more heterogeneous after application of mGX sPLA<sub>2</sub>. Static and slow cells were removed.

sperm motility, we were wondering whether it may target phospholipids of the plasma membrane of the flagellum as well. To address this hypothesis, we first chose to measure the effect of exogenous mGX sPLA<sub>2</sub> treatment on sperm phosphatidylserine distribution because (i) phosphatidylserine is readily hydrolyzed by mGX sPLA<sub>2</sub> (Singer et al., 2002) and (ii) among phospholipids, phosphatidylserine is easily identified because it can be specifically stained by annexin V conjugated



with the Cy3 fluorescent dye. Sperm incubated in a capacitating medium for 35 min present a strong annexin V-Cy3 staining in their midpiece. We thus compared the intensity of annexin V-Cy3 stainings of untreated capacitated sperm and capacitated sperm subsequently incubated with 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub> during 10 min (Fig. 4A). This experiment shows that recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> strongly decreased the annexin V-Cy3 staining of sperm capacitated during 35 min and demonstrates the ability of mGX sPLA<sub>2</sub> to hydrolyze phospholipids of the sperm flagellum membrane.

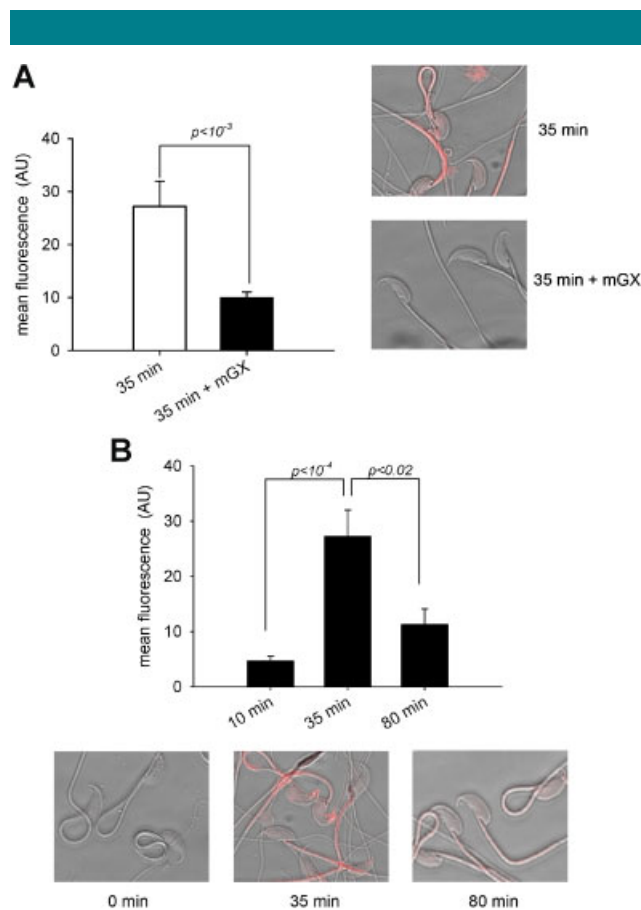
Sperm capacitation leads to important changes in the lipid composition of the plasma membrane (Gadella and Harrison, 2000), including caspase-independent redistribution of phosphatidylserine in the external leaflet of the plasma membrane (de Vries et al., 2003). We confirmed that phosphatidylserine distribution changes during capacitation in our conditions. We observed that annexin V-Cy3 staining was absent or weak on noncapacitated sperm (Fig. 4B). After 35 min of capacitation, the staining was strong and localized mainly in

the midpiece of flagella. On the other hand, sperm heads and principal pieces were weakly or not stained. At 80 min, a decrease in the annexin V-Cy3 staining was observed. This result confirms that capacitation, induced by cholesterol efflux and/or bicarbonate influx, leads to a modification of phospholipid asymmetry, promoting externalization of anionic phospholipids at the plasma membrane of the flagellum and specifies its variation throughout capacitation. The fact that the intensity of annexin V-Cy3 staining decreased between 35 and 80 min of capacitation (Fig. 4B) is in good accordance with both mGX sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity on sperm phospholipids (Fig. 4A) and the increase of mGX sPLA<sub>2</sub> concentration in the capacitation medium after 45 min of capacitation (Escoffier et al., 2010b) and suggests that released mGX sPLA<sub>2</sub> would be able to control sperm motility of capacitated sperm.

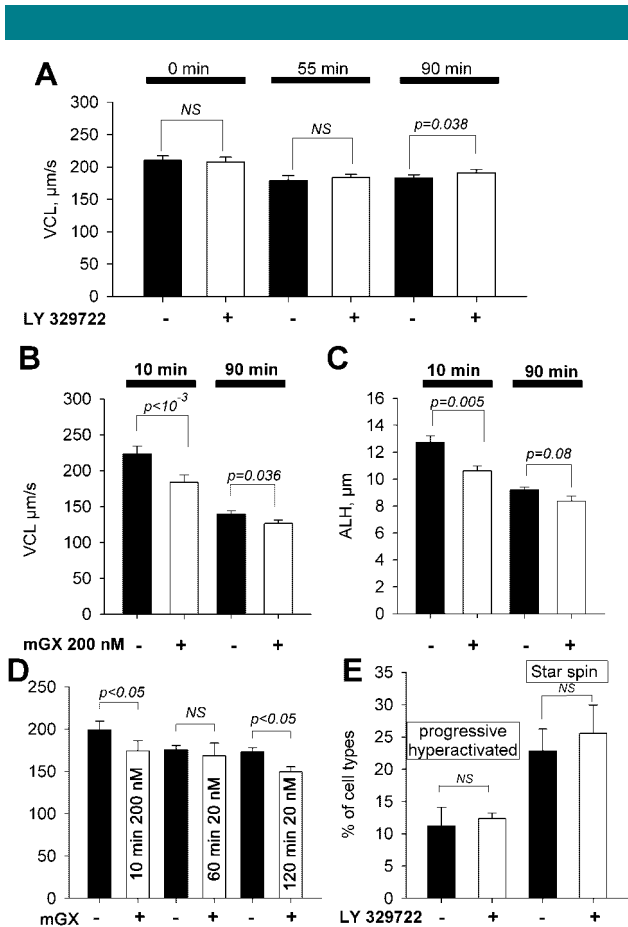
#### Endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> released during spontaneous AR decreases sperm velocity

We thus analyzed whether endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> was able to modulate sperm motility during the capacitation process. To test this hypothesis, we capacitated sperm in the presence of LY329722, the specific inhibitor of mGX sPLA<sub>2</sub> tested in Figure 2C, during various times of capacitation (0, 55, and 90 min) and compared the VCL of LY329722-treated versus non-treated sperm (control). There was no statistically significant difference of the VCL between control and LY329722-treated sperm at 10 and 55 min of capacitation (Fig. 5A). In contrast, sperm treated during 90 min with LY329722 were faster than non-treated sperm: the mean VCL increased from  $182.7 \pm 5.1$  to  $191.1 \pm 5.0$   $\mu\text{m}/\text{sec}$  ( $P = 0.036$ ,  $n = 11$ ) for LY329722-treated sperm and control sperm respectively (Fig. 5A). The fact that LY329722 treatment was effective only at 90 min is consistent with the kinetics of release of endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> during spontaneous AR, as demonstrated previously (Escoffier et al., 2010b).

To confirm that mGX sPLA<sub>2</sub> released during capacitation was able to reduce the sperm velocity, we compared the potency of recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> on the mobility of noncapacitated versus sperm capacitated for 90 min. Indeed, a 10 min application of 200 nM recombinant sPLA<sub>2</sub> on capacitated sperm, a protocol sufficient to obtain a maximal sperm velocity inhibition (Fig. 2D), should produce a weaker inhibition than that obtained with uncapacitated sperm, since the capacitated cells are already partially inhibited by released mGX sPLA<sub>2</sub>. Noncapacitated and capacitated sperm were treated with mGX sPLA<sub>2</sub> in the same conditions: the effect of mGX sPLA<sub>2</sub> on sperm motility was measured after 10 min of incubation in M16 medium. Capacitated sperm were not treated in the capacitating medium (containing 2% fatty acid free BSA) in order to avoid an artefactual effect of BSA, which may chelate lipid metabolites produced by mGX sPLA<sub>2</sub>. Capacitated sperm were thus washed with M16 before mGX sPLA<sub>2</sub> incubation in order to remove BSA. In this set of experiments, mGX sPLA<sub>2</sub> inhibited the VCL of noncapacitated sperm by  $\sim 18\%$ ;  $P < 10^{-3}$ ,  $n = 6$  (Fig. 5B). On the other hand, the velocity of the same sperm, capacitated for 90 min and then treated for 10 min with mGX sPLA<sub>2</sub>, was inhibited by  $\sim 9\%$  ( $P = 0.036$ ,  $n = 6$ ). A similar result showing a decrease of mGX sPLA<sub>2</sub> potency on ALH was observed at 90 min of capacitation (Fig. 5C). These results are in good accordance with the initial release of mGX sPLA<sub>2</sub> and a subsequent phospholipid hydrolysis. Sperm were capacitated at a concentration of 200,000 sperm/ml. We have previously shown that after 90 min of capacitation, the amount of released mGX sPLA<sub>2</sub> is around  $1 \text{ ng}/10^6$  sperm (Escoffier et al., 2010b). Thus, during this experiment, sperm were swimming in a medium containing 0.02 nM of sPLA<sub>2</sub>. This concentration is very low when compared to those used in Figure 1, and thus the effect of LY329722 on sperm motility at 90 min of capacitation



**Fig. 4.** mGX sPLA<sub>2</sub> and capacitation reorganize phosphatidylserine distribution in the midpiece of the flagellum. **A:** Annexin V-Cy3 staining vanished in the presence of 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub>. Sperm were capacitated by incubating them for 35 min in 2% BSA in M16 medium in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. They were then treated for 10 min in the presence of 200 nM sPLA<sub>2</sub>. Mean fluorescence density of the midpiece of sperm was measured (left). Confocal images of representative control and treated sperm are presented (right). **B:** Mean fluorescence density of the midpiece of sperm was measured at various durations of capacitation. Confocal images showing representative annexin V-Cy3 staining of sperm at various durations of capacitation (0, 35, and 80 min), illustrating changes in phosphatidylserine localization throughout capacitation.  $n = 3$  separate experiments, the number of sperm measured by experiment and by condition was from 8 to 38.



**Fig. 5. Endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> released during spontaneous AR decreases sperm motility, but does not modify hyperactivated sperm subpopulations.** **A:** LY329722, a specific inhibitor of mGX sPLA<sub>2</sub>, increased the mean VCL of sperm only after 90 min of capacitation. Sperm were capacitated in the absence or presence of 1  $\mu$ M LY329722. VCL of control (black bars) or LY329722-treated sperm (white bars) were compared at various times of capacitation (0, 55, and 90 min),  $n = 11$ . **B, C:** mGX sPLA<sub>2</sub> potency decreased during capacitation. Mean VCL and ALH of control (black bars) or mGX-treated (200 nM) sperm populations (white bars), before capacitation (0 min, two left bars) or after 90 min of capacitation (90 min, two right bars),  $n = 6$ . **D:** Incubation of sperm with low concentration of mGX sPLA<sub>2</sub> (20 nM) during 120 min produced a similar level of inhibition than the one obtained with 200 nM during a short incubation period of 10 min,  $n = 5$ . **E:** Progressive hyperactivated and star spin sperm subpopulations were not affected by LY329722 treatment ( $n = 4$ ).

suggests that a long incubation (45 min) with a low concentration of mGX sPLA<sub>2</sub> has an effect similar to the one observed after a short application of higher concentrations. This hypothesis was confirmed by comparing the effect of 200 nM mGX sPLA<sub>2</sub> applied during 10 min versus the effect of 20 nM applied either during 60 or 120 min in a medium that does not promote capacitation (Fig. 5D): similar levels of inhibition were obtained at 200 nM during 10 min (12%) or at 20 nM during 120 min (13%),  $n = 5$ .

Finally, capacitation leads to a modification of sperm movements, and a small fraction of sperm switches from a linear movement to a more undulatory movement, and eventually to a circular movement. It is accepted that sperm presenting such movement changes are fully capacitated and are described as progressive and nonprogressive (or star spin) hyperactivated sperm, respectively (Mortimer, 2000). LY329722 treatment did not modify the hyperactivated sperm subpopulations (Fig. 5E)

and this result suggests that released mGX sPLA<sub>2</sub> does not interfere with the capacitation process leading to changes in sperm movements.

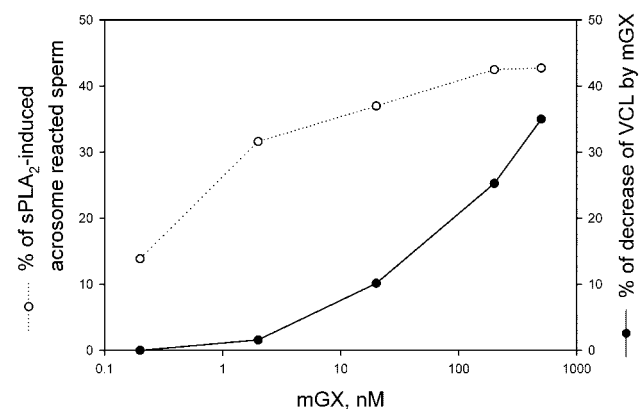
## Discussion

The results presented in this article are important for two reasons. First, they evidence an unexpected role for sPLA<sub>2</sub>s as potent regulators of sperm motility. We found that among five different mouse sPLA<sub>2</sub>s present in male reproductive organs, recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> has the unique property of decreasing sperm motility. Furthermore, endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> released during in vitro capacitation takes part in the control of sperm motility, suggesting that sPLA<sub>2</sub> control of sperm motility is physiologically relevant. Second, our results underscore the importance of phospholipid metabolism in sperm motility as we showed that the effect of mGX sPLA<sub>2</sub> is dependent on its enzymatic activity, that is, the release of different types of fatty acids and lysophospholipids.

## Sperm motility is controlled by mGX sPLA<sub>2</sub>

To our knowledge, this is the first report showing the modulation of sperm motility by an sPLA<sub>2</sub> during capacitation. Platelet activating factor (PAF), a potent lipid mediator, has been shown to increase sperm chemotaxis, but its effect on sperm motility parameters has not been investigated (Wu et al., 2001). Disruption of the gene for the intracellular PLA<sub>2</sub> group VIA (iPLA<sub>2</sub> $\beta$ ) leads to a severe impairment of sperm motility, but the direct contribution of this PLA<sub>2</sub> to sperm flagellum beat has not been demonstrated (Bao et al., 2004). Similarly, disruption of the *Pla2g3* gene (coding for mGIII sPLA<sub>2</sub>) leads to a series of profound defects in sperm maturation, including asthenozoospermia (Sato et al., 2010). These effects appear to be due to maturation defects rather than to a defective control of sperm flagellum beat during capacitation.

We have previously shown that mGX sPLA<sub>2</sub> is a strong inducer of AR (Escoffier et al., 2010b) and an obvious question concerns the relationship between the mGX-induced motility decrease and the modification of the acrosomal status of sperm. In Figure 6, we have plotted on the same graph the dose–response curves for mGX sPLA<sub>2</sub>-induced AR level and sperm motility decrease as a function of mGX sPLA<sub>2</sub> concentrations. It clearly appears that AR did not induce a



**Fig. 6. Absence of correlation between acrosome reaction and decrease of sperm motility induced by mGX sPLA<sub>2</sub>.** Noncapacitated sperm were treated with different concentrations of recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> and both AR ( $\circ$ ) and sperm motility ( $\bullet$ ) were measured. Spontaneous AR was subtracted and only sPLA<sub>2</sub>-induced AR is plotted.

sperm motility decrease since there was not correlation between the two phenomena. The absence of correlation is obvious, especially at low and high concentrations of mGX sPLA<sub>2</sub>. For instance, at 2 nM, the motility was not affected whereas this concentration produced a 30% increase in the number of acrosome reacted sperm.

We have not yet determined the molecular pathways explaining how mGX sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity reduces sperm motility. Since various fatty acids and lysophospholipids, the two products of sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity, can inhibit sperm motility (Hong et al., 1986; Siegel et al., 1986), the effect of mGX sPLA<sub>2</sub> is likely due to the release of such metabolites. Reactive oxygen species (ROS) are produced when sperm are incubated with unsaturated fatty acids (Aitken et al., 2006) and sperm motility is known to be sensitive to oxidative damage (Agarwal et al., 2008). Although the production of ROS by sPLA<sub>2</sub> on sperm remains to be determined, different sPLA<sub>2</sub>s have been involved in ROS production in several cell types (Adibhatla and Hatcher, 2008; Kim et al., 2009). An alternative hypothesis may involve changes of the biophysical properties of proteins embedded in the plasma membrane. Indeed, it has been recently shown that the functions of various membrane proteins, including ion channels, are specifically modulated by different types of lipids via protein–lipid interactions. For instance, the voltage sensor of K<sub>v</sub>2.1 K<sup>+</sup> channels is modulated by charged phospholipids and sphingomyelinase alters the biophysical properties of this channel (Xu et al., 2008). However the fact that LY329722 did not modify hyperactivated sperm subpopulations (Fig. 5D) suggests that mGX sPLA<sub>2</sub> does not interfere with cell signaling involved in hyperactivation, at least in vitro. Hyperactivation is mostly controlled in vitro by calcium signaling (Suarez, 2008) and this result suggests that the mGX sPLA<sub>2</sub> effect is not related to changes in calcium influx.

### Physiological relevance of mGX sPLA<sub>2</sub> action on sperm motility

By using CASA, we identified several subpopulations based on sperm velocity (Fig. 3). Because the CASA system takes a snapshot of the sperm population, the true existence of these subpopulations may still be debated. However, the existence of highly motile sperm subpopulation, sorted by swim-up techniques is well accepted for human sperm (Mortimer and Mortimer, 1992) and we obtained similar results by swim-up techniques with mouse sperm (not shown). This notion of sperm population heterogeneity is clearly illustrated by the histograms of sperm velocity showing the presence of different subpopulations in a single sperm sample. Moreover, we have demonstrated that the different subpopulations are not equally inhibited by mGX sPLA<sub>2</sub>, the slow speed sperm being more sensitive to mGX sPLA<sub>2</sub> treatment. The stronger effect of mGX sPLA<sub>2</sub> on slow sperm may be due to different lipid compositions of the plasma membrane since it has been shown that the heterogeneity of sperm population velocity is associated with a difference in lipid composition of slow versus fast sperm subpopulations (Buffone et al., 2009; Zalata et al., 2009). Although the effect of mGX sPLA<sub>2</sub> on ALH was dependent of its initial amplitude (Fig. 1B), confirming therefore that less motile cells are more affected by mGX sPLA<sub>2</sub>, the absence of correlation between the mGX sPLA<sub>2</sub> potency and the initial VCL amplitude of the sample (Fig. 1A) may appear controversial. However, the reasons for differences of sperm velocity between the different males are likely not exclusively related to lipid composition differences since the flagellum beat is controlled by numerous factors as described at the beginning of this article. Another facet of sperm heterogeneity has been recently described, showing that a fraction of the sperm population is resistant to AR induced by mGX sPLA<sub>2</sub> (Escoffier et al., 2010b). This mGX resistant subpopulation of sperm gives

higher fertility outcome than control sperm in in vitro fertilization experiments, and we have proposed that mGX sPLA<sub>2</sub> may sort different sperm subpopulations presenting different levels of fertility. The fact that high-speed sperm (the likely most competent sperm subpopulation for fertilization) are less sensitive than low speed sperm to sPLA<sub>2</sub> treatment, suggests that mGX sPLA<sub>2</sub> may further contribute to sort competent sperm cells by slowing-down the slow, likely suboptimal sperm, and thus decreasing the chance for these latter to reach oocytes on time for fertilization.

From these results, we can propose that mGX sPLA<sub>2</sub> released by sperm during spontaneous AR may sort competent sperm cells by two ways: first by promoting AR of a specific sperm subpopulation with a low fertility potency and second by decreasing the sperm motility of slow and likely suboptimal sperm.

### Acknowledgments

This work was supported in part by the Région Rhône-Alpes (to C.A.), CNRS (to C.A. and G.L.), INSERM (M.D.W.), and the Association pour la Recherche sur le Cancer (to G.L.). J.E. was supported by a fellowship from Région Rhône-Alpes. V.P., L.M., and Z.B. are supported by a grant from the French ANR (Genopat 2009, ICG2I). We are grateful to Pr. Michael Gelb for the generous gift of LY329722.

### Literature Cited

- Adibhatla RM, Hatcher JF. 2008. Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB Rep* 41:560–567.
- Agarwal A, Makker K, Sharma R. 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am J Reprod Immunol* 59:2–11.
- Aitken RJ, Wingate JK, De Lullis GN, Koppers AJ, McLaughlin EA. 2006. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4154–4163.
- Aksoy Y, Aksoy H, Altinkaynak K, Aydin HR, Ozkan A. 2006. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 75:75–79.
- Aoki F, Sakai S, Kohmoto K. 1999. Regulation of flagellar bending by cAMP and Ca<sup>2+</sup> in hamster sperm. *Mol Reprod Dev* 53:77–83.
- Bao S, Miller DJ, Ma Z, Wohltmann M, Eng G, Ramanadham S, Moley K, Turk J. 2004. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem* 279:38194–38200.
- Buffone MG, Verstraeten SV, Calamera JC, Doncel GF. 2009. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl* 30:552–558.
- Carlson AE, Hille B, Babcock DF. 2007. External Ca<sup>2+</sup> acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol* 312:183–192.
- de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. 2003. Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells. *Biol Reprod* 68:2122–2134.
- Eddy EM. 2007. The scaffold role of the fibrous sheath. *Soc Reprod Fertil Suppl* 65:45–62.
- Escalier D. 2006. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update* 12:449–461.
- Escoffier J, Couvet M, de Pomyers H, Ray PF, Sève M, Lambeau G, De Waard M, Arnoult C. 2010a. Snake venoms as a source of compounds modulating sperm physiology: Secreted phospholipases A2 from *Oxyuranus scutellatus* scutellatus impact sperm motility, acrosome reaction and in vitro fertilization in mice. *Biochimie* 92:826–836.
- Escoffier J, Jemel I, tanemoto A, Taketomi Y, Payne C, Coatrieux C, Sato H, Yamamoto K, Masuda S, Pernet-Gallay K, Pierre V, Hara S, Murakami M, De Waard M, Lambeau G, Arnoult C. 2010b. Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest* 120:1415–1428.
- Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipens RL, van Duin M, Conti M, Gossen JA. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2993–2998.
- Feng B, Bhattacharya A, Yanagimachi R. 1988. Ca<sup>2+</sup> is essential for the motility of plasma membrane-intact, but not of demembrated, hamster spermatozoa. *Andrologia* 20:155–162.
- Gadella BM, Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127:2407–2420.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol* 52:473–480.
- Gulaya NM, Margitich VM, Govseeva NM, Klimashevsky VM, Gorpynchenko II, Boyko MI. 2001. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch Androl* 46:169–175.
- Hong CY, Shieh CC, Wu P, Huang JJ, Chiang BN. 1986. Effect of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, arachidonic acid and docosahexaenoic acid on the motility of human sperm. *Int J Androl* 9:118–122.
- Jones R, James PS, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D. 2007. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J Androl* 9:438–444.
- Kim HJ, Kim KS, Kim SH, Baek SH, Kim HY, Lee C, Kim JR. 2009. Induction of cellular senescence by secretory phospholipase A2 in human dermal fibroblasts through an ROS-mediated p53 pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:351–362.

- Koizumi H, Yamaguchi N, Hattori M, Ishikawa TO, Aoki J, Taketo MM, Inoue K, Arai H. 2003. Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J Biol Chem* 278:12489–12494.
- Lambeau G, Gelb MH. 2008. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *Annu Rev Biochem* 77:495–520.
- Lansley AB, Sanderson MJ, Dirksen ER. 1992. Control of the beat cycle of respiratory tract cilia by Ca<sup>2+</sup> and cAMP. *Am J Physiol* 263:L232–L242.
- Lessig J, Reibetanz U, Arnhold J, Glander HJ. 2008. Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A<sub>2</sub> from human spermatozoa. *Asian J Androl* 10:829–836.
- Luconi M, Carloni V, Marra F, Ferruzzi P, Forti G, Baldi E. 2004. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *J Cell Sci* 117:1235–1246.
- Marin-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, Buffone MG, Herr JC, Vazquez-Levin MH, Visconti PE. 2005. Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* 118:2013–2022.
- Masuda S, Murakami M, Matsumoto S, Eguchi N, Urade Y, Lambeau G, Gelb MH, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. 2004. Localization of various secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in male reproductive organs. *Biochim Biophys Acta* 1686:61–76.
- Morioka Y, Saiga A, Yokota Y, Suzuki N, Ikeda M, Ono T, Nakano K, Fujii N, Ishizaki J, Arita H, Hanasaki K. 2000. Mouse group X secretory phospholipase A<sub>2</sub> induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A<sub>2</sub> receptor. *Arch Biochem Biophys* 381:31–42.
- Mortimer ST. 2000. CASA—Practical aspects. *J Androl* 21:515–524.
- Mortimer D, Mortimer ST. 1992. Methods of sperm preparation for assisted reproduction. *Ann Acad Med Singapore* 21:517–524.
- Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG. 2001. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: Implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 16:1912–1921.
- Pazour GJ, Agrin N, Leszyk J, Witman GB. 2005. Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *J Cell Biol* 170:103–113.
- Roldan ER, Shi QX. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 12:89–104.
- Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH, Lambeau G. 2007. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A<sub>2</sub> to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 46:1647–1662.
- Sato H, Taketomi Y, Isogai Y, Miki Y, Yamamoto K, Masuda S, Hosono T, Arata S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Nakanishi H, Ikeda K, Taguchi R, Hara S, Kudo I, Murakami M. 2010. Group III secreted phospholipase A<sub>2</sub> regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest* 120:1400–1414.
- Schaloske RH, Dennis EA. 2006. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta* 1761:1246–1259.
- Siegel I, Dudkiewicz AB, Friberg J, Suarez M, Gleicher N. 1986. Inhibition of sperm motility and agglutination of sperm cells by free fatty acids in whole semen. *Fertil Steril* 45:273–279.
- Silva PF, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65:958–978.
- Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, Bollinger J, Bezzine S, Rouault M, Sadilek M, Nguyen E, Lazdunski M, Lambeau G, Gelb MH. 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 277:48535–48549.
- Smart BP, Oslund RC, Walsh LA, Gelb MH. 2006. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A<sub>2</sub>: Elucidation of sites for enhanced binding. *J Med Chem* 49:2858–2860.
- Suarez SS. 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update* 14:647–657.
- Surrel F, Jemel I, Boilard E, Bollinger JG, Payre C, Mounier CM, Talvinen KA, Laine VJ, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G. 2009. Group X phospholipase A<sub>2</sub> stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators. *Mol Pharmacol* 76:778–790.
- Tavilani H, Doosti M, Nourmohammadi I, Mahjub H, Vaisiraygani A, Salimi S, Hosseinipanah SM. 2007. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 77:45–50.
- Travis AJ, Kopf GS. 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 110:731–736.
- Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. 1999. On the diversity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J Biol Chem* 274:31195–31202.
- Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: Cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 214:429–443.
- Wang L, Beserra C, Garbers DL. 2004. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization. *Dev Biol* 267:203–215.
- Wang D, Hu J, Bobulescu IA, Quill TA, McLeroy P, Moe OW, Garbers DL. 2007. A sperm-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (sNHE) is critical for expression and in vivo bicarbonate regulation of the soluble adenylyl cyclase (sAC). *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9325–9330.
- Wu C, Stojanov T, Chami O, Ishii S, Shimizu T, Li A, O'Neill C. 2001. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem* 276:26962–26968.
- Xu Y, Ramu Y, Lu Z. 2008. Removal of phospho-head groups of membrane lipids immobilizes voltage sensors of K<sup>+</sup> channels. *Nature* 451:826–829.
- Yan W, Assadi AH, Wynshaw-Boris A, Eichele G, Matzuk MM, Clark GD. 2003. Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7189–7194.
- Zalata A, Hassan A, Christophe A, Comhaire F, Mostafa T. 2009. Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int J Androl* 33:528–535.

## **Article 2. Une délétion récurrente du gène *DPY19L2* est à l'origine d'une infertilité masculine présentant un blocage de l'élongation de la tête du spermatozoïde ainsi que de la formation de l'acrosome.**

### **1) Contexte de l'étude et question scientifique**

La globozoospermie est une infertilité rare, qui touche 1 homme sur 200 000. Elle se caractérise par la présence de spermatozoïdes ayant une tête ronde dépourvue d'acrosome ou présentant des fragments d'acrosome. Les spermatozoïdes sont alors incapables de traverser la zone pellucide qui entoure l'ovocyte et d'être féconds. Les hommes ayant cette maladie sont donc totalement infertiles. Comme il a été vu dans l'introduction, il existe différents types de globozoospermie. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la globozoospermie la plus sévère, la globozoospermie de type 1 qui est caractérisé par 100% des spermatozoïdes présentant une tête ronde totalement dépourvue d'acrosome (**Dam et al., 2007a**). Cette maladie était soupçonnée d'être d'origine génétique puisque sa prévalence dans la population est augmentée dans certaines régions présentant un taux élevé de consanguinité. Le gène *SPATA16* avait ainsi été identifié en 2007 dans une famille dont deux frères présentent cette maladie (**Dam et al., 2007b**). Cependant, dans l'ensemble des autres patients atteints de cette maladie analysés jusqu'à notre étude, aucun autre patient présentant une mutation sur le gène *SPATA16* n'avait été identifié. D'autres gènes devaient donc être impliqués dans cette maladie. Dans le cadre de nos recherches sur les gènes impliqués dans les infertilités, le laboratoire a décidé de se focaliser sur cette pathologie.

### **3) Méthodologie et découverte du gène *DPY19L2***

Le laboratoire a mis en place une stratégie de cartographie de zones d'homozygoties de l'ensemble du génome de patients présentant une infertilité commune et la recherche de zone d'homozygote commune permettant d'identifier le gène impliqué dans cette infertilité. Cette stratégie a permis d'identifier au sein du laboratoire le gène *AURKC* impliqué dans la production de spermatozoïdes ayant une grosse tête et plusieurs flagelles (**Dieterich et al., 2007**) ; (**Ben Khelifa et al., 2011**).

Le laboratoire, en collaboration avec un hôpital tunisien spécialisé dans l'aide à la reproduction médicalement assistée, a identifié un nouveau gène impliqué dans la globozoospermie humaine. Cette étude génétique se base sur le recrutement de patients globozoospermique issus d'une petite région de Tunisie où un fort taux de consanguinité est constaté. Leur ADN a été prélevé par l'hôpital tunisien et l'étude génétique a été réalisée au

sein du laboratoire. Une cohorte de 10 patients a ainsi été étudiée, 9 patients sont Tunisiens dont 6 sont consanguins. Un autre patient d'origine turque utilisé comme contrôle a aussi été intégré à l'étude. Leur ADN a été hybridé sur une puce affimérix comportant 250 000 SNP (*single-nucleotide polymorphism*). Les SNP correspondent à des petites régions variables de l'ADN appelées aussi nucléotides divergents, réparties sur tout le génome. Les SNP sont de l'ordre de plusieurs millions dans le génome tandis que le reste du génome est composé de près de 3 milliards de nucléotides invariants. Les données génétiques des patients ont été ensuite comparées afin d'identifier les régions d'homozygoties. Ces régions d'homozygoties sont héritées et correspondent à une diminution de la diversité génétique, et donc la survenue de maladie génétique autosomique récessive. Une région d'homozygotie sur le chromosome 12 a ainsi été identifiée chez sept des neuf patients. Cette région d'homozygotie porte plusieurs gènes dont le gène *DPY19L2* qui est un gène principalement exprimé dans les testicules, c'était donc un bon gène candidat. En voulant séquencer ensuite ce gène chez ces patients, il est apparu que celui-ci était en fait complètement délété chez les sept patients. Au total vingt patients présentant une Globozoospermie de type 1 ont été analysés et 15 patients sur les 20 présentent une délétion complète du gène *DPY19L2*. C'est jusqu'à présent le seul gène identifié comme responsable de la globozoospermie d'un nombre important de patients.

### 3) Discussion

Le gène *DPY19L2* avait très peu été étudié jusqu'à présent. Seule une étude génétique montrait que des séquences LCR (low copy repeats) sont présentes sur les chromosomes 7 et 12 et encadrent les gènes *DPY19L2*, *DPY19L1* et 6 autres pseudogènes de *DPY19*. Ils ont montré que les séquences LCR étaient responsables de copies du gène *DPY19* ancestral, qui est devenu silencieux chez l'homme et la souris. Ces copies ont donné lieu à 4 gènes fonctionnels chez les Mammifères, les gènes *DPY19L1*, *L2*, *L3* et *L4* ainsi que plusieurs pseudogènes (*Carson et al., 2006*). Dans notre étude nous avons montré que le gène *DPY19L2* est entouré de deux séquences LCR qui permettent la délétion du gène par recombinaison homologue non allélique (figure 34).

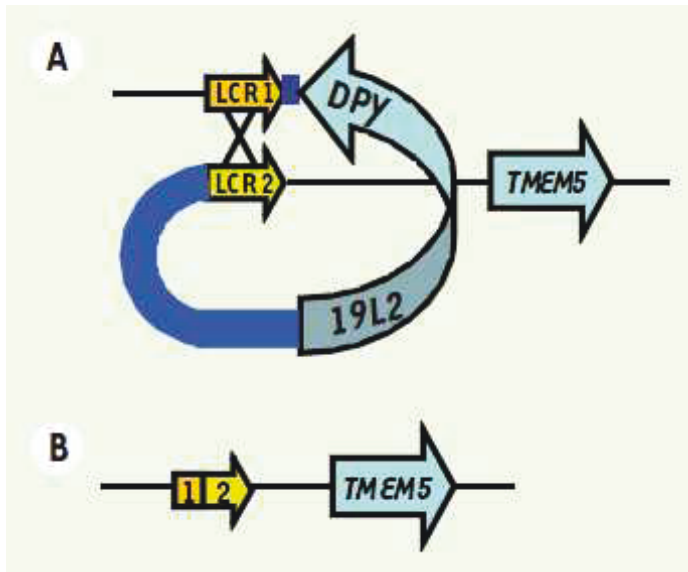


Figure 34: Schéma de la recombinaison homologue non allélique du gène DPY19L2. A) appariement des séquences LCR 1 et 2 et suite à la recombinaison la séquence située entre les deux LCR et contenant le gène DPY19L2 est éliminée. B) Le résultat de cette recombinaison est un locus où le gène DPY19L2 est absent par contre le gène TMEM5 le plus proche de DPY19L2 n'est pas affecté par la recombinaison.

#### 4) Perspectives : compréhension de la pathogénie moléculaire

La découverte de ce nouveau gène pose nécessairement la question du rôle de cette protéine dans la pathogénie moléculaire. Dans cette étude, nous avons aussi étudié le pattern d'expression de la protéine DPY19L2 chez l'homme et chez la souris. La protéine est exprimée dans le testicule, elle n'est pas présente dans les autres organes. Elle n'est pas retrouvée dans le spermatozoïde mature. Ceci laissait supposer qu'elle joue un rôle au cours de la spermatogénèse. Ce travail s'est donc naturellement poursuivi par l'étude de la localisation de cette protéine au cours de la spermatogénèse. Cette étude fait l'objet de l'article suivant.

# A Recurrent Deletion of *DPY19L2* Causes Infertility in Man by Blocking Sperm Head Elongation and Acrosome Formation

Radu Harbuz,<sup>1,2,3</sup> Raoudha Zouari,<sup>4</sup> Virginie Pierre,<sup>2,5</sup> Mariem Ben Khelifa,<sup>1,2,3</sup> Mahmoud Kharouf,<sup>4</sup> Charles Coutton,<sup>1,2,3</sup> Ghaya Merdassi,<sup>6</sup> Farid Abada,<sup>1,2,3</sup> Jessica Escoffier,<sup>5</sup> Yorgos Nikas,<sup>7</sup> François Vialard,<sup>8</sup> Isabelle Koscinski,<sup>9,10</sup> Chema Triki,<sup>11</sup> Nathalie Sermondade,<sup>12</sup> Thérèse Schweitzer,<sup>13</sup> Amel Zhioua,<sup>6</sup> Fethi Zhioua,<sup>6</sup> Habib Latrous,<sup>4</sup> Lazhar Halouani,<sup>4</sup> Marrakchi Ouafi,<sup>4</sup> Mounir Makni,<sup>4</sup> Pierre-Simon Jouk,<sup>1,2</sup> Bernard Sèle,<sup>1</sup> Sylviane Hennebicq,<sup>1</sup> Véronique Satre,<sup>1,2</sup> Stéphane Viville,<sup>9,10</sup> Christophe Arnoult,<sup>2,5</sup> Joël Lunardi,<sup>1,3,5</sup> and Pierre F. Ray<sup>1,2,3,\*</sup>

An increasing number of couples require medical assistance to achieve a pregnancy, and more than 2% of the births in Western countries now result from assisted reproductive technologies. To identify genetic variants responsible for male infertility, we performed a whole-genome SNP scan on patients presenting with total globozoospermia, a primary infertility phenotype characterized by the presence of 100% round acrosomeless spermatozoa in the ejaculate. This strategy allowed us to identify in most patients (15/20) a 200 kb homozygous deletion encompassing only *DPY19L2*, which is highly expressed in the testis. Although there was no known function for *DPY19L2* in humans, previous work indicated that its ortholog in *C. elegans* is involved in cell polarity. In man, the *DPY19L2* region has been described as a copy-number variant (CNV) found to be duplicated and heterozygously deleted in healthy individuals. We show here that the breakpoints of the deletions are located on a highly homologous 28 kb low copy repeat (LCR) sequence present on each side of *DPY19L2*, indicating that the identified deletions were probably produced by nonallelic homologous recombination (NAHR) between these two regions. We demonstrate that patients with globozoospermia have a homozygous deletion of *DPY19L2*, thus indicating that *DPY19L2* is necessary in men for sperm head elongation and acrosome formation. A molecular diagnosis can now be proposed to affected men; the presence of the deletion confirms the diagnosis of globozoospermia and assigns a poor prognosis for the success of in vitro fertilization.

The increasing incidence of infertile couples, potentially caused by a general deterioration of sperm parameters, is becoming a major concern worldwide.<sup>1</sup> Although environmental or infectious causes play an important role in infertility, genetic defects are also believed to be frequently involved in the pathological process.<sup>2</sup> Several hundred genes are believed to be involved in spermatogenesis, yet very few have so far been directly connected with male infertility in human. A better understanding of gametogenesis through the identification of genes involved in infertility can help to decrease this worrying trend. We investigated patients with globozoospermia (MIM 102530) to identify genes involved in this infertility syndrome. Globozoospermia is a rare phenotype of primary male infertility characterized by the production of a majority of round-headed spermatozoa without acrosome (Figure 1, for review see<sup>3</sup>). The phenotype was described over 30 years ago, and familial cases pointed to a genetic component for this defect.<sup>4–7</sup> Three brothers affected with total globozoospermia were recently

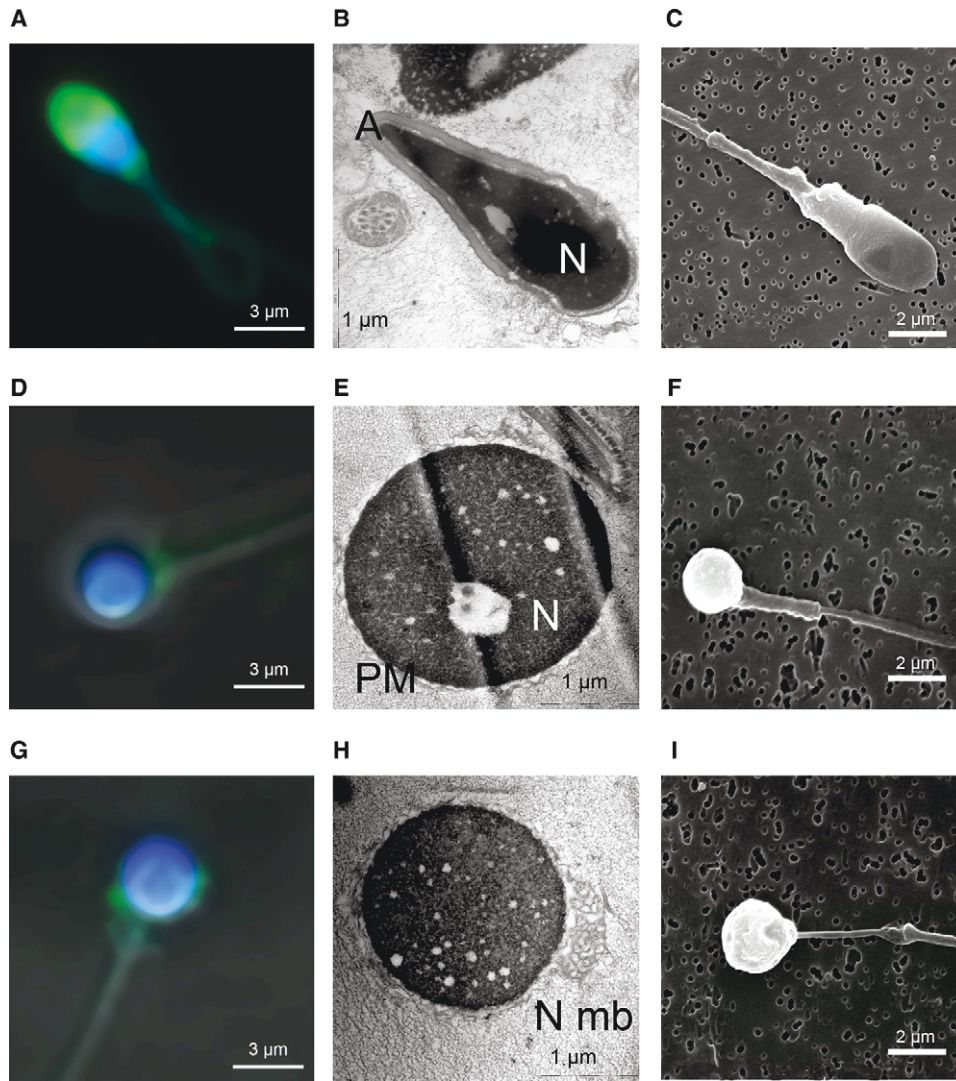
analyzed and found to carry a homozygous mutation of *SPATA16* (MIM 609856).<sup>8</sup> The testicular expression of *SPATA16* and its intracellular localization in the acrosome-building Golgi vesicles in the spermatids correlated well with the observed phenotype.<sup>9,10</sup> However, no *SPATA16* mutations were detected in 29 other affected men, thus suggesting that *SPATA16* was not the main locus associated with globozoospermia.<sup>8</sup> We recently demonstrated that the strategy of using whole-genome homozygosity mapping applied to infertile patients from the same ethno-geographical background presenting with a specific morphologic anomaly of the sperm could lead to the localization and identification of genes involved in spermatogenesis.<sup>11</sup> We demonstrated that *AURKC* (MIM 603495) deficiency led to male infertility due to the production of large-headed, multiflagellar, polyploid spermatozoa (MIM 24306).<sup>12,13</sup> Here, we applied the same genetic strategy to a cohort of mainly Tunisian patients presenting with total globozoospermia, and we were able to demonstrate that 15 of the 20 patients that we analyzed

<sup>1</sup>Faculté de Médecine-Pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier, Domaine de la Merci, 38706 Grenoble, France; <sup>2</sup>Laboratoire AGIM, FRE 3405 CNRS - UJF, Equipe Génétique Infertilité et Thérapeutique (GIT), Domaine de la Merci, 38706 Grenoble, France; <sup>3</sup>UM de Biochimie et Génétique Moléculaire, DBTP, CHU de Grenoble, 38700 Grenoble, France; <sup>4</sup>Clinique de la Reproduction les Jasmins, 23, Av. Louis BRAILLE, 1002 Tunis, Tunisia; <sup>5</sup>Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U836, BP170, 38042 Grenoble, France; <sup>6</sup>Unité de Procréation Médicalement Assistée, Hôpital Aziza Othmana, 1004 Tunis, Tunisia; <sup>7</sup>Athens Innovative Microscopy Skra 36, Voula 16673, Greece; <sup>8</sup>Department of Reproductive Biology, Centre Hospitalier Poissy Saint Germain, 78300 Poissy, France; <sup>9</sup>Service de Biologie de la Reproduction, Centre Hospitalier Universitaire, Strasbourg F 67000 France; <sup>10</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM) U964/Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) UMR 1704/Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France; <sup>11</sup>CMRDP, 5, rue Ibn Hazem, 1002 Tunis Beledère, Tunisia; <sup>12</sup>Histologie Embryologie Cytogénétique CECOS, CHU Jean Verdier, 93143 BONDY, France; <sup>13</sup>Centre d'AMP, Hôpital Maternité de Metz, 1/5 Place Sainte Croix, 57045 Metz, France

\*Correspondence: pray@chu-grenoble.fr

DOI 10.1016/j.ajhg.2011.02.007. ©2011 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.





**Figure 1. Sperm Head Is Round and the Acrosome Is Absent or Atrophied and Misplaced in Globozocephalic Spermatozoa**

Panels (A–C) show control spermatozoa, (D–F) show globozocephalic spermatozoa with no acrosome, and (G–I) show globozocephalic spermatozoa with atrophied and misplaced acrosome.

(A, D, G) Confocal microscopy. Sperm were double stained with TopRo3 (blue), for evidencing the nucleus, and with lectins from *Pisum sativum* conjugated to fluorescein isothiocyanate (PSA-FITC, Sigma Aldrich, France) (green), for evidencing the acrosome. In control sperm, the acrosome is displayed as a bell surrounding the tip of the sperm head (A). In globozocephalic sperm, the acrosome is absent (D) or atrophied and misplaced (G). Lectin from PSA-FITC was used to label the acrosomal matrix, and TopRo3 was used to label the nucleus. Slide cells were washed in PBS and fixed in 4% PFA for 30 min on ice. Fixed spermatozoa were washed in PBS for 3–5 min and incubated with PSA-FITC (10 µg/ml in PBS). Slides were analyzed on a Leica TCS-SP2 (Mannheim, France) confocal laser scanning microscope.

(B, E, H) Electronic microscopy. The different organites, acrosome (A), and nucleus (N) of control sperm are clearly identified (B). In globozocephalic sperm, the acrosome is absent and the plasma membrane (PM) surrounds the nucleus (E). In some cells, redundant nuclear membrane (N Mb) is clearly evidenced (H). Sperm cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer of pH 7.4 for 2 hr at room temperature. Cells were washed with buffer and postfixated with 1% osmium tetroxyde in the same buffer for 1 hr at 4°C. Ultrathin sections of the cell pellet were cut with an ultramicrotome (Leica, Nanterre, France) after dehydration and epon inclusion. Sections were poststained with 4% uranyl acetate and 1% lead citrate before being observed in a 80 kV electron microscope (JEOL 1200EX).

(C, F, I) Scanning microscopy. The surface of control sperm appears smooth (C), whereas that of globozocephalic spermatozoa appears wrinkled (F) and with a probable remnant of atrophic acrosome (I). Transmission electron microscopy was performed as detailed previously.<sup>12</sup>

had a homozygous deletion encompassing only *DPY19L2*, therefore indicating that its absence induces the investigated phenotype. This work was previously presented orally,<sup>14</sup> and a patent describing processes for the diagnosis

of globozoospermia and the use of *DPY19L2* inhibitors to achieve male contraception has been filed.<sup>15</sup>

A total of 20 globozoospermic patients were recruited. All sperm analyses were performed at least twice, in

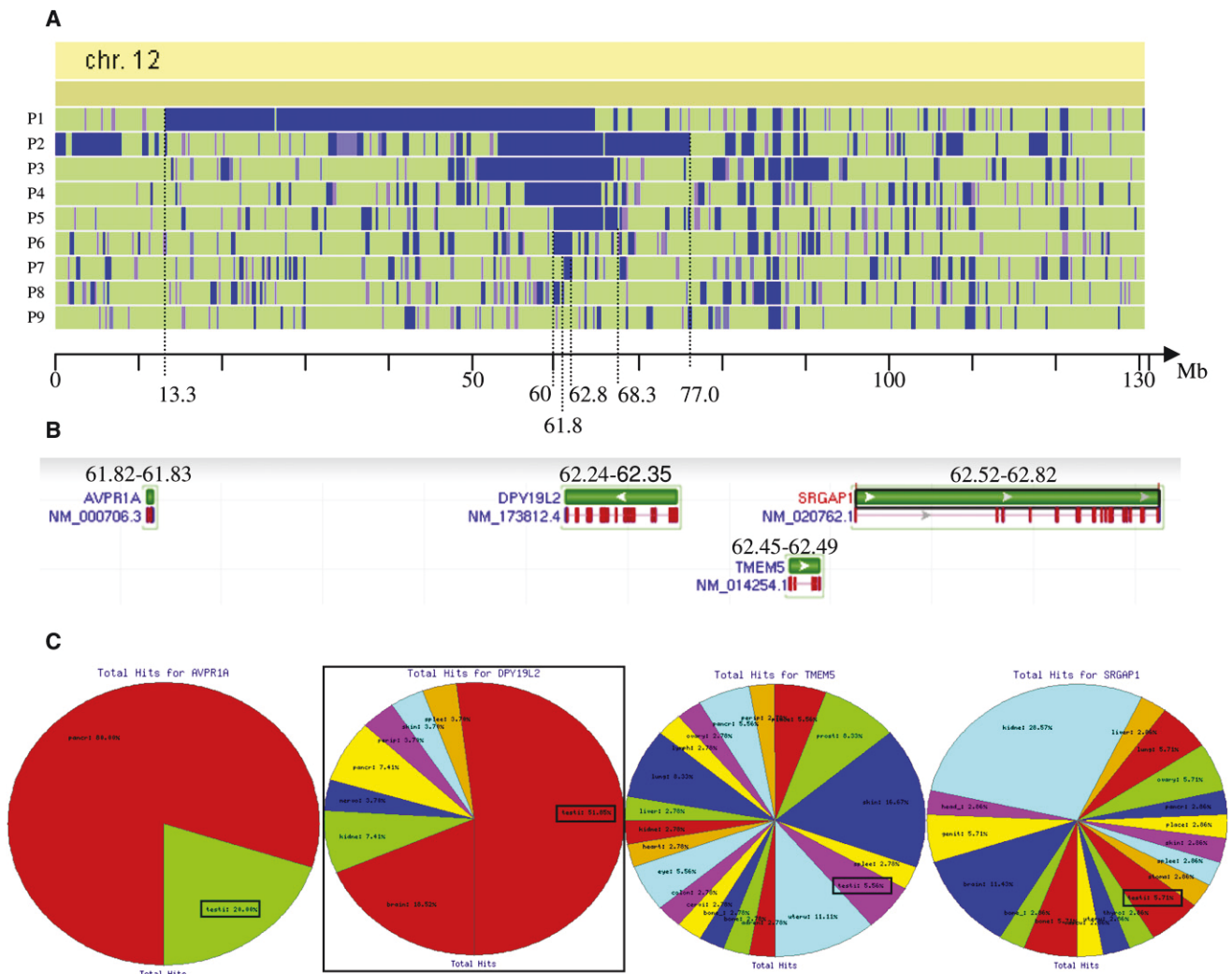
**Table 1. Patient Information According to Genetic Status**

Patients	Region of Homoz.	Sperm Parameters					MAI	Country of Origin	Parents' Relation	Affected Siblings	DPY19L2
		Volume (ml)	Conc. (M/ml)	% Globo	Cells (M/ml)	Motility					
P1	13,344–62,370	4	100	100	3,8	35	2,56	Tunisia	first cousins	0/1	deleted
P2	53,622–77,064	7	95	100	2	30	2,58	Tunisia	first cousins	3/6	deleted
P3	51,030–67,271	4,5	89	100	16	40	NA	Tunisia	first cousins	0/4	deleted
P4	57,021–63,398	3,5	52	100	6	23	NA	Tunisia	third cousins	0/0	deleted
P5	60,521–68,314	4,5	0,02	100	0,1	1	NA	Algeria	third cousins	3/3	deleted
P6	60,521–62,637	2,7	154	100	3	25	2,46	Tunisia	none	2/4	deleted
P6b	NA	7,5	126	100	3	25	NA	Tunisia	none	2/4	deleted
P9	none	3,2	64	100	4	30	2,62	Tunisia	first cousins	0/2	deleted
P10	NA	2,3	32	98	NA	40	2,06	Morocco	NA	NA	deleted
P11	NA	3,5	36,5	100	0,6	20	3	Tunisia	none	0/3	deleted
P12	NA	1,7	0,6	100	1,7	3	3	Tunisia	none	0/2	deleted
P13	NA	1,4	108	100	1,2	23	3	Tunisia	first cousins	0/2	deleted
P14	NA	2,9	18	100	NA	38	NA	Morocco	NA	NA	deleted
P15	NA	2,7	25,2	94	NA	30	NA	Tunisia	NA	NA	deleted
P16	NA	2	41	100	NA	20	NA	Tunisia	NA	NA	deleted
average		3,6	62,8	99,5	3,8	25,5	2,7				
P7	61,770–62,815	6	1,4	99	1,5	5	2,91	Turkey	first cousins	1/1	nondel.
P8	none	3	0,04	100	0,5	1	NA	Tunisia	first cousins	1/2	nondel.
P17	NA	3	14	100	0,4	50	3,1	Tunisia	NA	NA	nondel.
P18	NA	2,7	25,2	86	NA	30	1,88	Tunisia	NA	NA	nondel.
P19	NA	4,7	8	64	NA	20	2,31	Slovenia	NA	NA	nondel.
average		3,9	9,7	89,8	0,8	21,2	2,6				

MAI, multiple anomalies index. Genetic status: *DPY19L2* deleted ( $n = 15$ ) or not deleted (nondel.;  $n = 5$ ). Region of Homoz. indicates, for the patients analyzed by microarray (P1–P9), the extent of the region of homozygosity around *DPY19L2* on chromosome 12 (NCBI36/hg18). Vol. indicates the volume of the ejaculate; Conc. indicates the number of spermatozoa in million per ml (M/ml); % Globo indicates the percentage of globozoosperm in the ejaculate; Cells indicates the concentration of nonsperm cells in the ejaculate (leukocytes or nondifferentiated germ cells); Motility is the percentage of motile spermatozoa with rapid (a) or slow (b) progression, 1 hr after ejaculation. Affected Siblings indicates the number of affected brothers (excluding the patient investigated) out of the total number of brothers. NA indicated values that were not available.

accordance with the World Health Organization recommendations.<sup>16</sup> All subjects showed typical globozoospermia (Figure 1, Table 1) with close to 100% globozoospermic cells. The study was approved by local ethics committee, all patients gave written informed consent, and national laws and regulations were respected. All subjects had a normal somatic karyotype. None of the patients were related apart from patient 6 (P6) and P6b, who were brothers. Most patients originated from Tunisia, and only two patients did not originate from North Africa (Table 1). The parents of nine patients were related; most of them were first cousins. The homogeneity of the origin of the patients and their frequent consanguinity increased the chances of success of this homozygosity mapping study. Whole-genome analysis was carried out on nine patients (P1–P9) with the use of Affymetrix 250K StyI SNP arrays. Common regions of homozygosity were searched for with the ho-

moSNP software. Seven patients shared a homozygous region ranging from 49 Mb to 1 Mb, centered on 12q14.2 (Figure 2A). The other regions of shared homozygosity identified elsewhere in the genome involved smaller genomic regions and concerned a maximum of four patients. We thus focused on the 12q14.2 region and analyzed the smallest common region of homozygosity defined by patient 7 (Figure 2A and Table 1). Four genes were localized in this region (Figure 2B), of which only one, *DPY19L2*, was described to be highly expressed in the testes. Furthermore, although there was no known function for *DPY19L2* in human, previous work indicated that *DPY-19*, its ortholog in *C. elegans*, was involved in the establishment of cell polarity in the worm,<sup>17</sup> a function coherent with the failure to achieve sperm head elongation that was observed in our patients. PCR amplification of three *DPY19L2* exons was carried out for nine



**Figure 2. Identification of the Best Candidate Gene by Homozygosity Mapping**

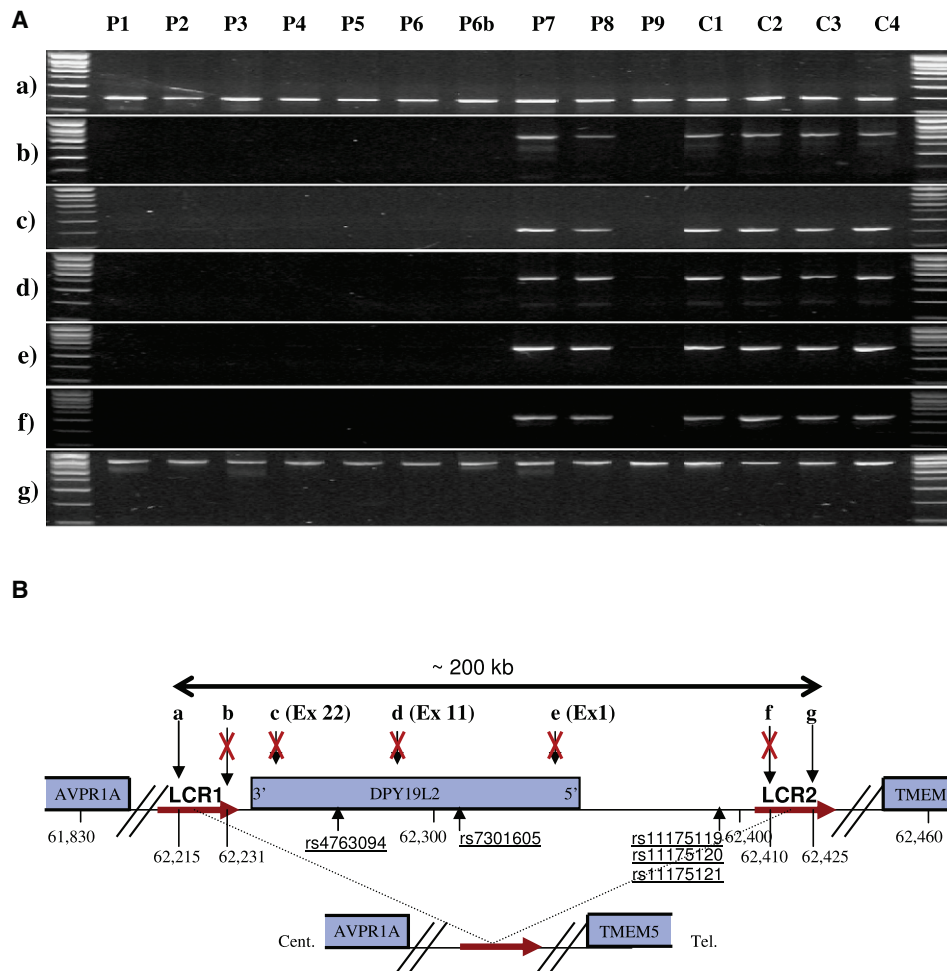
(A) Schematic representation of regions of homozygosity on chromosome 12 for globozoospermic patients P1–P9. Data were obtained with a GeneChip Mapping 250K StyI SNP Array from Affymetrix (Santa Clara, CA) in accordance with the manufacturer's recommendations. The analyses were carried out at the IGBMC (Strasbourg) Microarray and Sequencing Platform. The graphic representation is a view from homoSNP, developed by F. Plewniak of IGBMC, Strasbourg (software available on request from plewniak@igbmc.u-strasbg.fr). Regions of homozygosity greater than 45 SNPs are shown in blue. The entire chromosome 12 is represented, with the physical localization indicated at the bottom (NCBI36/hg18). Seven of nine patients have a region of homozygosity > 1 million bp centered around 62 Mb on chromosome 12.

(B) Identification of all the genes localized in the smallest common region of homozygosity of P7, between 61.8 Mb and 62.8 Mb. Representation from the NCBI Nucleotide database.

(C) Expression profile of the four genes present in the candidate region as obtained from the geneHub-GEPIS database, showing that *DPY19L2* is expressed preferentially in the testis and that testis expression is marginal in the three other genes.

genotyped patients plus P6b, P6's affected brother who had not been genotyped. The results showed that all patients except P7 and P8 had a homozygous deletion of *DPY19L2* (Figure 3A). PCR primers and the specific annealing temperatures used to amplify the different exons and loci are listed in Table S1 (available online). Ironically, P7, who presented the smallest region of homozygosity used to localize (and identify) the gene defect, was without the deletion and might present a "by chance" region of homozygosity centered on *DPY19L2*. Ten additional patients were analyzed, and seven of them also showed a homozygous deletion (Table 1). Subsequent amplifica-

tions on each side of the gene allowed us to pinpoint the two breakpoint zones to a 15 kb region included in two 28 kb low copy repeat (LCR) sequences with 97% identity, located on each side of *DPY19L2* (Figure 3B). The deletion encompasses approximately 200 kb, harboring only *DPY19L2*. The same breakpoint localization could be observed for all 15 patients with the deletion. Agilent 180K comparative genomic hybridization (CGH) was carried out on P1. The analysis confirmed the presence of the homozygous deletion including *DPY19L2* (Figure 4). The minimal deleted region spanned 22.3 kb, corresponding to a breakpoint ranging from 62,342,196 to 62,364,496



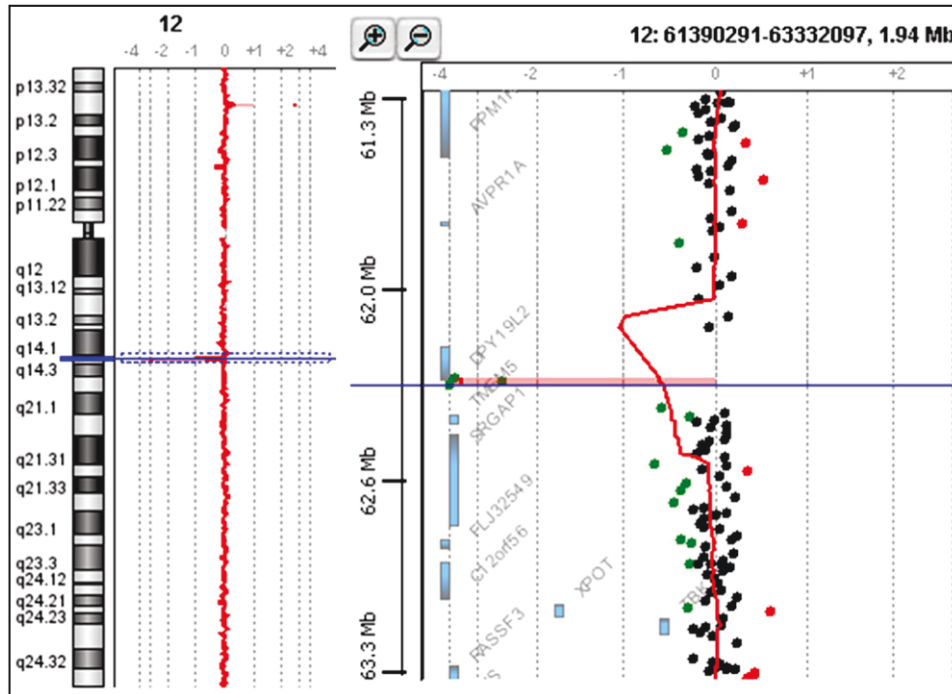
### Figure 3. Characterization of a Large Homozygous Deletion Encompassing Only *DPY19L2* in Eight of Ten Patients

(A) Seven loci (a–g) localized on and around *DPY19L2* were amplified from ten patients with globozoospermia (P1–P9, including P6b) and four fertile controls (C1–C4). All of the tested loci yielded good PCR amplification from fertile individuals, whereas in eight of the ten globozoospermic patients there was no amplification of any of the intragenic loci (exons 1, 11, and 22) or of extragenic loci (b and f). Genomic DNA was extracted either from peripheral blood leucocytes with the use of a guanidium chloride extraction procedure or from saliva via an Oragene DNA Self-Collection Kit (DNAgenotech, Ottawa, Canada). PCR primers with their specific annealing temperatures and exact genomic localization are listed in Table S1. Thirty-five cycles of PCR amplification were carried out with the use of Taq DNA polymerase (QIAGEN, Courtaboeuf, France).

(B) Schematic representation of the analyzed region with the position of the amplified loci (in kb). (a and b) Loci are localized approximately 25 kb and 9 kb 3' of *DPY19L2*, respectively; (c), (d), and (e) show the position of *DPY19L2* exons 22, 11, and 1, respectively; and (f) and (g) loci are localized approximately 62 and 77 kb 5' of *DPY19L2*. LCRs 1 and 2 (red arrows) represent two 28 kb duplicated sequences showing 97% sequence identities located on each side of *DPY19L2*. PCR results in (A) indicate that the centromeric breakpoint is located between loci (a) and (b) (16 kb) within LCR 1 and the telomeric breakpoint between loci (f) and (g) (15 kb) within LCR 2. The deleted region encompasses a maximum of 210 kb, containing only one gene: *DPY19L2*.

(NCBI36/hg18). Analyzing copy-number variant (CNV) databases, we saw that the *DPY19L2* region was referenced as a CNV and that duplications and heterozygous deletions had been detected in all tested ethnic groups (Table 2 and Figure S1). Surprisingly, Affymetrix array genotyping results were obtained for all patients from most of the SNPs localized in the deleted region. Only rs11175121 gave three no-calls and three aberrant heterozygous calls (Figure 5). Performing a BLASTN search of these five SNPs, we see that all have a very homologous sequence present on chromosome 7 and that rs11175121 is the only one with a chromosome 12-specific nucleotide

directly adjacent to the polymorphic nucleotide (Table S2). This illustrates that some genotypes provided by SNP arrays should be considered with caution, especially those located in CNVs or LCRs. The use of higher-coverage arrays such as the Affymetrix 6.0 in combination with a quantitative analysis of the results would have likely overcome the problem and might have enabled us to directly visualize the deletion. In fact, the deletion could be detected by CGH array despite a low number of probes (3) localized in the sequence of interest (Figure 4). Also, a quantitative analysis of the locus was achieved with the use of the Illumina Infinium II HumanHap 550 BeadChip SNP arrays in



**Figure 4. Confirmation of the Presence of a Homozygous Deletion in P1**

Oligonucleotide array CGH was performed with the Agilent 180K Human Genome CGH Microarray (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Hospices Civils de Lyon, CGH Plateform). Graphical overview and analysis of the data were obtained with the Agilent DNA Analytics software version 4.0.81 (statistical algorithm: Z-score, sensitivity threshold: 2.5, window: 0.5). A graphical overview and analysis of the data were obtained by using the Agilent DNA Analytics software. The value of zero represents equal fluorescence intensity ratio between sample and reference DNA. Copy-number losses shift the ratio to the left ( $< -1$ ), and copy-number gains shift it to the right ( $> 0.58$ ). Three adjacent probes located on the telomeric side of *DPY19L2* are homozygously deleted in the analyzed patient.

the CHOP project, which allowed the identification of the deleted region.<sup>18</sup>

Because of the presence of duplicated *DPY-19* sequences and, in particular, of *DPY19L2P1* on chromosome 7, which has  $> 95\%$  sequence identity with *DPY19L2*, it has been extremely difficult and tedious to identify primers and amplification conditions specific to *DPY19L2* and we have not yet succeeded in sequencing the gene in totality. Five of our patients do not have a homozygous deletion, and we cannot exclude the possibility that some of these patients may harbor either two point mutations or a heterozygous deletion and a smaller mutation (in particular patient 7, who presents with the 1Mb homozygous region). LCRs 1 and 2 are also very homologous ( $> 97\%$ ),

and this also prevented us from developing a long-range PCR across the deletion. This would prove useful for detecting heterozygotes and would characterize more precisely the deletion breakpoints. In the absence of this test, we carried out PCR amplification of two exons (1 and 11) on 200 fertile North African men and 100 fertile European men. All patient exons amplified, indicating that none were homozygous for the *DPY19L2* deletion. For better ascertainment of the frequency of the deletion, additional data could be analyzed from the Copy Number Variation project at the Children's Hospital of Philadelphia (CHOP project), which presents Illumina HumanHap 550 Bead-Chip data obtained from 2026 disease-free individuals.<sup>18</sup> Interrogation of the CHOP web server indicated that the

**Table 2. Frequency of Individuals Presenting with a Duplication or a Heterozygous Deletion at the *DPY19L2* Locus and the Expected Prevalence of Individuals with Homozygous Deletion**

	Number of Subjects	Number of Dup.	Frequency of Dup. (%)	Number of Het. Del.	Frequency of Het. Del. (%)	Expected Frequency of Hom. Del.
Africans	693	23	3.3	2	0.3	1/ 481 636
Europeans	1321	14	1.1	13	1.0	1/ 41 616
Asians	12	0	0	1	8.3	1/ 576
TOTAL	2026	37	1.8	16	0.8	1/ 64 516

Abbreviations are as follows: Dup., duplication; Het. Del., heterozygous deletion; Hom. Del., homozygous deletion. Data are from the CNV CHOP database.

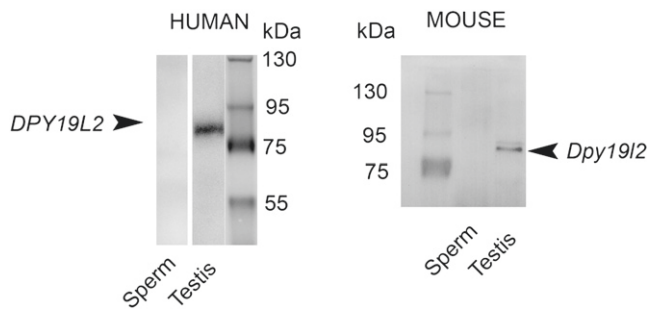
Gene	Ref.	Position	P2	P4	P1	P6	P5	P3	P9
		Last homozygous marker	rs10877107 (57039Kb)		rs7134845 (60562Kb)				
			...	...	...	...			
		rs1840662 61992189	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
		rs11174935 62007049	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
		rs786852 62030647	BB	BB	AA	AA	AA	BB	NoCall
		rs549889 62044329	NoCall	BB	AA	AA	AA	AB	AB
		rs477614 62066070	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB
		rs512936 62066171	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
		rs810872 62067917	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
		rs812006 62068109	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB
		rs786856 62068353	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AB
		rs9668487 62068914	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
		rs488736 62069904	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AB
		rs9888446 62071945	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
		rs2137391 62077716	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AB
		rs932051 62081485	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
		rs34960162 62101901	AA	AA	BB	BB	BB	BB	AB
		rs1174969 62109660	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
		rs575689 62129023	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
		rs1581098 62159243	BB	BB	BB	BB	BB	BB	AB
		rs4420319 62159276	BB	BB	AA	AA	AA	AA	AB
DPY19L2	rs4763094	62261464	NoCall	BB	BB	BB	BB	BB	BB
DPY19L2	rs7301605	62304656	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
	rs11175119	62370396	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	rs11175120	62370534	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
	rs11175121	62370601	AA	AB	AB	NoCall	AB	NoCall	NoCall
	rs7304120	62442690	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB
TMEM5	rs2279964	62459278	BB	BB	BB	BB	AA	AA	BB
TMEM5	rs3791156	62460947	AA	AA	AA	AA	BB	BB	AA
	rs949956	62474717	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA
	rs1986622	62509080	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SRGAP1	rs7136130	62518349	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA
SRGAP1	rs11835034	62547317	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA
SRGAP1	rs17099883	62547366	BB	BB	BB	NoCall	BB	BB	BB
SRGAP1	rs35143986	62547516	AA	AA	AA	AA	AA	BB	AA
SRGAP1	rs11175198	62558874	AA	AA	BB	BB	BB	AA	AB
SRGAP1	rs17099893	62569281	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SRGAP1	rs11175203	62576595	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
SRGAP1	rs4763005	62577615	BB	BB	BB	BB	BB	BB	BB
SRGAP1	rs7973936	62619912	BB	BB	AA	AA	AA	BB	AB
		Last homozygous marker	rs7969759 (66115Kb)		rs11175213 (62626kb)				
			...	...	...	...			

**Figure 5. Haplotype of Seven Patients with the Deletion**

Genotype of seven patients with the deletion centered around *DPY19L2*, as indicated by the microarray analysis. P2 and P4 share the longest identical haplotype, of approximately 9 Mb, ranging from rs10877107 to rs7969759. P1 and P6 have an identical haplotype of 2 Mb, and P5 and P3 have a haplotype of 0.4 Mb. Markers in gray are located in the deleted region. The genotypes indicated for deleted markers very likely come from hybridization of homozygous sequences from chromosome 7 (see Table S2).

overall frequency of *DPY19L2* heterozygous deletion was 1 in 127 (Table 2), implying an estimated disease incidence of 1 in 64,516, which would be concordant with the rarity of the phenotype. A very high carrier prevalence was detected in the Asian cohort, but only 12 individuals were tested, and this result is probably due to the small size of the population tested. Data from the CHOP project strongly suggests that male globozoospermia due to a homozygous *DPY19L2* deletion can be expected in all ethnic groups. The frequency of the deletion has not been determined in the North African population, which might be different from the African population—mainly African American—used in the CHOP study (Table 2). The higher incidence of globozoospermia observed in

Maghrebian men is, however, not necessarily correlated with an increased allelic frequency. It is probably due to the high rate of consanguineous marriages specific to this population (as was the case for almost half of the patients tested here), which strongly favors the emergence of recessive traits. This was confirmed by our microarray data, which show that six of seven patients with the deletion were homozygous for a large region (ranging from 2–49 Mb) encompassing the deleted region (Table 1). The analysis of the SNP microarray data suggests the presence of three distinct haplotypes (Figure 5). This concurs with data from the CNV database and confirms that this deletion is not a due to a unique founder effect, even in our (rather homogeneous) population. Altogether, these



**Figure 6. Immunoblots Showing the Presence of DPY19L2 in Testis and Its Absence in Sperm**

Left; a unique band in the expected area of the gel is marked with human anti-DPY19L2 antibody with human testis extract but not with ejaculated sperm extract. A similar result is obtained with mouse anti-Dpy19l2 antibody, in which a band is marked with mouse testis extract but not with epididymal sperm extract. Protein loadings in each lane were similar and were checked by the Bradford protein assay.

Proteins were separated on 8% polyacrylamide denaturing gels and electrotransferred for 120 min at 350 mA to Immobilon P transfer membrane (Millipore). The membranes were then blocked for 60 min with 5% nonfat dry milk (Biorad) in PBS Tween 0.1%. The primary antibody was added and incubated overnight at 4°C. After washing in PBS Tween 0.1%, the secondary antibody (anti-rabbit, Jackson Laboratory) was added at a dilution of 1:10,000 for 1 hr at room temperature. The membrane was washed and incubated for 1 min in HRP substrate (Western Lightning, Perkin Elmer Life Science). The reactive proteins were detected with G-Box chemi XL (Syngene, England). Polyclonal antibodies against peptides from the N terminus of DPY19L2 (RSKLRGSSDRPQSSC for mouse Dpy19l2 and RSQSKGRRGASLAREPEC for human DPY19L2) were raised in rabbit. Antibodies were not purified, and serums were used at a dilution of 1:1000. All animal procedures were run according to the French guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the local ethical review committee of Grenoble Neurosciences Institute. Sperm were obtained from 16-week-old Oncins France 1 strain (OF1) mice (obtained from Charles River, Macon, France) by manual trituration of caudae epididymis. Human testis tissue (from an 80-year-old donor) was obtained by surgery. Sperm were obtained by ejaculation (from a 30-year-old donor). Human tissues were obtained after approval by the local ethical committee and informed consent from the patients.

elements strongly suggest that DPY19L2 CNV is caused by nonallelic homologous recombination (NAHR) between LCRs 1 and 2. We could not identify any remnant of the LCR 1,2 sequences near the other DPY19L paralog or pseudogenes, suggesting that the duplications that led to the creation of the DPY19L family might have been driven by a different mechanism.

Nucleotide changes have long been believed to be the major force in genomic evolution. It is now estimated that LCRs account for approximately 5% of the human genome<sup>19</sup> and that the average rate of gene duplication is similar to the mutation rate per nucleotide site.<sup>20</sup> Mutations in duplicated genes can cause (1) pseudogenization (function loss), (2) subfunctionalization, a process whereby both genes are required to perform the ancestral functions, or (3) acquisition of a new function.<sup>21,22</sup> DPY19L2 is a member of the DPY19L family, which comprises four transmembrane proteins of unknown

function: DPY19L1–DPY19L4. Genes encoding DPY19L proteins have undergone multiple duplications through evolution, leading to the recent creation of a family with LCR comprising *DPY19L1* and six pseudogenized copies on chromosome 7 and *DPY19L2* on chromosome 12.<sup>23</sup> We can safely postulate that the duplication of *DPY19* eventually led to the acquisition of a new specialized function in spermiogenesis, in what could be seen as a paradigm for neofunctionalization through gene duplication. *DPY19L1* was shown to be expressed in rat neural stem cell prior to their differentiation into GABAergic neurons,<sup>24</sup> and *DPY19L3*, which is expressed mainly in the brain and the peripheral nervous system, was very recently described to be have a strong association with bipolar disorder.<sup>25</sup> We can postulate that the presence of mutations in *DPY19L1* or *DPY19L3*—potentially large deletions—could have severe pathological consequences caused by an abnormal neurological development. *DPY19L2* is, however, the only of the four paralogs or of the other pseudogenes to have been described as a CNV and found to be duplicated or deleted, and we have not detected the 28 kb LCR near any of its paralogs or pseudogenes through extensive BLASTN search. Data from the CHOP database indicates that the breakpoints of a vast majority of the described CNV (101/108) are localized in LCRs 1 and 2 (Figure S1). This indicates that the observed deletion, like the described gain/loss CNV at the DPY19L2 locus, is indeed very likely caused by NAHR occurring between LCRs 1 and 2. NAHR usually takes place during meiosis between highly homologous sequences, usually LCRs, located (1) on the same chromatid, (2) on sister chromatids, or (3) on chromatids from paired bivalent chromosomes. Interchromosomal and interchromatid NAHR (2 and 3) between LCRs in direct orientation result in the production of two recombined chromosomes: one duplicated and one deleted, whereas intrachromatid NAHR (1) produces a deleted chromosome and a small, nontransmissible (thus lost), circularized chromatid portion (for review see<sup>26</sup>). NAHRs are thus expected to produce a higher proportion of deletions than duplications. This was indeed confirmed through measuring the de novo meiotic deletions and duplications at four NAHR hotspots on sperm DNA.<sup>27</sup> Surprisingly, the frequency of duplications at the DPY19L2 locus (1.8%) is more than twice that of deletions (0.8%) (Table 2). This could result from the negative selection against the deleted alleles leading to infertility in homozygous males, as demonstrated here. Alternatively, this could result from a positive selection of the duplicated alleles. At the moment, we have no data concerning the potential effect of the deletion in females. However, considering the sperm-specific function of DPY19L2, we do not anticipate any phenotype in females.

Antibodies were raised against human and mouse DPY19L2. We could demonstrate that the proteins are present in human and mouse testis but absent from ejaculated human sperm or epididymal mouse sperm (Figure 6). These results are concordant with a role of DPY19L2

during spermiogenesis. We performed flow cytometry analysis on spermatozoa from P1's spermatozoa (data not shown) and observed a single haploid peak. Others have carried out fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses on sperm from globozoospermic patients and have also observed that the tested spermatozoa were euploid, albeit with a slight increase in aneuploidy rate.<sup>28–30</sup> Altogether, these data demonstrate that globozoospermatozoa have undertaken both meiotic divisions and have reached the round spermatid stage but that the spermiogenesis is altered beyond this stage. One of the major complexes involved in acrosome formation and head elongation is the acropalaxome, a subacrosomal cytoskeletal plate toward which Golgi-derived vesicles fuse.<sup>31</sup> Very little is known about DPY19L2 function. In the human, the only data come from the analysis of cDNA libraries, and they indicate that DPY19L2 transcripts are expressed mainly in the testes (Figure 2C). Our protein work confirmed that both human and mouse DPY19L2 are indeed present in the testis but that they are absent from mature sperm (Figure 6). We also observed in the mouse that the protein is predominantly expressed in the testis compared to muscle, spleen, kidney, or liver (data not shown). These results are concordant with a function of the protein during spermiogenesis. At the moment, the only key to its function comes from the study of DPY-19, the ancestor of DPY19L2 in *C. elegans*. Both genes encode multipass membrane proteins likely to contain 6–11 transmembrane domains. DPY-19 was shown to be necessary for the correct polarization of *C. elegans* neuroblasts and their subsequent migration along the anterior-posterior axis.<sup>17</sup> We saw in our patients that without DPY19L2, head elongation and acrosome formation are not possible. We can postulate that DPY19L2 might be necessary to indicate the anterior pole of spermatozoa and might be involved in the acropalaxome positioning and fixation. The *dpy19l2* mice knockout has just been produced in a recent effort to produce animal models for transmembrane proteins.<sup>32</sup> The described phenotype concurs perfectly with what is observed in the human and was briefly described as “infertility, failure of the spermatid nuclei to elongate”<sup>32</sup>. We have no doubt that the utilization of this animal model will contribute to the elucidation of the function and mode of action of DPY19L2.

None of the patients with the deletion declared any medical impairment apart from their primary infertility. DPY19L2 inhibition could therefore provide an interesting target to achieve male contraception and a patent was filed to that effect.<sup>15</sup> Many have attempted intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with globozoospermic spermatozoa. Overall fertilization and pregnancy rate is low but successful pregnancies have been reported.<sup>3,33–35</sup> In most of these reports, the distinction between type I (total globozoospermia) and type II (partial globozoospermia) patients is not clear. It is also very likely that not all of the more homogeneous type I patients have the same molecular etiology. Twenty ICSI cycles were carried out on five brothers with

typical type I globozoospermia, resulting in a single birth.<sup>36</sup> In the past 5 years, at the Clinique des Jasmin in Tunis, we have attempted seven ICSI cycles for six of the patients with DPY19L2 deletion who are described here. Normal fertilization rate was very low (13%), but one pregnancy could be obtained, illustrating the fact that a pregnancy could be obtained for type I globozoospermia caused by DPY19L2 deletion. Recent work suggests that the low fertilization rate observed with globozoospermatozoa is at least partially caused by a decrease or a defect in PLC $\zeta$ , a protein involved in the induction of calcium oscillations triggering oocyte activation.<sup>37,38</sup> Our report suggests that defects in PLC $\zeta$  signaling would be secondary to the defect in head maturation caused by the absence of DPY19L2. It is now important to genotype a larger series of patients, including some with a positive ICSI outcome, to establish whether the globozoospermic patients without DPY19L2 deletion have a better prognosis. If this were the case, the realization of a molecular diagnosis for globozoospermic men would permit providers to adopt the best course of treatment for these patients.

### Supplemental Data

Supplemental Data contain two tables and one figure and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG>.

### Acknowledgments

We thank all affected individuals and family members for their participation. We thank Frederic Plewniak ([fred@igbmc.fr](mailto:fred@igbmc.fr)) from the IGBMC of Strasbourg for having developed homoSNP and for the help he provided for utilization of the software. We thank Gaelle Vieville from Grenoble CHU and Damien Sanlaville from the Hospices Civils de Lyon for their help with the CGH array. We thank Peter White from the Children's Hospital of Philadelphia for helpful discussion on CNV and the use of the CHOP database. We thank Jean Luc Cracowski and the Centre d'Investigation Clinique (CIC) of Grenoble CHU for their help regarding the ethical and legal aspects of patient management.

This work was part of the project Identification and Characterization of Genes Involved in Infertility (ICG2I) funded by the program GENOPAT 2009 from the French Research Agency (ANR). This work was also funded in part by program CIBLE 2009 from the Rhône Alpes Région.

Received: January 10, 2011

Revised: February 18, 2011

Accepted: February 18, 2011

Published online: March 10, 2011

### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

The Copy Number Variation project at the Children's Hospital of Philadelphia (CHOP), <http://cnv.chop.edu/>

GENEHUB GEPIS, <http://www.cgl.ucsf.edu/Research/genentech/genehub-gepis/>



BLASTN, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

NCBI Nucleotide database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

## References

1. Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., and Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.* *332*, 281–285.
2. Matzuk, M.M., and Lamb, D.J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* *14*, 1197–1213.
3. Dam, A.H., Feenstra, I., Westphal, J.R., Ramos, L., van Golde, R.J., and Kremer, J.A. (2007). Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* *13*, 63–75.
4. Kullander, S., and Rausing, A. (1975). On round-headed human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* *20*, 33–40.
5. Flörke-Gerloff, S., Töpfer-Petersen, E., Müller-Esterl, W., Mansouri, A., Schatz, R., Schirren, C., Schill, W., and Engel, W. (1984). Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. *Andrologia* *16*, 187–202.
6. Nistal, M., Herruzo, A., and Sanchez-Corral, F. (1978). Absolute teratozoospermia in a family. Irregular microcephalic spermatozoa without acrosome. *Andrologia* *10*, 234–240.
7. Escalier, D. (1990). Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. *Int. J. Dev. Biol.* *34*, 287–297.
8. Dam, A.H., Koscinski, I., Kremer, J.A., Moutou, C., Jaeger, A.S., Oudakker, A.R., Tournaye, H., Charlet, N., Lagier-Tourenne, C., van Bokhoven, H., and Viville, S. (2007). Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* *81*, 813–820.
9. Xu, M., Xiao, J., Chen, J., Li, J., Yin, L., Zhu, H., Zhou, Z., and Sha, J. (2003). Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol. Hum. Reprod.* *9*, 9–17.
10. Lu, L., Lin, M., Xu, M., Zhou, Z.M., and Sha, J.H. (2006). Gene functional research using polyethylenimine-mediated in vivo gene transfection into mouse spermatogenic cells. *Asian J. Androl.* *8*, 53–59.
11. Dieterich, K., Soto Rifo, R., Faure, A.K., Hennebicq, S., Ben Amar, B., Zahi, M., Perrin, J., Martinez, D., Sèle, B., Jouk, P.S., et al. (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat. Genet.* *39*, 661–665.
12. Dieterich, K., Zouari, R., Harbuz, R., Vialard, F., Martinez, D., Bellayou, H., Prisant, N., Zoghmar, A., Guichaoua, M.R., Koscinski, I., et al. (2009). The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 1301–1309.
13. Harbuz, R., Zouari, R., Dieterich, K., Nikas, Y., Lunardi, J., Hennebicq, S., and Ray, P.F. (2009). Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction. *Gynecol. Obstet. Fertil.* *37*, 546–551.
14. Ray, P.F., Zouari, R., Harbuz, R., Ben Khelifa, M., Kharouf, M., Nikas, Y., Hennebicq, S., Koscinski, I., Viville, S., Escoffier, J., et al. (2010). Identification of the molecular defect responsible for most cases of globozoospermia. *Hum. Reprod.* *25* (Suppl. 1), I106–I106.
15. Ray, P.F. and Arnoult, C. (2009). Contrôle de la fertilité humaine via DPY19L2. Patent FR0957963. November 12, 2009.
16. World Health Organization. (1999). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
17. Honigberg, L., and Kenyon, C. (2000). Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development* *127*, 4655–4668.
18. Shaikh, T.H., Gai, X., Perin, J.C., Glessner, J.T., Xie, H., Murphy, K., O'Hara, R., Casalunovo, T., Conlin, L.K., D'Arcy, M., et al. (2009). High-resolution mapping and analysis of copy number variations in the human genome: a data resource for clinical and research applications. *Genome Res.* *19*, 1682–1690.
19. Bailey, J.A., Gu, Z., Clark, R.A., Reinert, K., Samonte, R.V., Schwartz, S., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., and Eichler, E.E. (2002). Recent segmental duplications in the human genome. *Science* *297*, 1003–1007.
20. Lynch, M., and Conery, J.S. (2003). The evolutionary demography of duplicate genes. *J. Struct. Funct. Genomics* *3*, 35–44.
21. Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* *151*, 1531–1545.
22. Ohta, T. (1987). Simulating evolution by gene duplication. *Genetics* *115*, 207–213.
23. Carson, A.R., Cheung, J., and Scherer, S.W. (2006). Duplication and relocation of the functional DPY19L2 gene within low copy repeats. *BMC Genomics* *7*, 45.
24. Kurokawa, K., Tamura, Y., Kataoka, Y., Yamada, H., Nakamura, T., Taki, K., and Kudo, M. (2005). A mammalian dpy-19 homologue is expressed in GABAergic neurons. *Med. Mol. Morphol.* *38*, 79–83.
25. Smith, E.N., Bloss, C.S., Badner, J.A., Barrett, T., Belmonte, P.L., Berrettini, W., Byerley, W., Coryell, W., Craig, D., Edenberg, H.J., et al. (2009). Genome-wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol. Psychiatry* *14*, 755–763.
26. Gu, W., Zhang, F., and Lupski, J.R. (2008). Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics* *1*, 4.
27. Turner, D.J., Miretti, M., Rajan, D., Fiegler, H., Carter, N.P., Blayney, M.L., Beck, S., and Hurler, M.E. (2008). Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. *Nat. Genet.* *40*, 90–95.
28. Viville, S., Mollard, R., Bach, M.L., Falquet, C., Gerlinger, P., and Warter, S. (2000). Do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies?: case report. *Hum. Reprod.* *15*, 2563–2566.
29. Morel, F., Douet-Guilbert, N., Moerman, A., Duban, B., Marchetti, C., Delobel, B., Le Bris, M.J., Amice, V., and De Braekeler, M. (2004). Chromosome aneuploidy in the spermatozoa of two men with globozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* *10*, 835–838.
30. Moretti, E., Collodel, G., Scapigliati, G., Cosci, I., Sartini, B., and Baccetti, B. (2005). 'Round head' sperm defect. Ultrastructural and meiotic segregation study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* *37*, 297–303.
31. Kierszenbaum, A.L., and Tres, L.L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* *67*, 271–284.

32. Tang, T., Li, L., Tang, J., Li, Y., Lin, W.Y., Martin, F., Grant, D., Solloway, M., Parker, L., Ye, W., et al. (2010). A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat. Biotechnol.* *28*, 749–755.
33. Liu, J., Nagy, Z., Joris, H., Tournaye, H., Devroey, P., and Van Steirteghem, A. (1995). Successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection in patients with globozoospermia. *Hum. Reprod.* *10*, 626–629.
34. Battaglia, D.E., Koehler, J.K., Klein, N.A., and Tucker, M.J. (1997). Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. *Fertil. Steril.* *68*, 118–122.
35. Bechoua, S., Chiron, A., Delclevé-Paulhac, S., Sagot, P., and Jimenez, C. (2009). Fertilisation and pregnancy outcome after ICSI in globozoospermic patients without assisted oocyte activation. *Andrologia* *41*, 55–58.
36. Kilani, Z.M., Shaban, M.A., Ghunaim, S.D., Keilani, S.S., and Dakkak, A.I. (1998). Triplet pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of round-headed spermatozoa. *Hum. Reprod.* *13*, 2177–2179.
37. Yoon, S.Y., Jellerette, T., Salicioni, A.M., Lee, H.C., Yoo, M.S., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, J.B., Visconti, P.E., et al. (2008). Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.* *118*, 3671–3681.
38. Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S.Y., Fissore, R.A., Hamer, R., Deane, C.M., Ruas, M., et al. (2009). Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLCzeta) in spermatozoa from infertile men. *Hum. Reprod.* *24*, 2417–2428.

### **Article 3. L'absence de DPY19L2, une nouvelle protéine de la membrane nucléaire interne, est responsable de la globozoospermie en empêchant l'ancrage de l'acrosome sur le noyau.**

#### **1) Contexte de l'étude et question scientifique**

Ce travail fait suite à l'identification du gène *DPY19L2* comme responsable de la majorité des cas de globozoospermie humaine. Il n'existait presque aucune étude sur l'expression et la fonction de ce gène, qui aurait permis de comprendre la pathogénie moléculaire de cette pathologie. Seule une étude chez *C. elegans* du gène ancestral *DPY19* avait conclu que son extinction entraînait l'absence de la migration des neuroblastes (*Honigberg and Kenyon, 2000*), mais sans données sub cellulaires intéressantes.

Afin de mieux comprendre le rôle de cette protéine, nous avons décidé dans un premier temps de déterminer très précisément sa localisation subcellulaire. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux défauts cellulaires entraînés par l'absence de la protéine.

#### **2) Méthodologie et principaux résultats**

Afin de déterminer la localisation de cette protéine la première étape a été de produire des anticorps spécifiques. Nous avons choisi des peptides dans la partie N-terminales de la protéine, car cette partie ne présente aucune homologie avec les autres protéines DPY19L.

J'ai ensuite localisé la protéine en microscopie confocale sur des cellules de testicules dissociées et sur des coupes de tubules séminifères. La modélisation *in silico* de la structure de la protéine montre qu'elle comprend au moins 10 segments transmembranaires, c'est donc une protéine membranaire. En microscopie optique la protéine se localise à l'interface noyau acrosome, là où se situent 3 membranes; la membrane interne de l'acrosome, et les deux membranes qui constituent l'enveloppe nucléaire. J'ai donc localisé dans un deuxième temps la protéine en microscopie électronique afin de déterminer à quelle membrane elle appartient. J'ai ainsi pu montrer, à l'aide d'anticorps secondaires fixés avec des billes d'or, qu'elle appartient à l'enveloppe nucléaire. Une étude approfondie de la localisation des billes d'or a permis de démontrer que cette protéine est localisée dans la membrane nucléaire interne.

J'ai enfin confirmé la localisation de la protéine dans la membrane nucléaire à partir d'expérience de colocalisation dans un système d'expression hétérologue. Pour ces expériences, j'ai comparé la localisation de DPY19L2 avec la protéine SUN5. SUN5, comme toutes les protéines de la famille SUN, est une protéine de la membrane nucléaire

interne et est exprimée dans les cellules germinales où elle se localise sous l'acrosome. J'ai utilisé des plasmides permettant l'expression de protéines étiquetées : la protéine DPY19L2 est étiquetée en C-ter par une protéine GFP, la protéine SUN5 est étiquetée via « DDK » (c'est le même tag que FLAG avec l'épitope constitué des acides aminés DYKDDDDK) sur sa partie C-ter. La partie N-terminale de SUN5 est nucléoplasmique et sa partie C-terminale est située dans le lumen de l'enveloppe nucléaire. La cotransfection de DPY19L2 et de SUN5 dans des cellules HEK a permis de montrer que ces deux protéines colocalisent partiellement avec une localisation de DPY19L2 qui est plus interne. Cela a permis de confirmer que la protéine DPY19L2 appartient à la membrane nucléaire interne. Ces expériences ont aussi permis de proposer une topologie de la protéine DPY19L2 dans la membrane nucléaire interne avec une partie C-ter et N-ter toutes deux localisées dans le nucléoplasme.

Afin de mieux évaluer le rôle de *Dpy19l2* dans la pathogénie, la création d'une souris KO pour ce gène a été nécessaire. J'ai dans un premier temps caractérisé la souris KO. Les mâles KO sont complètement infertiles, leurs testicules sont plus petits et leurs spermatozoïdes sont caractérisés par une tête ronde dépourvue d'acrosome. Les spermatozoïdes provenant de souris mâles KO pour le gène *Dpy19l2* présentent les mêmes caractéristiques que ceux de la globozoospermie humaine. Ce modèle de souris est donc parfaitement adapté pour comprendre la pathogénie moléculaire de la globozoospermie liée à *DPY19L2*.

J'ai ainsi pu réaliser une étude comparative de l'anatomie cellulaire de spermatides provenant soit de mâles déficients pour la protéine soit de mâles sauvages. Ces études ont été réalisées à différentes étapes de la spermiogénèse soit par microscopie optique confocale, soit par microscopie électronique. Chez les mâles *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> l'acrosome se développe correctement aux premières étapes de la spermiogénèse mais à partir de l'étape 5, qui correspond à l'étirement de l'acrosome sur le noyau, on observe une évanescence de la zone de lamine nucléaire dense. Parallèlement, l'acroplaxome, une structure de cytosquelette située à l'interface acrosome noyau, se détache partiellement du noyau. Ceci entraîne à la fin de la spermiogénèse le détachement complet de l'acrosome ainsi qu'une localisation anormale de la manchette. DPY19L2 est donc impliqué dans l'ancrage de l'acroplaxome sur le noyau.

### 3) Perspectives

Nous venons donc de démontrer que *Dpy19l2* est localisé dans la membrane nucléaire et participe à l'interaction d'un organite cytoplasmique avec le noyau. Nous avons vu dans l'introduction que certaines protéines particulières sont spécialisées dans les interactions noyau-

cytoplasme, les protéines LINC. Dpy1912 pourrait donc être un partenaire fonctionnel des complexes LINC. Nous avons voulu tester cette hypothèse et le travail correspondant est présenté dans la partie suivante.

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

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

## SUMMARY

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

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

## INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

\*Joint co-authors

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

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

## MATERIALS AND METHODS

### Biological preparations

#### Human

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

#### Animals

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

### Spermatogenic cells dissociation

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

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

### Sperm analysis

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

### Antibodies

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

### Histology and immunohistochemistry

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

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

### Electron microscopy (EM)

#### Immunogold labeling

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

#### Morphological analysis

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

### Cell culture, transfection and nuclei preparation

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

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

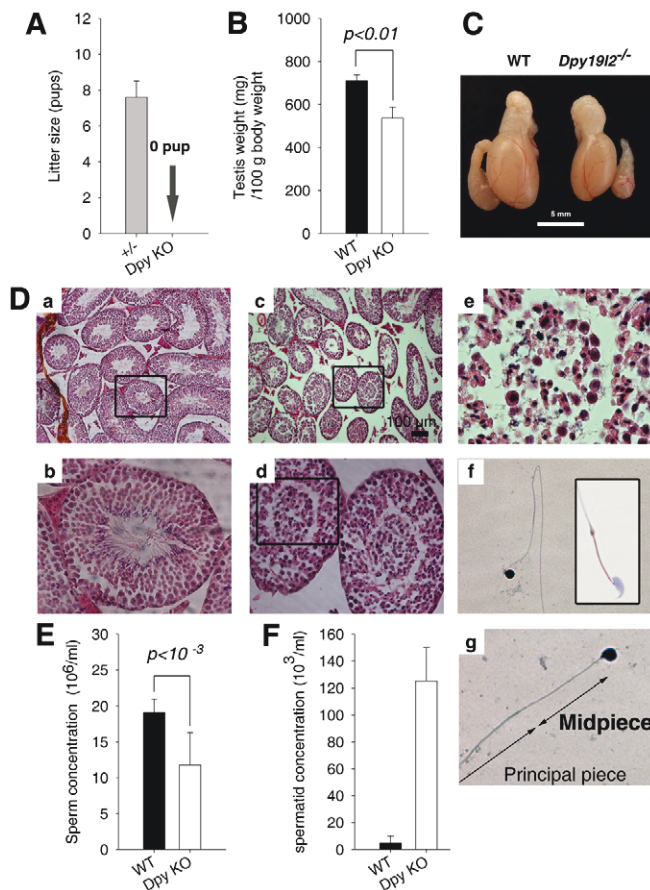
### Statistical analyses

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

## RESULTS

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

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



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

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

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

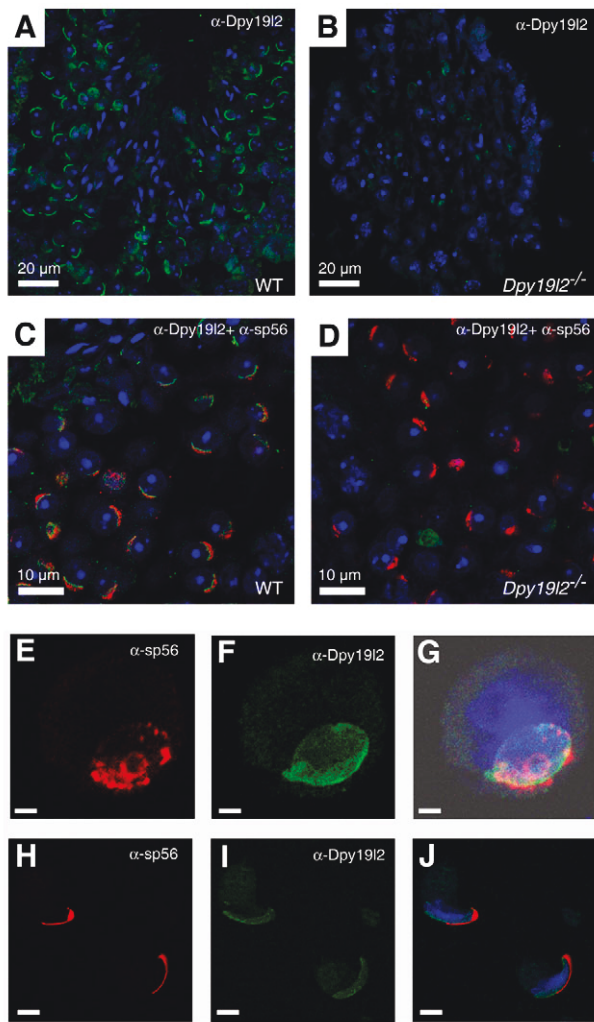
At the cellular level, the morphological aspect of spermatozoa from *DPY19L2* homozygously deleted men and knockout mice was remarkably similar (supplementary material Fig. S1B), with round-shaped sperm heads. Harris-Shorr stained spermatozoa presented various morphological defects. First  $\sim 99\%$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

### Dpy19l2 is a polarized protein facing acrosome

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

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





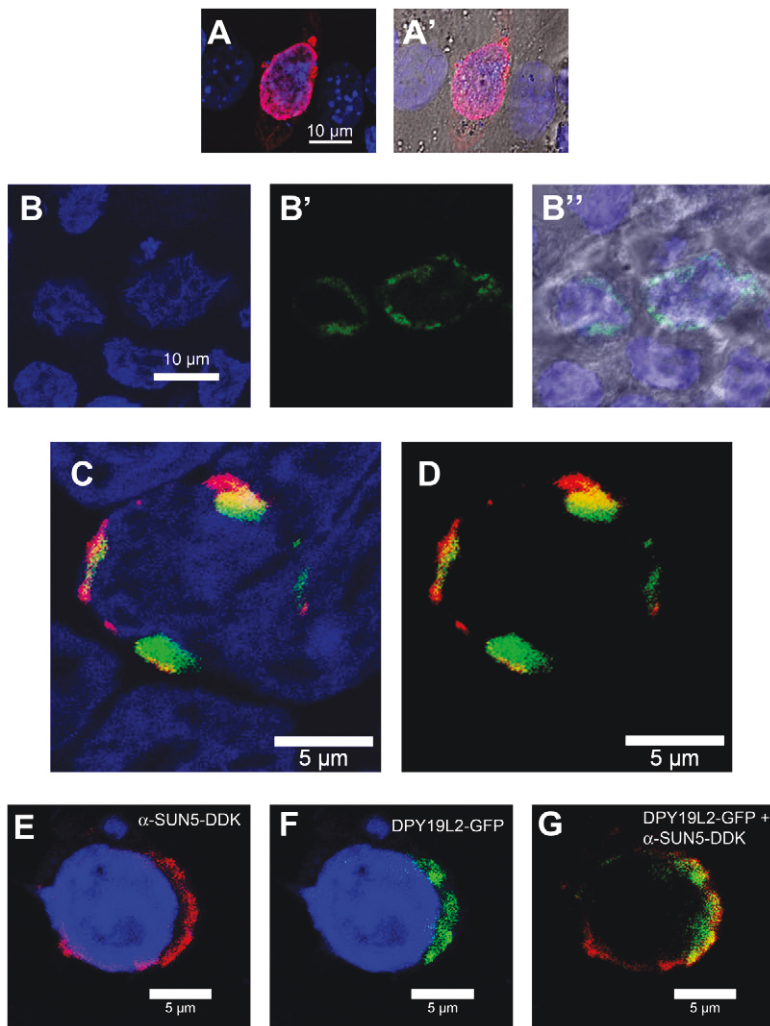
**Fig. 2. Immunostaining of Dpy19l2 shows its acrosomal localization in wild-type spermatids.** (A) Wild-type tubule sections stained with an antibody raised against Dpy19l2 ( $\alpha$ -Dpy19l2) and counterstained with Hoechst to show the nucleus (blue). In round spermatids, the antibody recognized a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

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

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

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

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

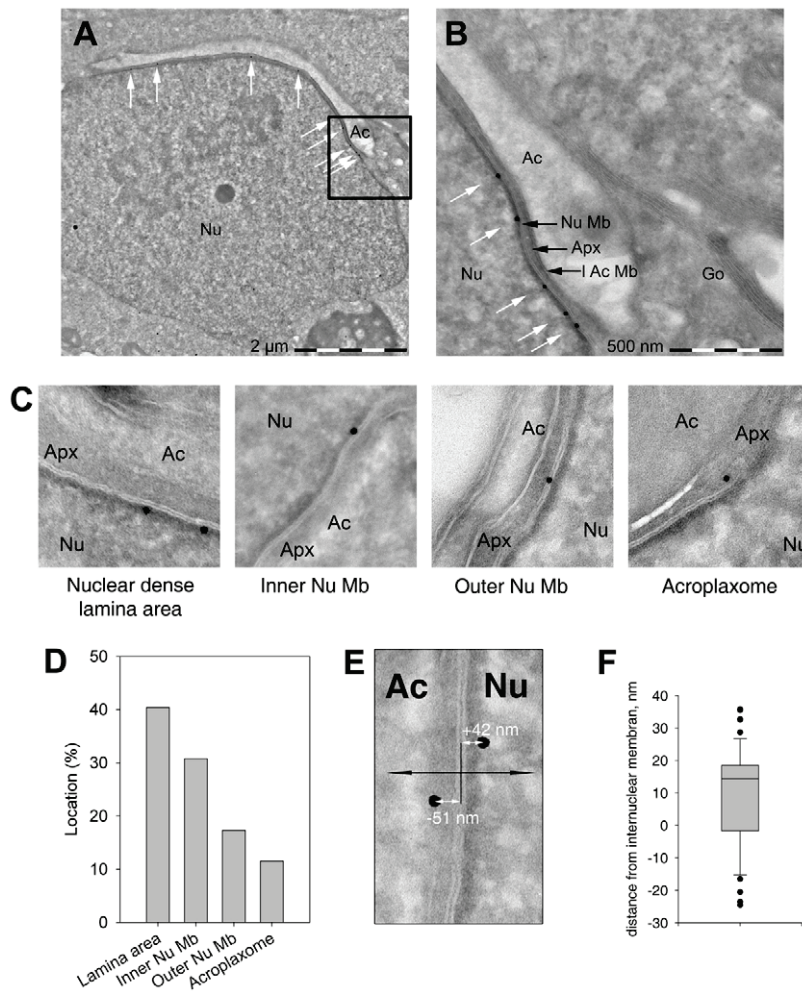


**Fig. 3. DPY19L2 and SUN5 are located in the nuclear envelope when heterologously expressed in cell lines.** (A,A') NH3T3 cells were transfected with pCMV6-SUN5-DDK and immunofluorescence staining observed after Hoechst nuclei counterstaining. (A) Overlay of Hoechst and SUN5-DDK immunostaining and (A')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

literature, the observed position of the gold particles did not allow the direct determination of the precise localization of the antigenic site because gold particles fall in a 80 nm diameter circle around the antigenic site because of the lengths of IgG [20 nm  $\times$  2 (IgG  $\times$  2)=40 nm]. In order to better characterize the localization of the N-ter, we first measured the frequency of the gold particle positioning in relation to different sites: (1) the NDL, (2) the INM and ONM, and (3) the acroplaxome (Fig. 4C). Gold particles were most frequently located in the NDL area (Fig. 4D). Second, we measured the shortest distance from the centre of the gold particle to the line splitting both nuclear membranes (Fig. 4E): measures were counted positively when heading towards the nucleus and negatively when heading toward the acrosome. As the distribution of the gold particles in its circle is random, the median of the sample should be 0 for a location in the NE lumen, around  $-10$  nm if the epitope is located on the cytosolic side of the ONM, and  $+10$  nm for a location in the nucleoplasm. A box-plot corresponding to the numerical values of the distances of 52 gold particles is showed in Fig. 4F and a median of  $+14.36$  nm was determined. This result strongly suggests that the N-ter of Dpy19L2 is located in the nucleoplasm in mouse spermatids. All together, transfection and EM results demonstrate that DPY19L2 is localized in the INM of round spermatids, with both N- and C-ter in the nucleoplasm.

### Caudal descent and acrosome spreading are defective in the absence of Dpy19L2

In order to understand the role of Dpy19L2 in acrosome biogenesis, ultrastructural studies of acrosome formation were performed by EM on spermatogenic cells from *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> males sorted by sedimentation velocity (Barcellona and Meistrich, 1977; Romrell et al., 1976). First, initial acrosome binding at step 3 was not disrupted and we observed no differences in the acrosomal junctional structures between wild-type and *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A,B). However, the acrosomal matrix, which binds tightly to the acroplaxome at this step (Fig. 5A), had an ectopic localization, binding to the outer acrosomal membrane (Fig. 5B,D, black arrows). Acrosome of *Dpy19L2*<sup>-/-</sup> sperm in step 4 of the spermiogenesis had a similar volume and extension compared with wild-type acrosomes (Fig. 5C,D). However, new defects appeared, including the presence of numerous vacuoles in the acrosome (Fig. 5D, white arrows). During the next steps, the caudal descent of the acrosome was clearly hampered. Numerous spermatids were blocked at stage 5 (Fig. 6). The extension of the NDL was not observed (Fig. 6B,C), leading to a complete block of bilateral acrosome extension. Instead of spreading over the nucleus, the acrosome swelled (Fig. 6C). This bloating is correlated with an increase in the size and the number of the vacuoles. This vacuolization probably corresponds to acrosomal membrane invagination caused by the continuing flux of Golgi-derived



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

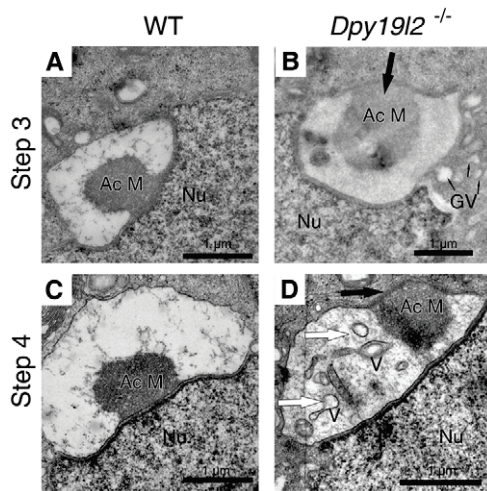
vesicles that cannot contribute to the normal acrosomal membrane spreading. Acrosome descent is unlikely to be due to vesicular traffic defects, as we did not measure any difference in the size of the Golgi apparatus or the number and size of Golgi-derived vesicles between wild-type and *Dpy19l2*<sup>-/-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

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

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

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

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



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

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

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

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

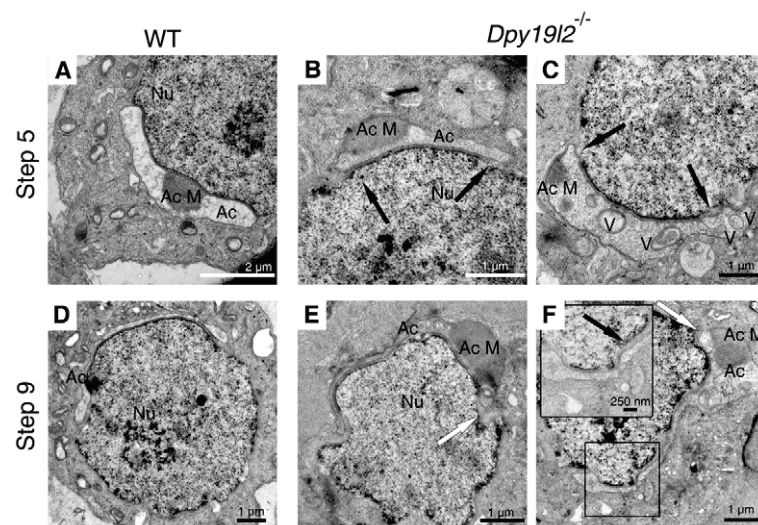
### DISCUSSION

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

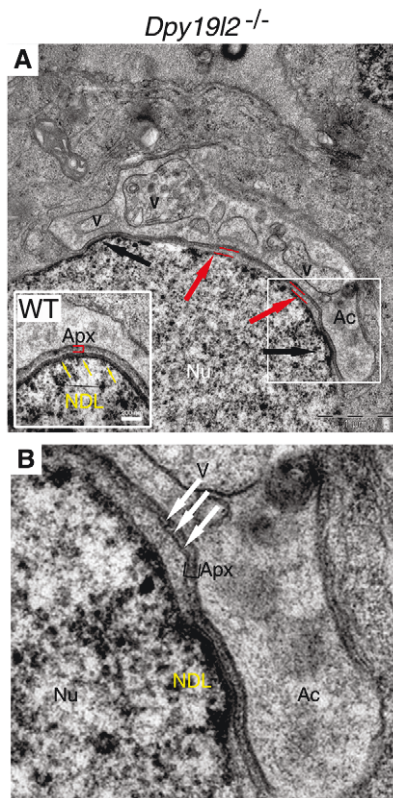
In mammals DPY19L2 belongs to a family of four homologous proteins: DPY19L1 to DPY19L4. This family does not present obvious homology with any other membrane proteins and clearly represents a new family of integral membrane proteins. In this paper, we characterized one of the members of this family and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

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

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



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

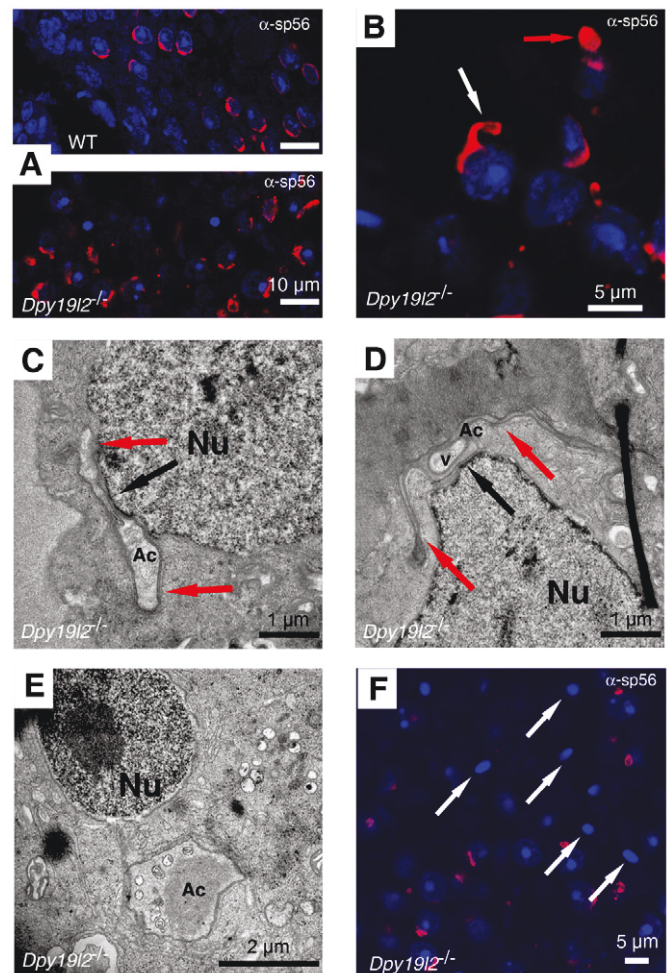


**Fig. 7. The NDL is disrupted, acroplaxome comes loose and nuclear membranes split off in stage 8 *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatids.**

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

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

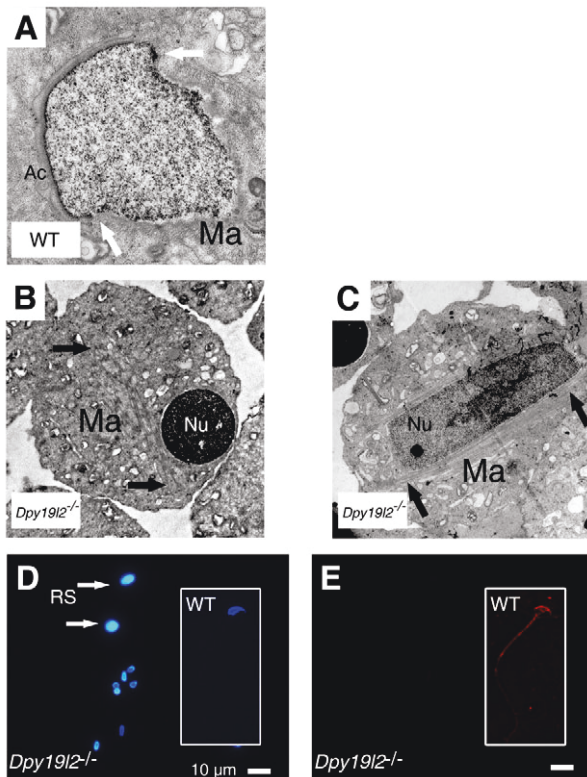
The presence of *Dpy19l2* does not seem to be necessary for acroplaxome and NDL positioning at step 3 and 4, suggesting that other proteins are involved during these phases. However, contrary to wild-type sperm, in *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> sperm the acrosomal matrix is



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

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

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



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

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

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

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

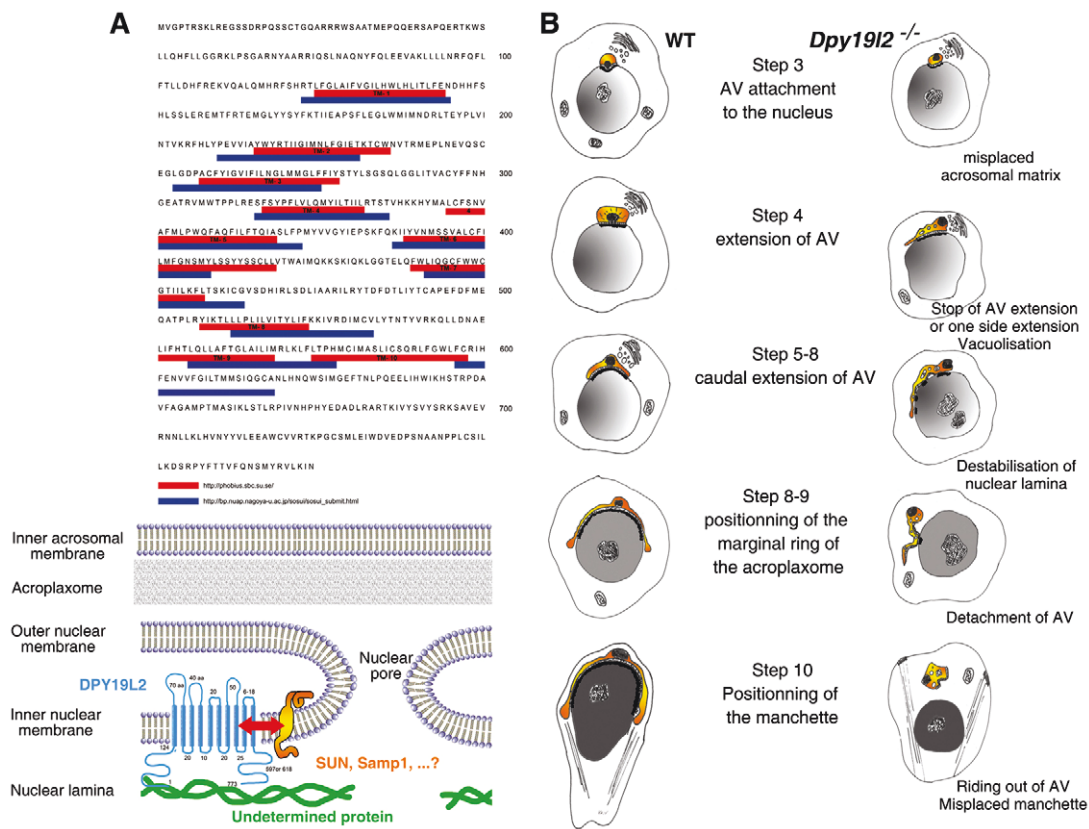
A schematic drawing of the conclusions obtained from our studies is presented in Fig. 10B.

### DPY19L as a functional partner of LINC complex

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

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

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



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

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

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

#### Acknowledgements

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

#### Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

#### Supplementary material

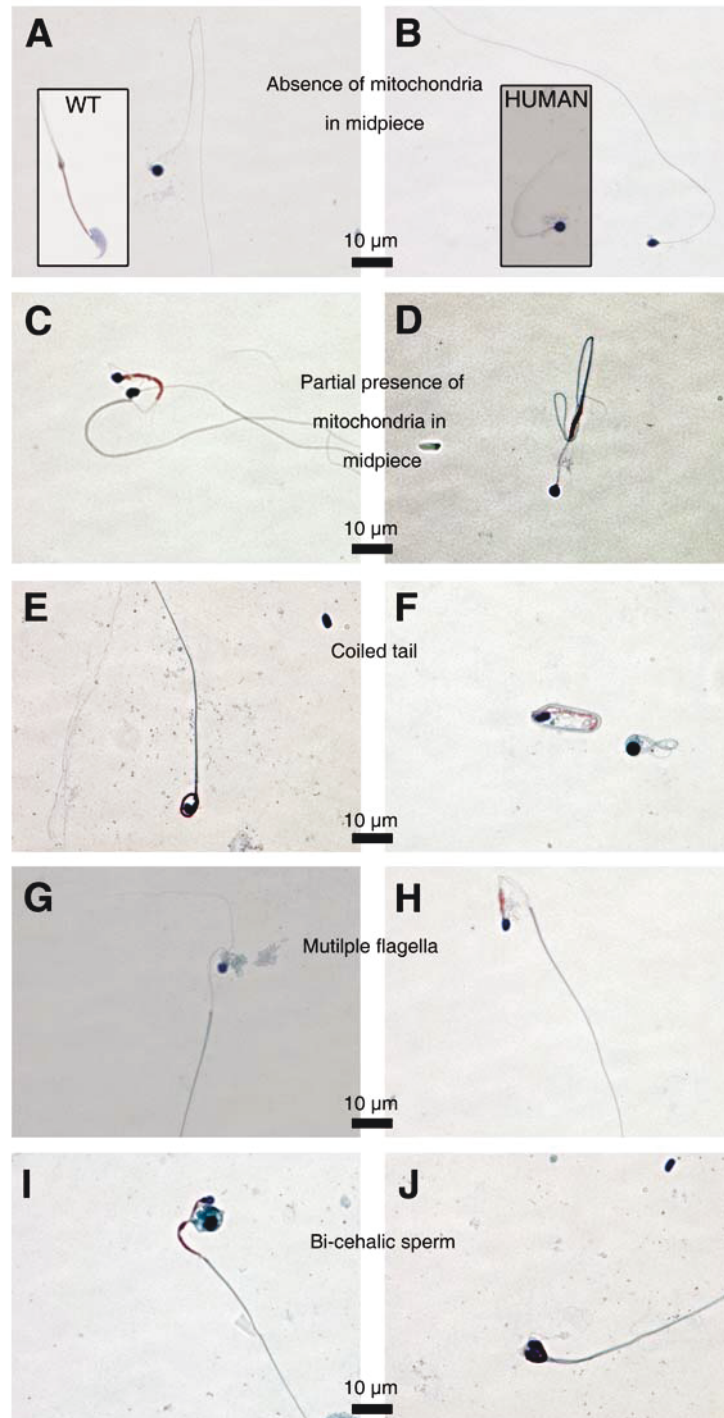
Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.077982/-DC1>

#### References

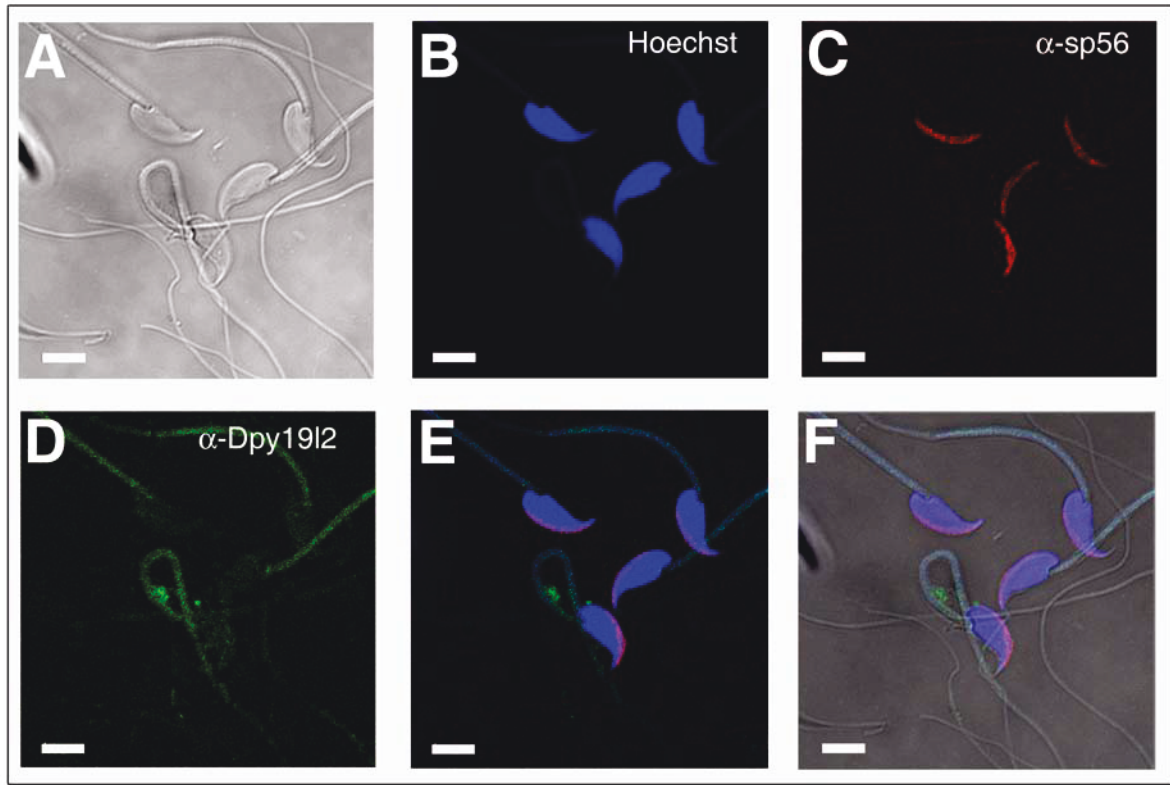
- Alsheimer, M., Fecher, E. and Benavente, R. (1998). Nuclear envelope remodelling during rat spermiogenesis: distribution and expression pattern of LAP2/thymopoietins. *J. Cell Sci.* **111**, 2227-2234.
- Audouard, C. and Christians, E. (2011). Hsp90beta1 knockout targeted to male germline: a mouse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

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

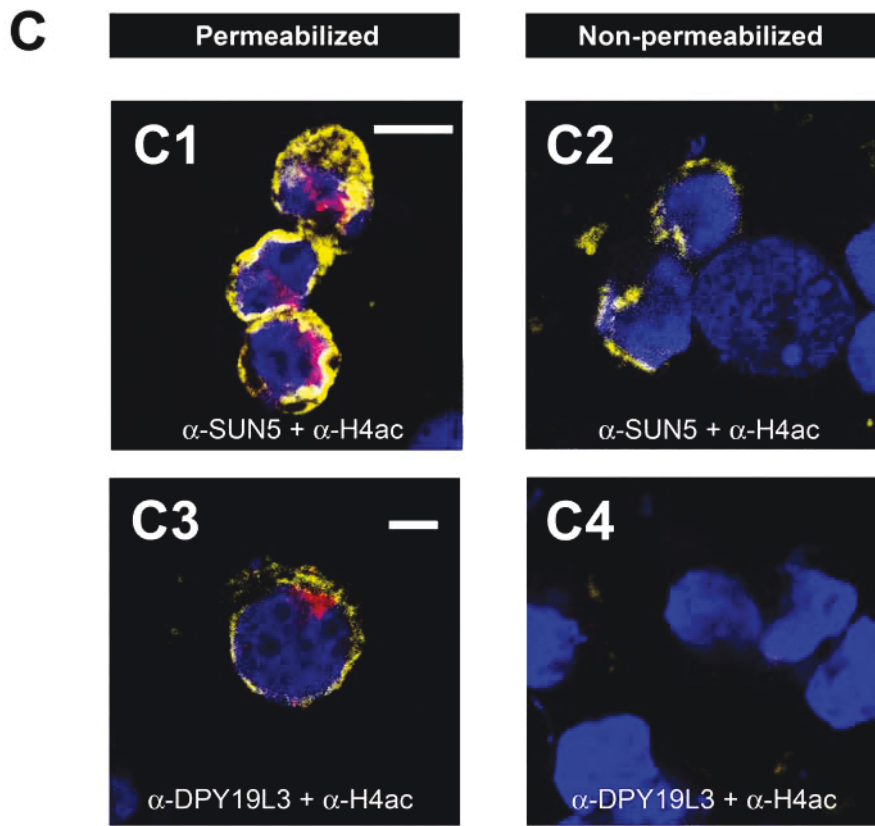
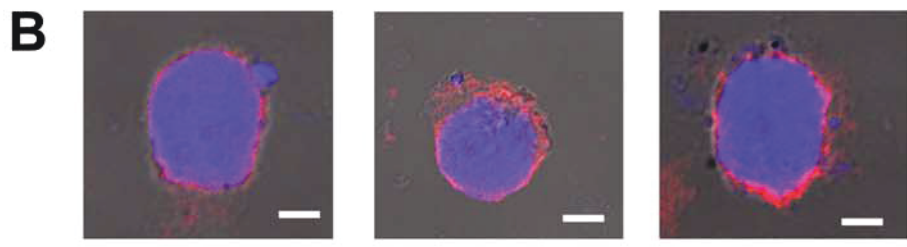
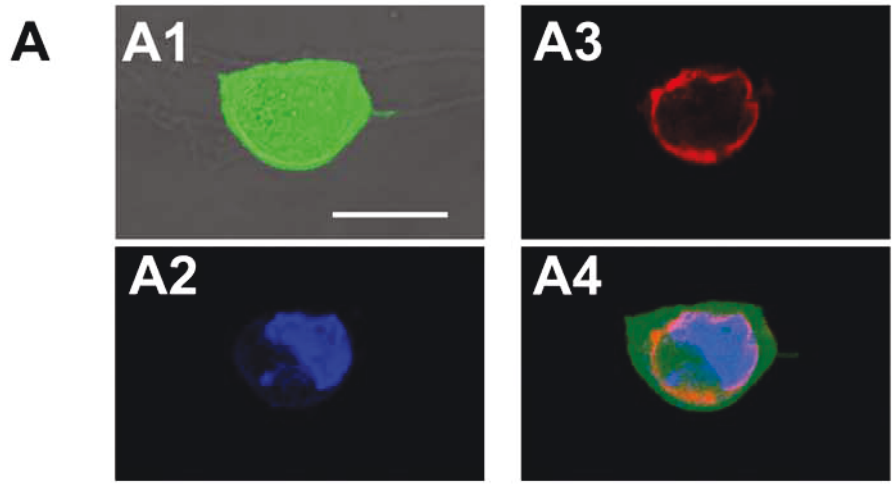




**Supplementary Fig. S1. Sperm from *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> males present round shaped head with multiple defects of the flagellum.** (A-J) Light microscopy analysis of *Dpy19l2*<sup>-/-</sup> spermatozoa. Sperm morphology was assessed with Harris-Shorr staining: nuclei were blue and mitochondria red.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



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



**Supplementary Fig. S3. DPY19L3-DDK is located in the NE and its C-ter is located in the nucleoplasm.**

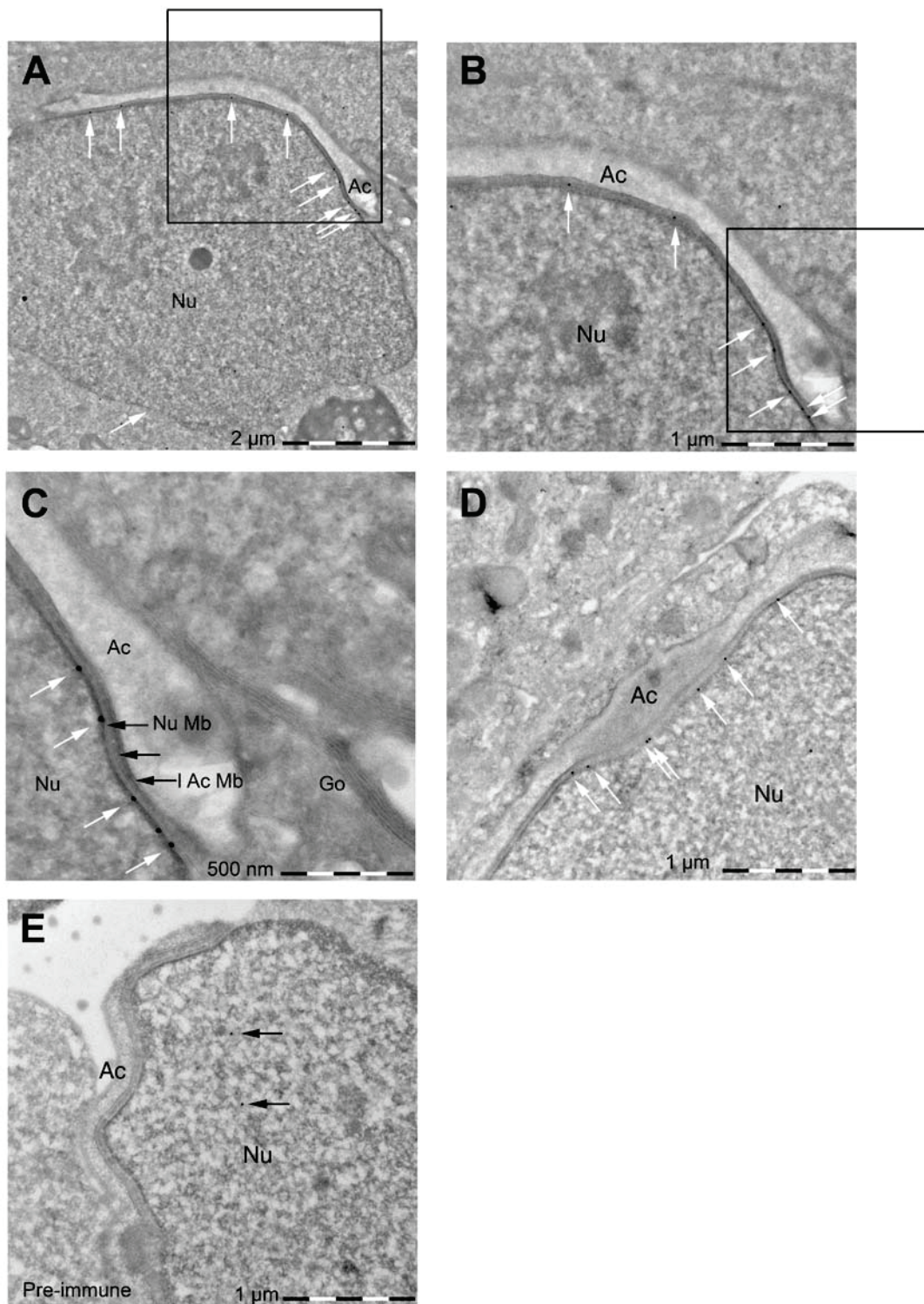
(A) NH3T3 cells were transfected with pCMV6-DPY19L3-DDK and peGFP and immunofluorescence staining observed after Hoechst nuclei counterstaining. Transfected cells were labeled with  $\alpha$ -DDK (red) and Hoechst (blue) and GFP fluorescence measured. GFP occupied the whole cell surface, contrary to DPY19L3-DDK that was restricted to nuclear rim. GFP signal and phase contrast (A1), Hoechst staining (A2), DPY19L3 staining (A3) and overlay (A4). (B) HEK cells were transfected with pCMV6-DPY19L3-DDK and nuclei isolated by hypoosmotic shock. Nuclei were labeled with  $\alpha$ -DDK (red) and Hoechst (blue). DPY19L3 staining remained attached to the nucleus, demonstrating its NE localization.

The C-ter of DPY19L3-DDK is located in the nucleoplasmic side of the nuclear envelope (C1-C4). (C1) Isolated HEK nuclei were permeabilized with triton X-100 and double immunostained with  $\alpha$ -SUN5-DDK antibody (yellow) and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (red), as a control of NE permeabilization and counterstained with Hoechst (blue). Both histone H4 and SUN5 were immunodetected in these conditions.

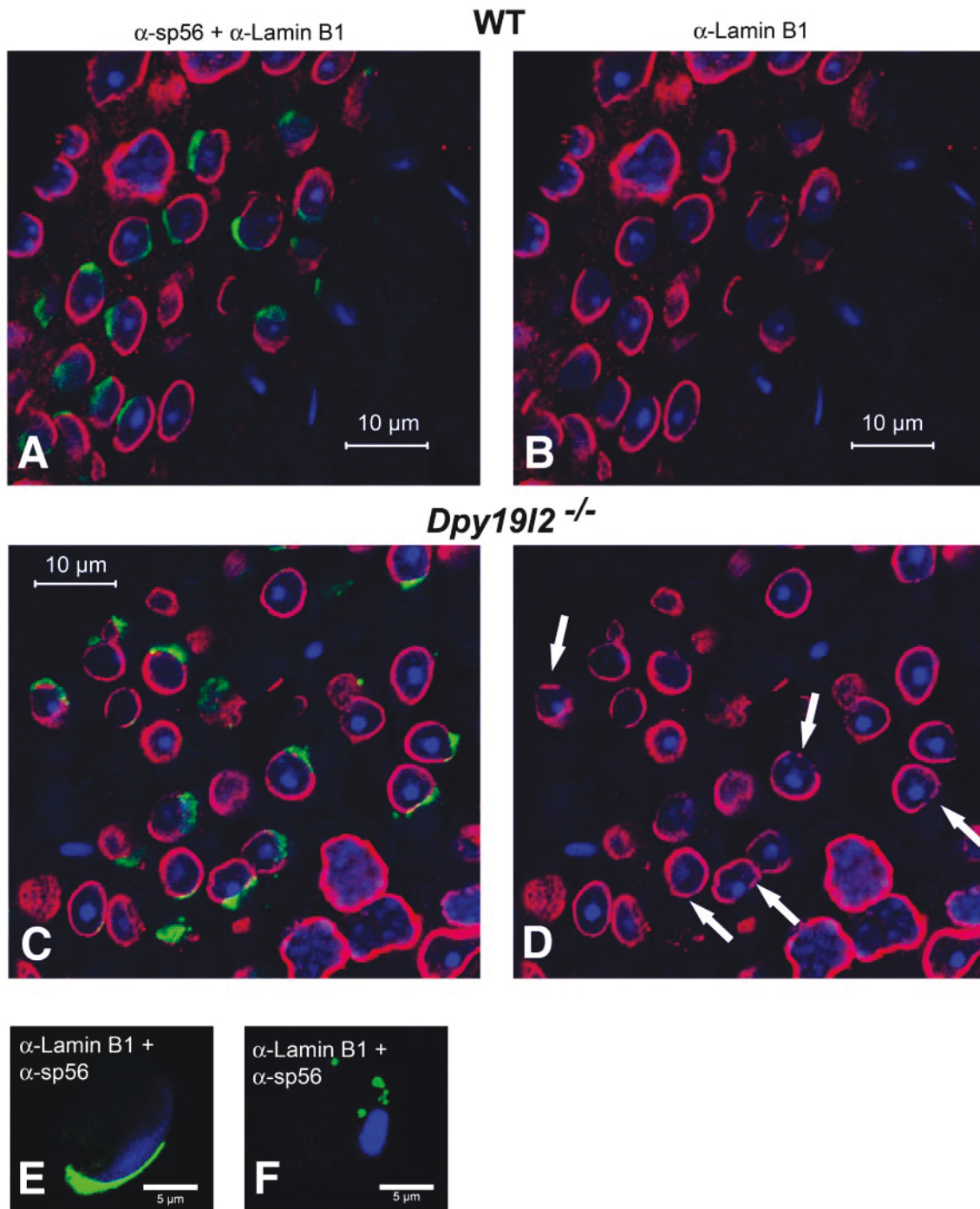
(C2) Non-permeabilized isolated HEK nuclei were double immunostained with  $\alpha$ -SUN5-DDK antibody (yellow) and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (red). The presence of SUN5 immunostaining indicates that ONM was damaged by nuclei isolation and the absence of acetylated histone H4 indicates that the INM was intact.

(C3) Isolated HEK nuclei were permeabilized with Triton X-100 and double immunostained with  $\alpha$ -DPY19L3-DDK antibody and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (yellow) and counterstained with Hoechst. Both histone H4 and DPY19L3 were immunodetected in these conditions.

(C4) Non-permeabilized isolated HEK nuclei were double immunostained with  $\alpha$ -DPY19L3-DDK antibody and  $\alpha$ -acetylated histone H4 antibody (yellow) and counterstained with Hoechst. Neither histone H4 nor DPY19L3-DDK was immunodetected in these conditions. Scale bars (C1-4) 5  $\mu$ m



**Supplementary Fig. S4. Immunogold localization of Dpy1912 in WT mouse spermatids.** (A) Gold particles targeting Dpy1912 antigenic sites were observed along the nuclear envelope of a spermatid in step 8 (white arrows). (B) Magnification of the black box drawn in A. (C) Magnification of the black box drawn in B. (D) Gold particles observed along the nuclear envelope of a spermatid in step 9 (white arrows) (E) Absence of gold particle over the nuclear envelope with pre-immune serum. Unspecific staining was present inside the nucleus.



**Supplementary Fig. S5. Abnormal localization and dynamic of lamin B1 in spermatids from *Dpy1912* deficient animals.**

Enlargements of testis sections immunostained with  $\alpha$ -sp56 (green staining) and  $\alpha$ -lamin B1 (purple staining) antibodies (A-B). In WT round spermatids, lamin B1 is not present in the NE facing the acrosomal vesicle and a strong polarization with acrosomal vesicle at the anterior pole (evidenced with  $\alpha$ -sp56 antibody- green staining) and lamin B1 at the posterior pole ( $\alpha$ -lamin B1-purple staining) is observable. (C-D) The absence of *Dpy1912* in deficient animal modifies the polarized distribution of lamin B1, which shifts to the anterior pole (white arrows). (E-F) In elongated spermatids, lamin B1 staining is no longer observable, in both WT (E) and *Dpy1912* deficient cells (F).

<b>KO mouse for :</b>	<b>Corresponding protein</b>	<b>Function</b>	<b>Localization</b>	<b>Acrosome</b>	<b>Nuclear shape</b>	<b>Nuclear membrane and lamina</b>	<b>Ref</b>
<i>Pick1*</i>	Protein interacting with C kinase 1	Golgi vesicle fusion; Protein trafficking	Trans-Golgi Gopc partner Ck2 $\alpha$ ' partner	Fragmented	Poorly elongated, not hook shape	Normal	(Xiao et al., 2009)
<i>Gopc</i>	Golgi-associated PDZ- and coiled-coil motif-containing protein)	Golgi vesicle fusion; Vesicle trafficking	Trans-Golgi Pick1 partner	Fragmented	Round or ovoid not hook shape	Normal	(Ito et al., 2004; Yao et al., 2002)
<i>Vps54**</i>	Vacuolar-vesicular protein sorting 54 homolog	Vesicular sorting protein Retrograde traffic	Acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Poorly elongated and irregular outline	Normal	(Paiardi et al., 2011)
<i>Hrb Agfg1 (official)</i>	HIV-1 Rev binding protein ArfGAP with FG repeats 1 (official symbol)	Golgi vesicle fusion	Cytoplasmic surface of acrosome	Absent Failure of vesicle fusion	Globular	Apparently normal	(Kang-Decker et al., 2001; Kierszenbaum et al., 2004)
<i>Zppb1</i>	Zona pellucida binding protein 1	Binding and penetration into the zona pellucida	Acrosomal matrix	Bulged	Shortened hook	Normal	(Yatsenko et al., 2011)
<i>Csnk2a2</i>	Casein kinase II alpha' catalytic subunit	Kinase/ phosphorylation	Ubiquitous Acrosomal matrix Pick1 partner	Partially separated from the nucleus	Poorly elongated	swelling of nuclear membranes	(Mannowetz et al., 2010; Xu et al., 1999)
<i>Hsp90b1</i>	Heat shock protein 90b1 heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1 (official symbol)	Endoplasmic chaperone	Endoplasmic reticulum	Partially present	Globular or deformed	?	(Audouard and Christians, 2011)
<i>Gba2</i>	Glucosidase beta 2	hydrolyzes glucosylceramide	Endoplasmic reticulum and/or plasma membrane	Partially present, disordered	Not elongated and irregular outline	?	(Walden et al., 2007; Yildiz et al., 2006)
<i>Dpy19l2</i>	Dpy-19-like 2 (C. elegans)	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) partner	Inner Nuclear membrane	Absent	Round	Destabilization of nuclear lamina. Nuclear membrane splitting off	This work

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

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

#### 4. *DPY19L2*, une protéine partenaire de la protéine *SUN5*

L'objectif de cette dernière partie de mon travail est de caractériser les partenaires moléculaires de la protéine *DPY19L2*, afin de mieux comprendre sa fonction. Ce travail est toujours en cours et je vais présenter dans cette partie, des résultats préliminaires obtenus à la fin de ma thèse.

##### 1) Découvertes de mutations sur le gène *DPY19L2*

Les dernières études génétiques sur *DPY19L2* confirment le rôle majeur joué par ce gène dans les cas de globozoospermie humaine. Une équipe de Strasbourg a ainsi estimé d'après une étude sur une cohorte de 64 patients globozoospermiques que le taux de délétion du gène est de 66,7% (*Elinati et al., 2012*). Dans notre équipe une autre cohorte de 34 patients a été étudiée, 23 patients sont délétés de manière homozygote, 2 sont délétés de manière hétérozygote et 9 ne sont pas délétés mais présentent des points de mutation sur le gène (*Coutton et al., 2012*). Ces résultats portent à 84% des patients présentant une protéine *DPY19L2* absente ou mutée, ce qui confirme que le gène *DPY19L2* est jusqu'à ce jour le gène le plus fréquemment retrouvé impliqué dans la globozoospermie humaine.

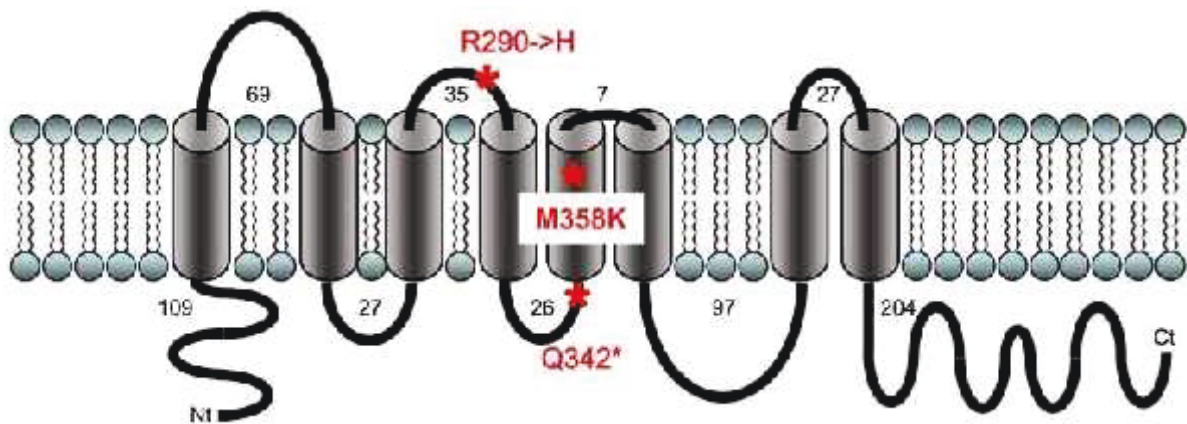


Figure 35: Représentation schématique de la protéine *DPY19L2* avec 8 domaines transmembranaires. Les logiciels de prédiction de domaine hydrophobe prédisent entre 8 et 10 domaines transmembranaires. Les étoiles rouges montrent ou sont placés les points de mutation identifiés de cette protéine.

Le séquençage des patients délétés à l'état hétérozygote a permis de mettre en évidence plusieurs mutations délétères (figure 35):



### **1.1) La mutation Q342**

Une délétion a été identifiée chez un patient au niveau de l'acide aminé Q342. Cette délétion conduit à une mutation dite non sens, le cadre de lecture est modifié, ce qui fait apparaître un codon STOP avant la fin de la protéine. Ce gène code alors pour une protéine tronquée non fonctionnelle. Chez ce patient cette mutation est présente sur les deux allèles.

### **1.2) La mutation M358K**

Une mutation faux sens a aussi été identifiée. Les mutations faux sens correspondent au remplacement d'un nucléotide par un autre et qui entraîne un changement d'acide aminé. Le variant pM384K est localisé sur le 5eme domaine transmembranaire de la protéine. Il pourrait être à l'origine d'une diminution de l'ancrage de la protéine dans la membrane nucléaire interne.

### **1.3) La mutation R290H**

Le variant pR290->H est localisé sur un domaine extra membranaire. De manière intéressante, l'arginine (R) en position 290 de la protéine DPY19L2 est très conservée au cours de l'évolution. Il est donc probable que cet acide aminé joue un rôle majeur dans la fonction de la protéine. Il est notoirement connu que les boucles entre deux domaines transmembranaires peuvent jouer des rôles fonctionnels importants et être impliqués dans l'interaction de DPY19L2 avec une autre protéine.

## **2) Stratégie de recherche de partenaires moléculaires**

La découverte de mutation sur des segments pouvant interagir avec d'autres protéines s'est révélé d'une importance majeure. En effet, il permet de sélectionner des morceaux de la protéine que nous pouvons utiliser comme appâts pour des expériences de pull down. De plus, comme je l'ai montré dans l'article précédent, la protéine Dpy19l2 appartient à la membrane nucléaire interne et se situe sous l'acrosome en formation dans les spermatides. De manière intéressante, il a été récemment publié que la protéine SUN5, une protéine de la membrane nucléaire interne qui forme des complexes LINC, présente une localisation similaire à celle de Dpy19l2 dans la spermatide ronde. Finalement, j'ai aussi montré que la protéine DPY19L2 colocalise partiellement avec la protéine SUN5. Ces résultats pris dans leur ensemble, montrent que SUN5 pourrait raisonnablement être un partenaire de Dpy19l2. Il est ainsi tentant de tester un pull down de SUN5 en utilisant comme appât le peptide de Dpy19l2

présentant la mutation.

## **2.1) Matériel et méthodes**

### ***2.1.1) Culture cellulaire et transfection***

Les cellules HEK-293 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS (Invitrogen, France). Elles sont transfectées avec le plasmide pCMV6 contenant l'orthologue humain de SUN5 tagguée DDK en C-ter (Origene, Rockville, MD, US) à l'aide des réactifs de transfection de la lipofectamine 2000 (Invitrogen) et en accord avec les instructions du fabricant. 48 heures après la transfection les cellules sont récupérées pour réaliser une extraction des noyaux.

### ***2.1.2) Dissociation des cellules spermatogéniques***

On enlève la tunique albuginée des testicules de 5 souris OF1 âgées de 16 semaines. Les testicules sont ensuite incubés dans 5 ml/paire de testicules de solution de collagénase (1mg/ml dans EKRB) pendant 30 min à température ambiante. Les tubes séminifères sont lavés avec du PBS et coupés très finement. Les cellules sont enfin dissociées par pipetage et centrifugées à 500 g pendant 10 minutes. Les procédures utilisant des animaux ont été approuvées par le comité d'éthique local de l'institut des neurosciences de Grenoble et en accord avec la législation française.

### ***2.1.3) Purification des noyaux et extraction des protéines***

Les cellules sont incubées dans une solution hypotonique et après homogénéisation au *dounce* les noyaux sont culottés à 2000g pendant 20 min à 4°C d'après le protocole de Zhong et al. Le culot est repris dans la solution de solubilisation avec de la DNase et incubé 4 heures à 4 °C sous agitation. Puis elles sont centrifugées pendant 30 min à 20000g à 4°C pour éliminer la partie non soluble. Le surnageant est utilisé pour réaliser le pull-down.

### ***2.1.4) Les peptides R26 et H26***

Les peptides R290 (TYLSGSQ<sup>L</sup>GGLITVACYFFNHGEAT<sup>R</sup>VMWTPPLR) et H290 (TYLSGSQ<sup>L</sup>GGLITVACYFFNHGEATH<sup>H</sup>VMWTPPLR) correspondant aux acides aminés 280-313 de la séquence de la protéine Dpy19l2 murine ont été synthétisés et couplés à une biotine en N-ter (Smartox). La mutation chez l'homme se retrouve en position 290. Chez la souris, cet acide aminé conservé est en position 305.

### **2.1.5) Pull Down**

Les peptides R290 et H290 étiquetés avec une biotine sont immobilisés sur des billes magnétiques recouverte par de la streptavidine (Invitrogen France) pendant 1 heure à 4°C. Après trois lavages les billes sont incubées sous agitation une nuit à 4°C avec les protéines solubilisées dans du PBS1X, 1% triton X-100, 2 mM EDTA, inhibiteurs de protéase de chez Roche et les protéines. Les billes sont ensuite lavées 5 fois avec la solution de solubilisation. Après le dernier lavage les billes sont reprises dans une solution de laemmli 1X (Biorad, France), incubées 10 minutes sous agitation à température ambiante et culotées 5 min à 1000 g. Le surnageant est ensuite déposé sur gel SDS-PAGE.

### **2.1.6) Anticorps**

Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps monoclonal anti DDK fait chez la souris (Origene) dilué au 1:1000 et l'anticorps polyclonal anti tsarg-4 fait chez le lapin (Biorbyt) dilué au 1:200. Les anticorps secondaires sont un anticorps anti souris (molecular probes, USA) et un anticorps anti lapin (Jackson Laboratory), tous deux couplés à la peroxydase et dilués au 1:10000.

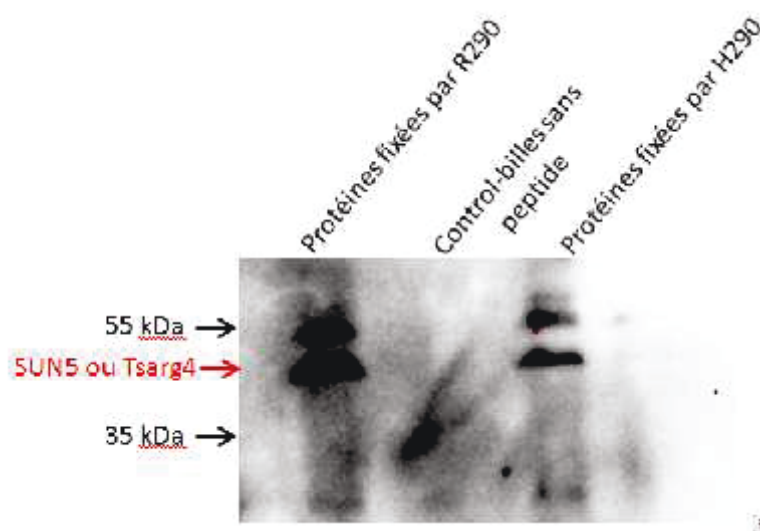
### **2.1.7) Western blot**

Les protéines sont chargées dans les puits avec le même volume et elles sont séparées sur un gel SDS-PAGE à 8%. Elles sont ensuite électrotransférées une nuit à 4°C à 40 mA sur une membrane de transfert Immobilon P (Millipore). Les membranes sont ensuite bloquées 1 heure avec du PBS Tween 0,1%, 5% lait (Biorad). Les anticorps primaires sont incubés 2 heures à température ambiante et après 3 lavages des membranes les anticorps secondaires sont incubés 1 heure à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois et incubée 1 min dans un substrat HRP (Biorad) et ensuite détectées avec le système (ChemiDoc XRS, Biorad).

## **2) Résultats**

Pour tester si la boucle contenant la mutation est responsable d'interactions avec d'autres protéines, j'ai réalisé des pull-downs avec les peptides correspondants à la boucle extramembranaire 280-313 de la protéine Dpy19l2 murine sous sa forme mutée et sous sa forme sauvage. Un pull down a été réalisé avec les protéines extraites de noyaux purifiés, issus de cellules de testicules de souris. Les fractions de protéines ayant été retenues par le peptide sauvage versus le peptide muté à révélé, en coloration bleu de coomassie, la

présence d'une bande importante d'environ 55 kDa fixée sur le peptide sauvage. Cette bande est très diminuée chez le muté (données non montrées). Dans une recherche classique, cette bande aurait été découpée, puis transmise à une plateforme de protéomique pour identification. Mais, de manière intéressante, la protéine SUN5 a un poids moléculaire proche de 55 kDa. J'ai donc réalisé ensuite un western blot contre la protéine Sun5 sur ces extraits de protéines issues du pull-down. Les anticorps dirigés contre la protéine Sun5 reconnaissent cette bande, ce qui suggère fortement que la protéine Sun5 interagit avec la protéine Dpy19l2. L'intensité de la bande correspondant à Sun5 est plus forte pour le pull-down effectué avec le peptide sauvage (R290) qu'avec celui effectué avec le peptide faux sens (H290) (Figure 36). Lorsqu'on utilise des billes sur lesquelles aucun peptide n'a été accroché, aucune bande de 55 KDa n'est observée. Cependant, il aurait été préférable de réaliser ce contrôle avec un peptide comportant les acides aminés placés de manière aléatoire. De plus, de manière étonnante, les anticorps dirigés contre Sun5 mettent en évidence deux bandes (Figure 35), Ce résultat suggère que la protéine Sun5 pourrait être l'objet de modifications post traductionnelles. Cependant, une liaison non spécifique de l'anticorps n'est pas exclue.



**Figure 36: La protéine Sun5 de souris interagit avec la boucle extra-membranaire 280-313 de la protéine Dpy19l2 murine. La mutation de l'arginine (R) en histidine (H) en position 305 de la protéine Dpy19l2 diminue fortement l'interaction de Sun5 avec le peptide issu de la protéine Dpy19l2.**

Pour confirmer ce résultat, j'ai transfecté des cellules HEK avec un vecteur portant le gène SUN5 humain étiqueté DDK et purifié les noyaux de ces cellules après 18 heures de transfection. J'ai refait un pull down avec l'extrait protéique enrichi en protéines du noyau et

montré que la protéine SUN5 interagit avec le peptide sauvage, alors que la fixation du peptide muté sur les billes diminue fortement l'interaction avec SUN5 (Figure 37).

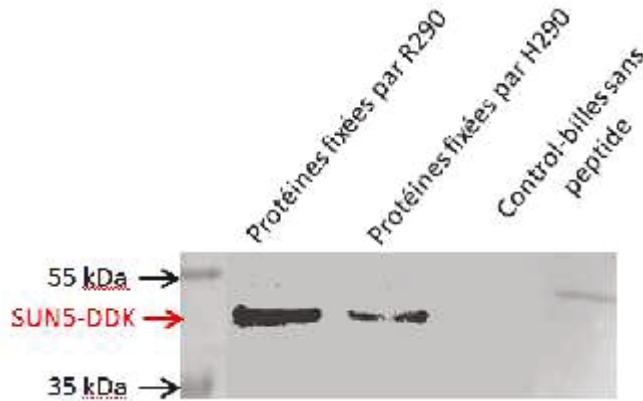


Figure 37: La protéine SUN5 humaine étiquetée DDK interagit avec la boucle extramembranaire 280-313 de la protéine Dpy19l2 murine. La mutation de l'arginine (R) en histidine (H) en position 305 de la protéine Dpy19l2 diminue fortement l'interaction de SUN5 avec le peptide issu de protéine Dpy19l2. Le contrôle correspond au pulldown réalisé avec des billes magnétiques sur lesquelles aucun peptide n'a été fixé.

#### 4) Discussion et perspectives

Nous avons montré dans ces trois expériences de pull down que:

- 1/ une protéine de 55 kDa se fixe sur le peptide 280-313 de la protéine Dpy19l2 murine
- 2/ Cette protéine correspond à la protéine Sun5 par western blot
- 3/ la protéine SUN5 humaine est retenue par des billes sur lesquelles sont fixées le peptide 280-313 de la protéine Dpy19l2 murine.
- 4/ La fixation de Sun5 est fortement réduite lorsque l'arginine en position 305 est mutée en histidine

L'ensemble de ces résultats suggère fortement que Dpy19l2 et Sun5 interagissent et que l'acide aminé 305 de la boucle 280-313 de la protéine Dpy19l2 murine joue un rôle crucial dans cette interaction.

Sur la boucle équivalente humaine, a été identifiée une mutation, la mutation R290->H, responsable d'une pathologie d'infertilité. Il est fort probable que cette mutation modifie l'interaction DPY19L2-SUN5. Cela peut expliquer que les individus homozygotes pour cette mutation présentent le phénotype de globozoospermie de type 1.

Au vu des résultats, le rôle proposé pour DPY19L2 est un rôle similaire à Samp1 qui stabilise un complexe LINC, composé des protéines nesprin -2G et SUN2, dans la membrane nucléaire. La perte de Samp1 entraîne une mauvaise migration du noyau et une mauvaise orientation du centrosome et donc une diminution de la migration des fibroblastes (**Gudise et al., 2011**). L'acroplaxome serait ainsi attaché à la membrane nucléaire via un complexe LINC faisant intervenir SUN5 et une protéine KASH non caractérisée et stabilisé par la protéine DPY19L2. La mutation diminue la force de l'interaction entre DPY19L2 et SUN5, ce qui pourrait entraîner une déstabilisation de la protéine SUN. En effet la protéine SUN5, qui n'a qu'un segment transmembranaire, subit probablement des forces d'arrachement importantes au cours de la phase d'élongation de l'acrosome. La protéine DPY19L2 possède quant à elle de nombreux segments transmembranaires qui lui assurent un bon ancrage dans cette membrane. Sa liaison à SUN5 devrait permettre d'ancrer assez solidement la protéine SUN5 dans la membrane nucléaire interne.

Les protéines DPY19L1 L2 L3 et L4 pourraient donc toutes jouer un rôle similaire à la protéine Samp1. Une étude de 2011 montre que l'extinction de l'expression de la protéine Dpy19l1 par ARN interférent entraîne un défaut de migration radiale des neurones glutaminergiques chez la souris (**Watanabe et al., 2011**). Les auteurs proposent pour expliquer cette absence de migration un défaut du cône de migration, nous proposons plutôt une perte de la stabilité de complexe LINC suite à l'absence de DPY19L1. En effet de manière intéressante le KO Sun1 présente les mêmes défauts de migration neuronale (**Zhang et al., 2009**).

Pour poursuivre ce travail il serait intéressant de confirmer la localisation de cette boucle extra membranaire. Nous avons proposé une localisation dans l'espace inter membranaire de l'enveloppe nucléaire mais cela reste à confirmer. Il serait intéressant de couper la protéine Sun5 en deux pour séparer les deux parties de la protéine qui se trouvent dans deux compartiments différents. Et ensuite il faudrait identifier quelle partie de la protéine interagit avec Dpy19l2.

Si Dpy19l2 a un rôle similaire à Samp1 alors la protéine possède probablement des interactions avec d'autres protéines. Par exemple, Samp1 interagit avec la protéine emerlin au niveau de doigts de zinc et cette interaction est nécessaire à la localisation de l'emeraldin dans la membrane nucléaire interne. Nous comptons donc rechercher les différents partenaires impliqués dans le complexe macromoléculaire nécessaire à l'ancrage de l'acrosome sur le noyau. La recherche d'autres partenaires se fera grâce à des techniques classiques comme le double hybride ou des pulldowns associés à la spectrométrie de masse. La détection de la

souris KO Dpy19l2 -/- sera certainement un plus dans ce travail qui promet d'être passionnant.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Ma thèse a eu comme fil d'Ariane un organite unique au spermatozoïde, l'acrosome. J'en ai étudié deux versants complémentaires que sont sa biogenèse via la protéine Dpy19l2 et sa physiologie via les phospholipase A2 secrétées :

- J'ai participé à l'identification du gène DPY19L2 impliqué dans une infertilité rare, la globozoospermie (*Harbuz et al., 2011*) et j'ai montré l'importance de la protéine correspondante dans la biogénèse de l'acrosome grâce au modèle de souris KO pour DPY19L2 (*Pierre et al., 2012*).

- Concernant les sPLA2, j'ai participé à démontrer que la sPLA2 de groupe X est localisée dans l'acrosome et qu'elle est capable de déclencher la réaction acrosomique spontanée au travers d'une boucle d'amplification (*Escoffier et al., 2010*). Finalement, j'ai démontré l'importance de la sPLA2 de groupe X dans l'élimination des spermatozoïdes à faible mobilité (*Escoffier et al., 2011*).

### **1) Projet sPLA2**

#### **1.1) Discussion et conclusion**

L'infertilité des couples est appelé à devenir un problème de santé publique majeur. Son augmentation est constante dans nos sociétés modernes. Les causes de l'augmentation de l'infertilité sont liées à deux facteurs majeurs, l'âge toujours plus tardif auquel les femmes ont leur premier enfant, associé à une fécondité féminine en diminution et l'augmentation de l'infertilité masculine lié à la présence toujours plus importante de leurs endocriniens dans l'environnement. Ces leurs endocriniens ont au moins deux impacts sur la fertilité masculine. Le premier concerne la mise en place des organes reproducteurs pendant le développement de l'embryon mâle (*Salian et al., 2011*); (*LaRocca et al., 2011*); (*Okada and Kai, 2008*) et le deuxième concerne la spermatogénèse des individus mâles adultes (*Zhang et al., 2012*). Le développement de nouvelles techniques d'aide à la procréation médicalement assistée (PMA) a permis de prendre en charge cette infertilité grandissante. La découverte de la technique de fécondation in vitro (FIV), une des toutes premières techniques de PMA, a été récompensée en 2010 par le prix Nobel de médecine. Cette technique a aussi eu un impact majeur sur le développement de nouvelles techniques de transgénèse, à l'origine de la production d'animaux délétés pour un gène. La PMA a débuté dans les années 1980 et son utilisation a connu une nette augmentation au cours de la dernière décennie où le recours à la



PMA a été multiplié par 2. Actuellement, dans les pays industrialisés environ 2% des naissances sont permises grâce à ces techniques. Le recours à la PMA est une démarche lourde pour le couple et plus particulièrement pour la femme qui reçoit des injections d'hormones afin de produire une plus grande quantité d'ovocytes au cours d'un seul cycle et dont les effets secondaires peuvent être importants. De plus, le taux de succès pour la FIV ou l'ICSI par cycle est inférieur à 30% et en France un couple sur deux sort du parcours de la PMA sans enfant (*Malizia et al., 2009*). L'amélioration des techniques de PMA afin d'en augmenter le rendement est donc un réel besoin. Les causes d'échecs peuvent impliquer :

- La qualité du spermatozoïde choisi. Les ovocytes peuvent par exemple être fécondés par des spermatozoïdes dont l'ADN a été altéré par des agents oxydants.

- La qualité de la stimulation hormonale

- La qualité de l'ovocyte

- La qualité de l'embryon obtenu après fécondation (soit par IVF, soit par ICSI). Ce paramètre est bien sûr très lié à la qualité des gamètes. Beaucoup d'efforts ont été produits pour améliorer l'environnement des embryons (méthode de culture, milieux, etc) en partant du principe qu'un développement harmonieux des embryons jusqu'au stade blastocyste était un élément fondamental de réussite.

- La qualité de l'endomètre de la mère. C'est un paramètre important qui a fait l'objet de nombreuses études.

Parmi toutes ces causes, un effort particulier doit être réalisé afin d'obtenir une meilleure connaissance des mécanismes qui régulent les différentes étapes de la physiologie du spermatozoïde et qui sont nécessaires à l'acquisition de son pouvoir fécondant.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'action de phospholipase A2 sécrétée mGX sur la physiologie du spermatozoïde. Cette phospholipase est présente dans l'acrosome des spermatozoïdes de souris, elle est sécrétée de manière paracrine par une sous population de spermatozoïdes lorsqu'ils réalisent la réaction acrosomique spontanée. Cette sécrétion augmente ainsi le taux de réaction acrosomique spontanée dans la population spermatique par effet paracrine.

J'ai montré que la phospholipase A2 sécrétée mGX est capable de réduire la mobilité spermatique, ce qui n'est pas le cas des phospholipases mGIIA, mGIID, mGIIE et mGV. J'ai aussi montré que l'action de mGX sur la mobilité spermatique passe par son activité enzymatique et entraîne une modification de la composition lipidique de la membrane plasmique après capacitation. MGX entraîne l'élimination des phosphatidylsérines de la

membrane plasmique qui ont été externalisés lors de la capacitation. J'ai aussi montré que mGX endogène a une action sur la mobilité spermatique ce qui est un argument en faveur de son action paracrine sur la population spermatique.

Finalement, mGX est aussi capable d'augmenter le nombre d'embryons obtenus par fécondation in vitro chez la souris. Elle pourrait donc potentiellement permettre d'améliorer la technique de fécondation in vitro. Elle fait à ce sujet l'objet d'un brevet déposé par le laboratoire.

## **1.2) Les perspectives à court termes concernant le projet sPLA2 spermatiques**

### **1.2.1) Recherche de la sPLA2 spécifique au spermatozoïde humain**

Ce travail pourrait se poursuivre par la recherche de la sPLA2 spécifique de l'acrosome du spermatozoïde humain et par l'évaluation de l'action de cette sPLA2 sur la réaction acrosomique spontanée des spermatozoïdes humains.

### **1.2.2) Identification du mécanisme de sélection des spermatozoïdes par mGX**

Les mécanismes impliqués dans l'action de la mGX sur la physiologie spermatique restent pour l'instant inconnus. Il serait donc intéressant de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la physiologie spermatique par les sPLA2. La population spermatique est hétérogène et seule une partie de cette population est sensible à l'action des sPLA2. Il faudrait déterminer quelles sont les caractéristiques de cette population spermatique. On peut supposer que cette population est constituée de spermatozoïdes ayant subi un fort stress oxydatif. On sait que le stress oxydatif est nécessaire à la maturation des spermatozoïdes au niveau de l'épididyme. En effet il induit une dernière étape de compaction de l'ADN spermatique par la création de ponts disulfures entre les protamines, ce qui a pour effet de protéger l'ADN du spermatozoïde des stress oxydatifs ultérieurs et ainsi de réduire la fragmentation de l'ADN. Parmi les cibles préférentielles des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) responsables du stress oxydatif, on retrouve les lipides et les acides nucléiques. On peut donc penser que les spermatozoïdes ayant subi un fort stress oxydatif présentent une peroxydation importante de leurs lipides membranaires ainsi qu'un ADN fragmenté pouvant entraîner la mort des embryons. L'action des sPLA2 permet peut-être d'éliminer cette population de spermatozoïdes altérés. Pour tester cela, il faudrait rechercher une corrélation entre sensibilité spermatique aux sPLA2 et peroxydation lipidique.

### **1.2.3) Quel est le profil lipidique des spermatozoïdes sensibles aux sPLA2s**

Un autre axe de recherche peut aussi être envisagé. Nous savons que la mGX a une meilleure activité enzymatique sur les phospholipides qui possèdent en position *sn*-2 des acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique (*Singer et al., 2002*), (*Pruzanski et al., 2005*). Il serait donc intéressant de tester si les spermatozoïdes sensibles à la mGX possèdent un profil lipidique particulier, responsable de la létalité des embryons. La sPLA2, en déclenchant la RA de ces spermatozoïdes, permettrait d'éliminer de la fécondation ces spermatozoïdes au profil lipidique anormal.

## **II) Projet Dpy19l2**

### **1.1) Discussion et conclusion**

Les mécanismes moléculaires régulant la spermatogénèse sont encore largement incompris. La spermatogénèse est un processus de différenciation cellulaire complexe qui va produire des spermatozoïdes à partir de cellules souches. La biogénèse de l'acrosome fait partie des étapes majeures de la spermatogénèse car elle contrôle aussi la mise en place de la manchette, organite particulier nécessaire à la mise en place du flagelle et en partie l'allongement du noyau. Au niveau du spermatozoïde mature, l'exocytose de cette vésicule a lieu au moment de la fécondation et libère des enzymes qui vont permettre au spermatozoïde de traverser la zone pellucide et d'atteindre l'ovocyte. L'absence de cet organite entraîne une infertilité masculine rare, la globozoospermie. Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'identification d'un gène impliqué dans la globozoospermie humaine. Ce gène a une expression spécifique dans le testicule et il est absent chez une majorité des patients globozoospermiques. J'ai ensuite étudié la localisation de la protéine Dpy19l2 dans les cellules germinales de souris en différenciation et j'ai caractérisé la souris KO pour Dpy19l2. J'ai montré que cette souris est un bon modèle d'étude de la globozoospermie humaine car les souris présentent le même phénotype reproductif que les hommes atteints de globozoospermie, leurs spermatozoïdes ont une tête ronde dépourvue d'acrosome. L'étude comparative de la spermiogénèse d'animaux KO pour Dpy19l2 avec des animaux WT a permis de mettre en évidence le rôle de Dpy19l2 dans l'étalement de l'acrosome sur le noyau. En son absence, l'ancrage de l'acrosome sur le noyau est fragilisé et il finit par se rompre au cours de l'élongation des spermatides. C'est plus spécifiquement l'acroplaxome, sur lequel est fixé

l'acrosome, qui se détache du noyau et conduit à la perte totale de l'acrosome en fin de spermiogénèse. Dpy1912 par sa localisation et son rôle de liaison entre le noyau et un organite du cytoplasme, via l'acroplaxome, une structure spécialisée du cytosquelette, présente une homologie fonctionnelle avec les protéines LINC (LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton). En effet, les protéines LINC sont impliquées dans la localisation et les mouvements du noyau dans la cellule, notamment lors de la migration cellulaire (**Zhang et al., 2009**). En accord avec cette hypothèse, j'ai dans une dernière partie montré que Dpy1912 interagit avec Sun5, une protéine LINC spécifique à la spermatogénèse.

Mes données permettent d'envisager un rôle de la protéine Dpy1912 comparable à celui de la protéine Samp1. Elle pourrait ainsi permettre l'ancrage dans la membrane nucléaire de complexes LINC. Ces complexes seraient formés par la protéine Sun5 dans la membrane nucléaire interne et par une protéine Kash encore indéterminée.

## **1.2) Les perspectives à court terme concernant le projet Dpy1912**

### **1.2.1) Confirmer la topologie de la protéine Dpy1912**

Dpy1912 est une protéine constituée de 8 à 10 segments transmembranaires et de deux longues parties N-terminale et C-terminale. Les données obtenues en microscopie confocale sur la localisation de Dpy1912 et Sun5 laissent supposer que la partie C-terminale est dans le nucléoplasme. Et, comme le nombre de domaine transmembranaire est très probablement pair, la partie N-terminale serait aussi du côté nucléoplasmique. Cependant la topologie de cette protéine reste à confirmer. Ceci pourrait être réalisé au moyen d'anticorps couplés à des billes d'or et dirigés contre les parties C-ter et N-ter de la protéine. La localisation des parties terminales de la protéine serait ensuite déterminée par microscopie électronique en fonction de la localisation des billes.

Un autre moyen de déterminer la topologie des parties C-ter et N-ter serait de produire la protéine Dpy1912 dans un système acellulaire à base de liposomes (technologie Synthélis). En faisant l'hypothèse que la protéine est toujours orientée de la même manière dans ces liposomes, une digestion enzymatique de la protéine suivie d'une analyse des peptides obtenue par spectrométrie de masse devraient permettre de savoir si ces deux extrémités sont localisées du même côté membranaire.

### **1.2.2) Rechercher les protéines partenaires de Dpy1912**

La recherche de partenaire de Dpy19l2 par pull down à l'aide d'un peptide correspondant à un domaine transmembranaire a permis d'identifier un premier partenaire de cette protéine, Sun5. Cette stratégie pourrait être appliquée pour les autres domaines extramembranaires de la protéine. Les bandes majoritaires qui se fixeront seront analysées en spectrométrie de masse.

Une autre approche est aussi envisagée avec la technique du double hybride spécifique pour les protéines membranaires (MYTH, Membrane Yeast Two-Hybrid) (*Snider et al., 2010*). Cette technique a permis de caractériser les protéines de l'enveloppe nucléaire partenaire du complexe sun/kash autres que les protéines LINC (*Gob et al., 2010a*). Ces résultats pourraient ensuite être confirmés par coimmunoprécipitation. Il sera ensuite intéressant de déterminer quelle partie de la protéine est impliquée dans l'interaction avec les protéines partenaires identifiées. Pour cela, la technique de pull down avec les parties extramembranaires de la protéine sera envisagée ainsi que l'utilisation d'extraits cellulaires exprimant la protéine identifiée. Ce travail nous permettra ainsi de cartographier précisément les sites d'interactions de Dyp19l2 avec la ou les protéines identifiées.

De l'immunohistochimie pourra aussi être réalisée sur les animaux KO pour DPY19L2 afin de voir si l'absence de Dpy19l2 entraîne des modifications dans la localisation de ces protéines partenaires. L'extinction des protéines partenaires peut aussi être envisagée par siRNA afin de voir si cela a une influence sur la localisation de la protéine Dpy19l2.

### **1.2.3) Etude de l'impact de Dpy19l2 sur la compaction et la fragmentation de l'ADN**

La compaction de l'ADN est une des étapes majeures de la spermatogénèse, elle est caractérisée par le remplacement de la majorité des histones par des protéines de transition puis par des protamines. Ce mécanisme est complexe et encore mal compris. Des modifications post-traductionnelles des histones telles que l'acétylation et la phosphorylation sont nécessaires à leur remplacement. Des études ont montré un lien entre la condensation de la chromatine et la présence de l'acrosome. Ainsi la thèque périnucléaire qui permet l'ancrage de l'acrosome dans le spermatozoïde à une interaction avec les protéines impliquées dans la compaction de l'ADN (*Aul and Oko, 2002*). L'invalidation de protéines de transition des histones (*tnp1*) provoque un ancrage anormal de l'acrosome (Shirley et al., 2004). De plus, l'ADN chez les patients globozoosperme est mal

condensé et il est observé une fragmentation de l'ADN plus importante (*Larson et al., 2001*), (*Brahem et al., 2011*).

Afin d'étudier la fragmentation de l'ADN liée à l'absence de DPY19L2, la première étape consistera à confirmer la fragmentation de l'ADN chez les animaux KO pour Dpy19l2. Cette étude pourrait être réalisée soit par la technique « TUNEL », soit par la technique « COMET ». La technique « TUNEL » permet la quantification de la fragmentation de l'ADN par cytométrie en flux après l'incorporation par la polymérase de nucléotides Fluo-dUTP aux extrémités des cassures de l'ADN. La technique « COMET » consiste en une électrophorèse des noyaux de spermatozoïdes après l'élimination des protamines. L'ADN va migrer d'autant plus qu'il est de petite taille. C'est donc la quantité et la distance parcourue par l'ADN qui permettent de déterminer le niveau de fragmentation de l'ADN. Si un taux important de fragmentation de l'ADN chez le KO se confirme, alors l'étude du mécanisme moléculaire reliant l'absence de Dpy19l2 et le défaut de condensation de l'ADN sera ensuite étudiée.

On pourrait étudier la présence des différentes protéines impliquées dans la compaction de l'ADN telles que les protéines TP1, TP2 et les protamines, par immunohistochimie.

#### **1.2.4) Améliorer les résultats d'ICSI pour les patients globozoospermiques**

Lors de la prise en charge des patients globozoospermiques dans les centres de PMA, la technique de l'ICSI leur est proposée. En effet, les spermatozoïdes ne possèdent pas d'acrosome et ne peuvent donc pas lyser la zone pellucide. De plus, la fusion entre les deux gamètes passe par des protéines spécifiques, les protéines Izumo, situées dans la membrane interne de l'acrosome et mises à jour suite à la réaction acrosomique. L'absence de l'acrosome ne permet pas la fusion de la tête du spermatozoïde avec l'ovocyte. Malheureusement, l'ICSI présente un faible taux de succès lorsqu'elle est réalisée avec des spermatozoïdes globozoospermiques car l'activation ovocytaire ne démarre pas (*Khalili et al., 1998*). Ce défaut de développement pourrait être dû à une absence de la protéine PLCzeta qui déclenche l'activation de l'embryon grâce à des vagues calciques (voir introduction). La recherche de la présence de cette enzyme chez le KO pourrait être effectuée. Si l'absence de cette protéine est confirmée, des tests d'ICSI avec des spermatozoïdes globozoospermiques avec l'ajout de PLCzeta pourraient être réalisés, afin d'évaluer le potentiel développemental des spermatozoïdes globozoospermiques en présence de PLCzeta.

### ***III) Conclusion générale***

J'ai été amenée à travailler sur des mécanismes qui assurent la capacité du spermatozoïde à être fécondant. Je me suis ainsi intéressée à la régulation de la mobilité spermatique, qui permet au spermatozoïde d'atteindre l'ovocyte, par les phospholipases sécrétées A2. Je me suis également intéressée à la biogénèse de l'acrosome, structure essentielle à la capacité du spermatozoïde à être fécondant. Mon travail a permis d'avancer dans la compréhension d'une infertilité masculine, la globozoospermie, ainsi que dans la biogénèse de l'acrosome. Ce travail pourrait aussi être le point de départ de l'étude d'une nouvelle famille de protéines, les protéines DPY19L (DPY19L1 à L4) impliquées dans l'ancrage de complexes LINC.

# **BIBLIOGRAPHIE**



- Abd-Elmaksoud,A. and Sinowatz,F. (2005). Expression and localization of growth factors and their receptors in the mammalian testis. Part I: Fibroblast growth factors and insulin-like growth factors. *Anat. Histol. Embryol.* **34**, 319-334.
- Aitken,R.J., Nixon,B., Lin,M., Koppers,A.J., Lee,Y.H., and Baker,M.A. (2007). Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J. Androl* **9**, 554-564.
- Akingbemi,B.T. (2005). Estrogen regulation of testicular function. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **3**, 51.
- Aksoy,Y., Aksoy,H., Altinkaynak,K., Aydin,H.R., and Ozkan,A. (2006). Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **75**, 75-79.
- Alasmari,W., Costello,S., Correia,J., Oxenham,S.K., Morris,J., Fernandes,L., Ramalho-Santos,J., Kirkman-Brown,J., Michelangeli,F., Publicover,S., and Barratt,C.L. (2013). Ca<sup>2+</sup> Signals Generated by CatSper and Ca<sup>2+</sup> Stores Regulate Different Behaviors in Human Sperm. *J. Biol. Chem.* **288**, 6248-6258.
- Alvarez,J.G. and Storey,B.T. (1995). Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **42**, 334-346.
- Arnoult,C., Cardullo,R.A., Lemos,J.R., and Florman,H.M. (1996a). Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13004-13009.
- Arnoult,C., Escoffier,J., Munch,L., Pierre,V., Hennebicq,S., Lambeau,G., and Ray,P. (2012). [Do phospholipases, key enzymes in sperm physiology, represent therapeutic challenges?]. *Med. Sci. (Paris)* **28**, 512-518.
- Arnoult,C., Kazam,I.G., Visconti,P.E., Kopf,G.S., Villaz,M., and Florman,H.M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 6757-6762.
- Arnoult,C., Zeng,Y., and Florman,H.M. (1996b). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J. Cell Biol.* **134**, 637-645.
- Audouard,C. and Christians,E. (2011). Hsp90beta1 knockout targeted to male germline: a mouse model for globozoospermia. *Fertil. Steril.* **95**, 1475-1477.
- Aul,R.B. and Oko,R.J. (2002). The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Dev. Biol.* **242**, 376-387.
- Bailey,J.L. and Storey,B.T. (1994). Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with the calcium fluorescent indicator, fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin, and 3- quinuclidinyl benzilate. *Mol. Reprod. Dev.* **39**, 297-308.
- Baldi,E., Casano,R., Falsetti,C., Krausz,C., Maggi,M., and Forti,G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl* **12**, 323-330.
- Baldi,E., Luconi,M., Bonaccorsi,L., and Forti,G. (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J. Reprod. Immunol.* **53**, 121-131.
- Balhorn,R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227.

- Ben Khelifa, M. Identification et caractérisation de gènes impliqués dans l'infertilité masculine. 25-3-2013.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Ben Khelifa, M., Zouari, R., Harbuz, R., Halouani, L., Arnoult, C., Lunardi, J., and Ray, P.F. (2011). A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol. Hum. Reprod.* *17*, 762-768.
- Biology of the Laboratory Mouse. 2013.  
Ref Type: Slide
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1980). Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev. Biol.* *76*, 185-202.
- Borrego-Pinto, J., Jegou, T., Osorio, D.S., Aurade, F., Gorjanacz, M., Koch, B., Mattaj, I.W., and Gomes, E.R. (2012). Samp1 is a component of TAN lines and is required for nuclear movement. *J. Cell Sci.* *125*, 1099-1105.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., and Saad, A. (2011). Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology* *77*, 1343-1348.
- Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.* *28*, 10-12.
- 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. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 679-687.
- Buch, C., Lindberg, R., Figueroa, R., Gudise, S., Onischenko, E., and Hallberg, E. (2009). An integral protein of the inner nuclear membrane localizes to the mitotic spindle in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *122*, 2100-2107.
- Buffone, M.G., Verstraeten, S.V., Calamera, J.C., and Doncel, G.F. (2009). High Cholesterol Content and Decreased Membrane Fluidity in Human Spermatozoa are Associated with Protein Tyrosine Phosphorylation and Functional Deficiencies. *J. Androl.* *30*, 552-558.
- Burke, B. and Stewart, C.L. (2002). Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 575-585.
- Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R., and Clore, G.M. (2001). Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J.* *20*, 4399-4407.
- Carson, A.R., Cheung, J., and Scherer, S.W. (2006). Duplication and relocation of the functional DPY19L2 gene within low copy repeats. *BMC. Genomics.* *7*, 45.
- Catena, R., Escoffier, E., Caron, C., Khochbin, S., Martianov, I., and Davidson, I. (2009). HMGB4, a novel member of the HMGB family, is preferentially expressed in the mouse testis and localizes to the basal pole of elongating spermatids. *Biol. Reprod.* *80*, 358-366.
- 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. *Dev. Biol.* *296*, 231-238.
- Chakalova, L., Debrand, E., Mitchell, J.A., Osborne, C.S., and Fraser, P. (2005). Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 669-677.

- Chang,H. and Suarez,S.S. (2011). Two distinct Ca(2+) signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biol. Reprod.* 85, 296-305.
- Chen,H. and Sampson,N.S. (1999). Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg alpha6beta1 integrin is the receptor for sperm fertilinbeta. *Chem. Biol.* 6, 1-10.
- Cheng,C.Y., Wong,E.W., Lie,P.P., Li,M.W., Mruk,D.D., Yan,H.H., Mok,K.W., Mannu,J., Mathur,P.P., Lui,W.Y., Lee,W.M., Bonanomi,M., and Silvestrini,B. (2011). Regulation of blood-testis barrier dynamics by desmosome, gap junction, hemidesmosome and polarity proteins: An unexpected turn of events. *Spermatogenesis.* 1, 105-115.
- Chikashige,Y., Tsutsumi,C., Yamane,M., Okamasa,K., Haraguchi,T., and Hiraoka,Y. (2006). Meiotic proteins bqt1 and bqt2 tether telomeres to form the bouquet arrangement of chromosomes. *Cell* 125, 59-69.
- Chung,J.J., Navarro,B., Krapivinsky,G., Krapivinsky,L., and Clapham,D.E. (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat. Commun.* 2:153, 153.
- Claw,K.G. and Swanson,W.J. (2012). Evolution of the egg: new findings and challenges. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 13, 109-125.
- Coutton,C., Zouari,R., Abada,F., Ben Khelifa,M., Merdassi,G., Triki,C., Escalier,D., Hesters,L., Mitchell,V., Levy,R., Sermondade,N., Boitrelle,F., Vialard,F., Satre,V., Hennebicq,S., Jouk,P.S., Arnoult,C., Lunardi,J., and Ray,P.F. (2012). MLPA and sequence analysis of DPY19L2 reveals point mutations causing globozoospermia. *Hum. Reprod.* 27, 2549-2558.
- Crisp,M., Liu,Q., Roux,K., Rattner,J.B., Shanahan,C., Burke,B., Stahl,P.D., and Hodzic,D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* 172, 41-53.
- Dam,A.H., Feenstra,I., Westphal,J.R., Ramos,L., van Golde,R.J., and Kremer,J.A. (2007a). Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update.* 13, 63-75.
- Dam,A.H., Kosciński,I., Kremer,J.A., Moutou,C., Jaeger,A.S., Oudakker,A.R., Tournaye,H., Charlet,N., Lagier-Tourenne,C., van Bokhoven,H., and Viville,S. (2007b). Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 813-820.
- Darios,F., Connell,E., and Davletov,B. (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J. Physiol.* 585, 699-704.
- Darszon,A., Acevedo,J.J., Galindo,B.E., Hernandez-Gonzalez,E.O., Nishigaki,T., Trevino,C.L., Wood,C., and Beltran,C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* 131, 977-988.
- DasGupta,S., Mills,C.L., and Fraser,L.R. (1993). Ca(2+)-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J. Reprod. Fertil.* 99, 135-143.
- De Gendt,K., Swinnen,J.V., Saunders,P.T., Schoonjans,L., Dewerchin,M., Devos,A., Tan,K., Atanassova,N., Claessens,F., Lecureuil,C., Heyns,W., Carmeliet,P., Guillou,F., Sharpe,R.M., and Verhoeven,G. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 1327-1332.
- De Lamirande,E. (2007). Semenogelin, the main protein of the human semen coagulum, regulates sperm function. *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 60-68.

- de Paula,R.C., Castro,H.C., Rodrigues,C.R., Melo,P.A., and Fuly,A.L. (2009). Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. *Protein Pept. Lett.* *16*, 899-907.
- Demmerle,J., Koch,A.J., and Holaska,J.M. (2012). The nuclear envelope protein emerlin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J. Biol. Chem.* *287*, 22080-22088.
- Denison,F.C., Smith,L.B., Muckett,P.J., O'Hara,L., Carling,D., and Woods,A. (2011). LKB1 is an essential regulator of spermatozoa release during spermiation in the mammalian testis. *PLoS. One.* *6*, e28306.
- Dennis,E.A., Cao,J., Hsu,Y.H., Magrioti,V., and Kokotos,G. (2011). Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* *111*, 6130-6185.
- Dieterich,K., Soto,R.R., Faure,A.K., Hennebicq,S., Ben Amar,B., Zahi,M., Perrin,J., Martinez,D., Sele,B., Jouk,P.S., Ohlmann,T., Rousseaux,S., Lunardi,J., and Ray,P.F. (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat. Genet.* *39*, 661-665.
- Ding,X., Xu,R., Yu,J., Xu,T., Zhuang,Y., and Han,M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev. Cell.* *12*, 863-872.
- Doherty,C.M., Tarchala,S.M., Radwanska,E., and De Jonge,C.J. (1995). Characterization of two second messenger pathways and their interactions in eliciting the human sperm acrosome reaction. *J. Androl.* *16*, 36-46.
- Doria,M., Salcini,A.E., Colombo,E., Parslow,T.G., Pelicci,P.G., and Di Fiore,P.P. (1999). The eps15 homology (EH) domain-based interaction between eps15 and hrb connects the molecular machinery of endocytosis to that of nucleocytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* *147*, 1379-1384.
- E Rurangwa,D.E.K.F.O.J.P.N. (2013). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture Volume 234*.
- Elinati,E., Kuentz,P., Redin,C., Jaber,S., Vanden Meerschaut,F., Makarian,J., Koscinski,I., Nasr-Esfahani,M.H., Demiroglu,A., Gurgan,T., Louanjli,N., Iqbal,N., Bisharah,M., Pigeon,F.C., Gourabi,H., De Briel,D., Brugnon,F., Gitlin,S.A., Grillo,J.M., Ghaedi,K., Deemeh,M.R., Tanhaei,S., Modarres,P., Heindryckx,B., Benkhalifa,M., Nikiforaki,D., Oehninger,S.C., De Sutter,P., Muller,J., and Viville,S. (2012). Globozoospermia is mainly due to DPY19L2 deletion via non-allelic homologous recombination involving two recombination hotspots. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 3695-3702.
- Escalier,D., Gallo,J.M., Albert,M., Meduri,G., Bermudez,D., David,G., and Schrevel,J. (1991). Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. *Development* *113*, 779-788.
- Escoffier,J., Boisseau,S., Serres,C., Chen,C.C., Kim,D., Stambouliau,S., Shin,H.S., Campbell,K.P., De Waard,M., and Arnoult,C. (2007). Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J. Cell Physiol.* *212*, 753-763.
- Escoffier,J., Jemel,I., Tanemoto,A., Taketomi,Y., Payre,C., Coatrieux,C., Sato,H., Yamamoto,K., Masuda,S., Pernet-Gallay,K., Pierre,V., Hara,S., Murakami,M., De Waard,M., Lambeau,G., and Arnoult,C. (2010). Group X phospholipase A2 is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1415-1428.

- Escoffier,J., Pierre,V., Jemel,I., Munch,L., Boudhraa,Z., Ray,P.F., De Waard,M., Lambeau,G., and Arnoult,C. (2011). Group X secreted phospholipase A2 specifically decreases sperm motility in mice. *J. Cell Physiol.* 226, 2601-2609.
- Evans,J.P. and Florman,H.M. (2002). The state of the union: the cell biology of fertilization. *Nat. Cell Biol.* 4 *Suppl*, s57-s63.
- Flesch,F.M., Brouwers,J.F., Nievelstein,P.F., Verkleij,A.J., van Golde,L.M., Colenbrander,B., and Gadella,B.M. (2001a). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J. Cell Sci.* 114, 3543-3555.
- Flesch,F.M., Wijnand,E., van de Lest,C.H., Colenbrander,B., van Golde,L.M., and Gadella,B.M. (2001b). Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* 60, 107-115.
- Fraser,L.R. (1987). Minimum and maximum extracellular Ca<sup>2+</sup> requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 81, 77-89.
- Fridkin,A., Mills,E., Margalit,A., Neufeld,E., Lee,K.K., Feinstein,N., Cohen,M., Wilson,K.L., and Gruenbaum,Y. (2004). Matefin, a *Caenorhabditis elegans* germ line-specific SUN-domain nuclear membrane protein, is essential for early embryonic and germ cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6987-6992.
- Frohnert,C., Schweizer,S., and Hoyer-Fender,S. (2011). SPAG4L/SPAG4L-2 are testis-specific SUN domain proteins restricted to the apical nuclear envelope of round spermatids facing the acrosome. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 207-218.
- Fujihara,Y., Satouh,Y., Inoue,N., Isotani,A., Ikawa,M., and Okabe,M. (2012). SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development* 139, 3583-3589.
- Fukami,K., Nakao,K., Inoue,T., Kataoka,Y., Kurokawa,M., Fissore,R.A., Nakamura,K., Katsuki,M., Mikoshiba,K., Yoshida,N., and Takenawa,T. (2001). Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida-induced acrosome reaction. *Science* 292, 920-923.
- Fukami,K., Yoshida,M., Inoue,T., Kurokawa,M., Fissore,R.A., Yoshida,N., Mikoshiba,K., and Takenawa,T. (2003). Phospholipase Cdelta4 is required for Ca<sup>2+</sup> mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* 161, 79-88.
- Gadella,B.M., Tsai,P.S., Boerke,A., and Brewis,I.A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 473-480.
- Gatewood,J.M., Cook,G.R., Balhorn,R., Bradbury,E.M., and Schmid,C.W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236, 962-964.
- 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.
- Gob,E., Schmitt,J., Benavente,R., and Alsheimer,M. (2010b). Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS. One.* 5, e12072.
- Gob,E., Schmitt,J., Benavente,R., and Alsheimer,M. (2010a). Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS. One.* 5, e12072.

- Gonzalez,Y., Saito,A., and Sazer,S. (2012). Fission yeast Lem2 and Man1 perform fundamental functions of the animal cell nuclear lamina. *Nucleus*. 3, 60-76.
- 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.
- Gromoll,J. and Simoni,M. (2005). Genetic complexity of FSH receptor function. *Trends Endocrinol. Metab* 16, 368-373.
- Gudise,S., Figueroa,R.A., Lindberg,R., Larsson,V., and Hallberg,E. (2011). Samp1 is functionally associated with the LINC complex and A-type lamina networks. *J. Cell Sci*. 124, 2077-2085.
- Gulaya,N.M., Margitich,V.M., Govseeva,N.M., Klimashevsky,V.M., Gorpynchenko,I.I., and Boyko,M.I. (2001). Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch. Androl*. 46, 169-175.
- Gupta,S.K., Bansal,P., Ganguly,A., Bhandari,B., and Chakrabarti,K. (2009). Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J. Reprod. Immunol*. 83, 50-55.
- Gupta,S.K. and Bhandari,B. (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J. Androl* 13, 97-105.
- Gutierrez,J.M., Ownby,C.L., and Odell,G.V. (1984). Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon* 22, 115-128.
- Hamada,A.J., Esteves,S.C., and Agarwal,A. (2013). A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics. (Sao Paulo)* 68 Suppl 1, 39-60.
- Haque,F., Lloyd,D.J., Smallwood,D.T., Dent,C.L., Shanahan,C.M., Fry,A.M., Trembath,R.C., and Shackleton,S. (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol. Cell Biol*. 26, 3738-3751.
- Haque,F., Mazzeo,D., Patel,J.T., Smallwood,D.T., Ellis,J.A., Shanahan,C.M., and Shackleton,S. (2010). Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J. Biol. Chem*. 285, 3487-3498.
- Harbuz,R., Zouari,R., Pierre,V., Ben Khelifa,M., Kharouf,M., Coutton,C., Merdassi,G., Abada,F., Escoffier,J., Nikas,Y., Vialard,F., Koscinski,I., Triki,C., Sermondade,N., Schweitzer,T., Zhioua,A., Zhioua,F., Latrous,H., Halouani,L., Ouafi,M., Makni,M., Jouk,P.S., Sele,B., Hennebicq,S., Satre,V., Viville,S., Arnoult,C., Lunardi,J., and Ray,P.F. (2011). A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am. J. Hum. Genet*. 88, 351-361.
- Harrison,R.A. and Gadella,B.M. (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* 63, 342-351.
- Hasan,S., Guttinger,S., Muhlhassser,P., Anderegg,F., Burgler,S., and Kutay,U. (2006). Nuclear envelope localization of human UNC84A does not require nuclear lamins. *FEBS Lett*. 580, 1263-1268.
- Heid,H., Figge,U., Winter,S., Kuhn,C., Zimbelmann,R., and Franke,W. (2002). Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp. Cell Res*. 279, 177-187.

- Ho,H.C. and Suarez,S.S. (2001). An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca(2+) store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* 65, 1606-1615.
- Ho,H.C., Tang,C.Y., and Suarez,S.S. (1999). Three-dimensional structure of the Golgi apparatus in mouse spermatids: a scanning electron microscopic study. *Anat. Rec.* 256, 189-194.
- Ho,K., Wolff,C.A., and Suarez,S.S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 345-350.
- Hodzic,D.M., Yeater,D.B., Bengtsson,L., Otto,H., and Stahl,P.D. (2004). Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J. Biol. Chem.* 279, 25805-25812.
- Holdcraft,R.W. and Braun,R.E. (2004). Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl* 27, 335-342.
- Holstein,A.F., Schirren,C., and Schirren,C.G. (1973). Human spermatids and spermatozoa lacking acrosomes. *J. Reprod. Fertil.* 35, 489-491.
- Honigberg,L. and Kenyon,C. (2000). Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC-40/DCC, UNC-73/Trio and DPY-19 proteins in *C. elegans*. *Development.* 127, 4655-4668.
- Huleihel,M. and Lunenfeld,E. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J. Androl* 6, 259-268.
- Hurst,S., Howes,E.A., Coadwell,J., and Jones,R. (1998). Expression of a testis-specific putative actin-capping protein associated with the developing acrosome during rat spermiogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 81-91.
- Ikonen,E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 470-477.
- Inaba,K. (2007). Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1101, 506-526.
- Inoue,N., Ikawa,M., Isotani,A., and Okabe,M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434, 234-238.
- Ito,C., Akutsu,H., Yao,R., Kyono,K., Suzuki-Toyota,F., Toyama,Y., Maekawa,M., Noda,T., and Toshimori,K. (2009). Oocyte activation ability correlates with head flatness and presence of perinuclear theca substance in human and mouse sperm. *Hum. Reprod.* 24, 2588-2595.
- Ito,C., Suzuki-Toyota,F., Maekawa,M., Toyama,Y., Yao,R., Noda,T., and Toshimori,K. (2004). Failure to assemble the peri-nuclear structures in GOPC deficient spermatids as found in round-headed spermatozoa. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 349-360.
- Jagannathan,S., Punt,E.L., Gu,Y., Arnoult,C., Sakkas,D., Barratt,C.L., and Publicover,S.J. (2002). Identification and localization of T-type voltage operated calcium channel subunits in human male germ cells - expression of multiple isoforms. *J. Biol. Chem.* 277, 8449-8456.
- Jiang,X.Z., Yang,M.G., Huang,L.H., Li,C.Q., and Xing,X.W. (2011). SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol.* 30, 875-882.
- Jones,R., James,P.S., Howes,L., Bruckbauer,A., and Klenerman,D. (2007). Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J. Androl.* 9, 438-444.

- Jose,O., Hernandez-Hernandez,O., Chirinos,M., Gonzalez-Gonzalez,M.E., Larrea,F., Almanza,A., Felix,R., Darszon,A., and Trevino,C.L. (2010). Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *395*, 530-534.
- Juneja,S.C. and van Deursen,J.M. (2005). A mouse model of familial oligoasthenoteratozoospermia. *Hum. Reprod.* *20*, 881-893.
- Jungnickel,M.K., Marrero,H., Birnbaumer,L., Lemos,J.R., and Florman,H.M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat. Cell Biol.* *3*, 499-502.
- Kaji,K., Oda,S., Shikano,T., Ohnuki,T., Uematsu,Y., Sakagami,J., Tada,N., Miyazaki,S., and Kudo,A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* *24*, 279-282.
- Kalish,B.T., Fallon,E.M., and Puder,M. (2012). A tutorial on fatty acid biology. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* *36*, 380-388.
- Kang-Decker,N., Mantchev,G.T., Juneja,S.C., McNiven,M.A., and van Deursen,J.M. (2001). Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science.* *294*, 1531-1533.
- Ketema,M., Wilhelmssen,K., Kuikman,I., Janssen,H., Hodzic,D., and Sonnenberg,A. (2007). Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell Sci.* *120*, 3384-3394.
- Khalili,M.A., Kalantar,S.M., Vahidi,S., and Ghafour-Zadeh,M. (1998). Failure of fertilization following intracytoplasmic injection of round-headed sperm. *Ann. Saudi. Med.* *18*, 408-411.
- Kierszenbaum,A.L. and Tres,L.L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* *67*, 271-284.
- Kierszenbaum,A.L., Tres,L.L., Rivkin,E., Kang-Decker,N., and van Deursen,J.M. (2004). The acroplaxome is the docking site of Golgi-derived myosin Va/Rab27a/b- containing proacrosomal vesicles in wild-type and Hrb mutant mouse spermatids. *Biol. Reprod.* *70*, 1400-1410.
- Kim,E., Yamashita,M., Nakanishi,T., Park,K.E., Kimura,M., Kashiwabara,S., and Baba,T. (2006). Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* *281*, 5634-5639.
- Kirichok,Y., Navarro,B., and Clapham,D.E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature.* *439*, 737-740.
- Kitamura,K., Iguchi,N., Kaneko,Y., Tanaka,H., and Nishimune,Y. (2004). Characterization of a novel postacrosomal perinuclear theca-specific protein, CYPT1. *Biol. Reprod.* *71*, 1927-1935.
- Krishnakumar,S.S., Radoff,D.T., Kummel,D., Giraudo,C.G., Li,F., Khandan,L., Baguley,S.W., Coleman,J., Reinisch,K.M., Pincet,F., and Rothman,J.E. (2011). A conformational switch in complexin is required for synaptotagmin to trigger synaptic fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 934-940.
- Kusz-Zamelczyk,K., Sajek,M., Spik,A., Glazar,R., Jedrzejczak,P., Latos-Bielenska,A., Kotecki,M., Pawelczyk,L., and Jaruzelska,J. (2013). Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-astheno-teratozoospermia. *J. Med. Genet.* *50*, 187-193.



- Kyttala,M., Tallila,J., Salonen,R., Kopra,O., Kohlschmidt,N., Paavola-Sakki,P., Peltonen,L., and Kestila,M. (2006). MKS1, encoding a component of the flagellar apparatus basal body proteome, is mutated in Meckel syndrome. *Nat. Genet.* *38*, 155-157.
- Lambrot,R., Jones,S., Saint-Phar,S., and Kimmins,S. (2012). Specialized distribution of the histone methyltransferase Ezh2 in the nuclear apical region of round spermatids and its interaction with the histone variant H1t2. *J. Androl* *33*, 1058-1066.
- LaRocca,J., Boyajian,A., Brown,C., Smith,S.D., and Hixon,M. (2011). Effects of in utero exposure to Bisphenol A or diethylstilbestrol on the adult male reproductive system. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.* *92*, 526-533.
- Larson,K.L., Brannian,J.D., Singh,N.P., Burbach,J.A., Jost,L.K., Hansen,K.P., Kreger,D.O., and Evenson,D.P. (2001). Chromatin structure in globozoospermia: a case report. *J. Androl* *22*, 424-431.
- Le Naour,F., Rubinstein,E., Jasmin,C., Prenant,M., and Boucheix,C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* *287*, 319-321.
- Lecuyer,C., Dacheux,J.L., Hermand,E., Mazeman,E., Rousseaux,J., and Rousseaux-Prevost,R. (2000). Actin-binding properties and colocalization with actin during spermiogenesis of mammalian sperm calicin. *Biol. Reprod.* *63*, 1801-1810.
- Lee,B., Vermassen,E., Yoon,S.Y., Vanderheyden,V., Ito,J., Alfandari,D., De Smedt,H., Parys,J.B., and Fissore,R.A. (2006). Phosphorylation of IP3R1 and the regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development.* *133*, 4355-4365.
- Lee,K.K., Starr,D., Cohen,M., Liu,J., Han,M., Wilson,K.L., and Gruenbaum,Y. (2002). Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* *13*, 892-901.
- Lefievre,L., Nash,K., Mansell,S., Costello,S., Punt,E., Correia,J., Morris,J., Kirkman-Brown,J., Wilson,S.M., Barratt,C.L., and Publicover,S. (2012). 2-APB-potentiated channels amplify CatSper-induced Ca<sup>2+</sup> signals in human sperm. *Biochem. J.* *448*, 189-200.
- Lin,Y.N., Roy,A., Yan,W., Burns,K.H., and Matzuk,M.M. (2007). Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* *27*, 6794-6805.
- Lishko,P.V., Botchkina,I.L., and Kirichok,Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature.* *471*, 387-391.
- Mack,S.R., Everingham,J., and Zaneveld,L.J. (1986). Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. *J. Exp. Zool.* *240*, 127-136.
- Malizia,B.A., Hacker,M.R., and Penzias,A.S. (2009). Cumulative live-birth rates after in vitro fertilization. *N. Engl. J. Med.* *360*, 236-243.
- Marengo,S.R. (2008). Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod. Sci.* *105*, 52-63.
- Marin-Briggiler,C.I., Gonzalez-Echeverria,F., Buffone,M., Calamera,J.C., Tezon,J.G., and Vazquez-Levin,M.H. (2003). Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil. Steril.* *79*, 1396-1403.

- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 2808-2813.
- Martinez,P. and Morros,A. (1996). Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci.* *1*, d103-d117.
- Masuda,S., Murakami,M., Matsumoto,S., Eguchi,N., Urade,Y., Lambeau,G., Gelb,M.H., Ishikawa,Y., Ishii,T., and Kudo,I. (2004). Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim. Biophys. Acta.* *1686*, 61-76.
- Maymon,B.B., Cohen-Armon,M., Yavetz,H., Yogev,L., Lifschitz-Mercer,B., Kleiman,S.E., Botchan,A., Hauser,R., and Paz,G. (2006). Role of poly(ADP-ribosyl)ation during human spermatogenesis. *Fertil. Steril.* *86*, 1402-1407.
- Mekhail,K. and Moazed,D. (2010). The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 317-328.
- Meyer-Ficca,M.L., Lonchar,J.D., Ihara,M., Meistrich,M.L., Austin,C.A., and Meyer,R.G. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol. Reprod.* *84*, 900-909.
- Meyer-Ficca,M.L., Scherthan,H., Burkle,A., and Meyer,R.G. (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* *114*, 67-74.
- Moreno,R.D. and Alvarado,C.P. (2006). The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol. Reprod. Dev.* *73*, 1430-1434.
- Moreno,R.D., Ramalho-Santos,J., Sutovsky,P., Chan,E.K., and Schatten,G. (2000). Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. *Biol. Reprod.* *63*, 89-98.
- Moretti,E., Scapigliati,G., Pascarelli,N.A., Baccetti,B., and Collodel,G. (2007). Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J. Androl* *9*, 641-649.
- Morris,G.E. (2000). Nuclear proteins and cell death in inherited neuromuscular disease. *Neuromuscul. Disord.* *10*, 217-227.
- Mou,L., Wang,Y., Li,H., Huang,Y., Jiang,T., Huang,W., Li,Z., Chen,J., Xie,J., Liu,Y., Jiang,Z., Li,X., Ye,J., Cai,Z., and Gui,Y. (2013). A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic azoospermia. *Hum. Genet.* *132*, 159-165.
- Muchir,A., Pavlidis,P., Bonne,G., Hayashi,Y.K., and Worman,H.J. (2007). Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 1884-1895.
- Nargeot,J. and Charnet,P. (1994). Diversité molculaire des canaux calciques : du gène à la fonction. *Médecine/Science* *10*, 1293-1308.
- Noblanc,A., Peltier,M., Damon-Soubeyrand,C., Kerchkove,N., Chabory,E., Vernet,P., Saez,F., Cadet,R., Janny,L., Pons-Rejraji,H., Conrad,M., Drevet,J.R., and Kocer,A. (2012). Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS. One.* *7*, e38565.

- Nolan, J.P. and Hammerstedt, R.H. (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* *11*, 670-682.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., and Stanton, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis.* *1*, 14-35.
- Okada, A. and Kai, O. (2008). Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. *Asian J. Androl.* *10*, 271-276.
- Oko, R. (1988). Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.* *39*, 169-182.
- Oko, R. and Sutovsky, P. (2009). Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod. Immunol.* *83*, 2-7.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update.* *12*, 417-435.
- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M.C., Sharma, R.K., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, A.J., Jr., and Alvarez, J.G. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.* *16*, 1912-1921.
- Onischenko, E. and Weis, K. (2011). Nuclear pore complex-a coat specifically tailored for the nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 293-301.
- Ozaki-Kuroda, K., Nakanishi, H., Ohta, H., Tanaka, H., Kurihara, H., Mueller, S., Irie, K., Ikeda, W., Sakai, T., Wimmer, E., Nishimune, Y., and Takai, Y. (2002). Nectin couples cell-cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions. *Curr. Biol.* *12*, 1145-1150.
- Pacey, A.A., Davies, N., Warren, M.A., Barratt, C.L., and Cooke, I.D. (1995). Hyperactivation may assist human spermatozoa to detach from intimate association with the endosalpinx. *Hum. Reprod.* *10*, 2603-2609.
- Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I., and Korenbaum, E. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* *295*, 330-339.
- Perrard, M.H., Vigier, M., Damestoy, A., Chapat, C., Silandre, D., Rudkin, B.B., and Durand, P. (2007). beta-Nerve growth factor participates in an auto/paracrine pathway of regulation of the meiotic differentiation of rat spermatocytes. *J. Cell Physiol.* *210*, 51-62.
- Pierre, V., Martinez, G., Coutton, C., Delaroche, J., Yassine, S., Novella, C., Pernet-Gallay, K., Hennebicq, S., Ray, P.F., and Arnoult, C. (2012). Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development.* *139*, 2955-2965.
- 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.
- Pradeepa, M.M. and Rao, M.R. (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* *63*, 1-10.

- Pruzanski,W., Lambeau,L., Lazdunsky,M., Cho,W., Kopilov,J., and Kuksis,A. (2005). Differential hydrolysis of molecular species of lipoprotein phosphatidylcholine by groups IIA, V and X secretory phospholipases A2. *Biochim. Biophys. Acta.* 1736, 38-50.
- Qi,H., Moran,M.M., Navarro,B., Chong,J.A., Krapivinsky,G., Krapivinsky,L., Kirichok,Y., Ramsey,I.S., Quill,T.A., and Clapham,D.E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1219-1223.
- Quill,T.A., Sugden,S.A., Rossi,K.L., Doolittle,L.K., Hammer,R.E., and Garbers,D.L. (2003). Hyperactivated sperm motility driven by CatSper2 is required for fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14869-14874.
- Ramalho-Santos,J., Schatten,G., and Moreno,R.D. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 67, 1043-1051.
- Rankin,T. and Dean,J. (2000). The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev. Reprod.* 5, 114-121.
- Ren,D., Navarro,B., Perez,G., Jackson,A.C., Hsu,S., Shi,Q., Tilly,J.L., and Clapham,D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* 413, 603-609.
- Rodrigo G. (2012). Purification of Phospholipases A2 from American Snake Venoms. R.S.S.-S.A.M.K.G.S.G.A.A.M.C.p.A.S.C.A.C.-N.K.D.Z.J.P.Z.L.A.C.a.A.M.S.Sta'beli, ed.
- Rodrigues,V.M., Marcussi,S., Cambraia,R.S., de Araujo,A.L., Malta-Neto,N.R., Hamaguchi,A., Ferro,E.A., Homs-Brandeburgo,M.I., Giglio,J.R., and Soares,A.M. (2004). Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon* 44, 305-314.
- Rolland,M., Le Moal,J., Wagner,V., Royere,D., and De Mouzon,J. (2013). Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26,609 men close to general population between 1989 and 2005 in France. *Hum. Reprod.* 28, 462-470.
- Rothballer,A., Schwartz,T.U., and Kutay,U. (2013). LINCing complex functions at the nuclear envelope: What the molecular architecture of the LINC complex can reveal about its function. *Nucleus.* 4, 29-36.
- Rousseaux-Prevost,R., Lecuyer,C., Drobecq,H., Sergheraert,C., Dacheux,J.L., and Rousseaux,J. (2003). Characterization of boar sperm cytoskeletal cylicin II as an actin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303, 182-189.
- 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.
- Roux,K.J., Crisp,M.L., Liu,Q., Kim,D., Kozlov,S., Stewart,C.L., and Burke,B. (2009). Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2194-2199.
- Rowat,A.C., Foster,L.J., Nielsen,M.M., Weiss,M., and Ipsen,J.H. (2005). Characterization of the elastic properties of the nuclear envelope. *J. R. Soc. Interface* 2, 63-69.
- Roy,A., Lin,Y.N., and Matzuk,M.M. (2006). Shaping the sperm head: an ER enzyme leaves its mark. *J. Clin. Invest* 116, 2860-2863.

- Royal, M., Mann, G.E., and Flint, A.P. (2000). Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet. J.* *160*, 53-60.
- Russell, L.D., Bartke, A., and Goh, J.C. (1989). Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am. J. Anat.* *184*, 179-189.
- Salian, S., Doshi, T., and Vanage, G. (2011). Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring--an overview. *Reprod. Toxicol.* *31*, 359-362.
- Sato, H., Taketomi, Y., Isogai, Y., Miki, Y., Yamamoto, K., Masuda, S., Hosono, T., Arata, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Hara, S., Kudo, I., and Murakami, M. (2010). Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 1400-1414.
- Schirmer, E.C., Florens, L., Guan, T., Yates, J.R., III, and Gerace, L. (2003). Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* *301*, 1380-1382.
- Schroeder, F., Jefferson, J.R., Kier, A.B., Knittel, J., Scallen, T.J., Wood, W.G., and Hapala, I. (1991). Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetic pools. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *196*, 235-252.
- Schutz, W., Alsheimer, M., Ollinger, R., and Benavente, R. (2005). Nuclear envelope remodeling during mouse spermiogenesis: postmeiotic expression and redistribution of germline lamin B3. *Exp. Cell Res.* *307*, 285-291.
- Seifer, I., Fellous, M., and Bignon, Y. (1999). [Genetic causes of male infertility]. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* *57*, 301-308.
- Shao, X., Tarnasky, H.A., Schalles, U., Oko, R., and van der Hoorn, F.A. (1997). Interactional cloning of the 84-kDa major outer dense fiber protein Odf84. Leucine zippers mediate associations of Odf84 and Odf27. *J. Biol. Chem.* *272*, 6105-6113.
- Shumaker, D.K., Lee, K.K., Tanhehco, Y.C., Craigie, R., and Wilson, K.L. (2001). LAP2 binds to BAF/DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO J.* *20*, 1754-1764.
- Singer, A.G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G., and Gelb, M.H. (2002). Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* *277*, 48535-48549.
- Singh, G. (1992). Ultrastructural features of round-headed human spermatozoa. *Int. J. Fertil.* *37*, 99-102.
- Slaton, J.W., Unger, G.M., Sloper, D.T., Davis, A.T., and Ahmed, K. (2004). Induction of apoptosis by antisense CK2 in human prostate cancer xenograft model. *Mol. Cancer Res.* *2*, 712-721.
- Snider, J., Kittanakom, S., Damjanovic, D., Curak, J., Wong, V., and Stagljar, I. (2010). Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat. Protoc.* *5*, 1281-1293.
- Soares, A.M., Sestito, W.P., Marcussi, S., Stabeli, R.G., Andriao-Escarso, S.H., Cunha, O.A., Vieira, C.A., and Giglio, J.R. (2004). Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in Bothrops moojeni venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 258-270.
- Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T.V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., Herrmann, H., Blum, H., Engelkamp, D., Stewart, C.L., Leonhardt, H., and Joffe, B. (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* *152*, 584-598.

Sosa,B.A., Rothballer,A., Kutay,U., and Schwartz,T.U. (2012). LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* 149, 1035-1047.

Sosnik,J., Miranda,P.V., Spiridonov,N.A., Yoon,S.Y., Fissore,R.A., Johnson,G.R., and Visconti,P.E. (2009). Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J. Cell Sci.* 122, 2741-2749.

Spermiogenese [http: and lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20LYON/cris-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/GenitalMasculin/gm5rd.html](http://and.lecannabiculteur.free.fr/SITES/UNIV%20LYON/cris-cirs-wnts.univ-lyon1.fr/Polycopies/HistologieFonctionnelleOrganes/GenitalMasculin/gm5rd.html).

Stambouliau,S., Moutin,M.J., Treves,S., Pochon,N., Grunwald,D., Zorzato,F., De Waard,M., Ronjat,M., and Arnoult,C. (2005). Junctate, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels. *Dev. Biol.* 286, 326-337.

Starr,D.A. and Fridolfsson,H.N. (2010). Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 421-444.

Stauss,C.R., Votta,T.J., and Suarez,S.S. (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.* 53, 1280-1285.

Stewart-Hutchinson,P.J., Hale,C.M., Wirtz,D., and Hodzic,D. (2008). Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp. Cell Res.* 314, 1892-1905.

Stewart,C.L., Roux,K.J., and Burke,B. (2007). Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. *Science* 318, 1408-1412.

Stuurman,N., Heins,S., and Aebi,U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* 122, 42-66.

Suarez,S.S. and Dai,X. (1992). Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.* 46, 686-691.

Suarez,S.S. and Pacey,A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update.* 12, 23-37.

Suzuki-Toyota,F., Ito,C., Toyama,Y., Maekawa,M., Yao,R., Noda,T., and Toshimori,K. (2004). The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 361-371.

Tanigawa,M., Miyamoto,K., Kobayashi,S., Sato,M., Akutsu,H., Okabe,M., Mekada,E., Sakakibara,K., Miyado,M., Umezawa,A., and Miyado,K. (2008). Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 150-155.

Tavilani,H., Doosti,M., Nourmohammadi,I., Mahjub,H., Vaisiraygani,A., Salimi,S., and Hosseinipanah,S.M. (2007). Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 77, 45-50.

Therien,I., Bousquet,D., and Manjunath,P. (2001). Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 65, 41-51.

Tomes,C.N. (2007). Molecular mechanisms of membrane fusion during acrosomal exocytosis. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65:275-91., 275-291.

- Tomes,C.N., Michaut,M., De Blas,G., Visconti,P., Matti,U., and Mayorga,L.S. (2002). SNARE complex assembly is required for human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* 243, 326-338.
- Toshimori,K. (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res.* 293, 177-187.
- Tovich,P.R., Sutovsky,P., and Oko,R.J. (2004). Novel aspect of perinuclear theca assembly revealed by immunolocalization of non-nuclear somatic histones during bovine spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 71, 1182-1194.
- Tsai,P.S., de Vries,K.J., Boer-Brouwer,M., Garcia-Gil,N., van Gestel,R.A., Colenbrander,B., Gadella,B.M., and van Haeften,T. (2007). Syntaxin and VAMP association with lipid rafts depends on cholesterol depletion in capacitating sperm cells. *Mol. Membr. Biol.* 24, 313-324.
- Tsai,P.S., Garcia-Gil,N., van Haeften,T., and Gadella,B.M. (2010). How pig sperm prepares to fertilize: stable acrosome docking to the plasma membrane. *PLoS. One.* 5, e11204.
- Tubb,B., Mulholland,D.J., Vogl,W., Lan,Z.J., Niederberger,C., Cooney,A., and Bryan,J. (2002). Testis fascin (FSCN3): a novel paralog of the actin-bundling protein fascin expressed specifically in the elongate spermatid head. *Exp. Cell Res.* 275, 92-109.
- UWA Blue Histology. Histology sections through the testis seminiferous tubule. 2013.  
Ref Type: Slide
- Vadnais,M.L., Galantino-Homer,H.L., and Althouse,G.C. (2007). Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch. Androl* 53, 109-123.
- van der Heijden,G.W., Derijck,A.A., Ramos,L., Giele,M., van,d., V, and de Boer,P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev. Biol.* 298, 458-469.
- van der Heijden,G.W., Dieker,J.W., Derijck,A.A., Muller,S., Berden,J.H., Braat,D.D., van,d., V, and de Boer,P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech. Dev.* 122, 1008-1022.
- van Gestel,R.A., Brewis,I.A., Ashton,P.R., Helms,J.B., Brouwers,J.F., and Gadella,B.M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol. Hum. Reprod.* 11, 583-590.
- Van Steirteghem,A., Liebaers,I., and Camus,M. (1999). [Genetic male infertility]. *Rev. Prat.* 49, 1309-1313.
- Verhoeven,G. (2005). A Sertoli cell-specific knock-out of the androgen receptor. *Andrologia* 37, 207-208.
- Visconti,P.E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 667-668.
- Visconti,P.E., Bailey,J.L., Moore,G.D., Pan,D., Olds-Clarke,P., and Kopf,G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121, 1129-1137.
- Visconti,P.E., Galantino-Homer,H., Ning,X., Moore,G.D., Valenzuela,J.P., Jorgez,C.J., Alvarez,J.G., and Kopf,G.S. (1999a). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate

transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* **274**, 3235-3242.

Visconti,P.E., Ning,X., Fornes,M.W., Alvarez,J.G., Stein,P., Connors,S.A., and Kopf,G.S. (1999b). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* **214**, 429-443.

Visconti,P.E., Westbrook,V.A., Chertihin,O., Demarco,I., Sleight,S., and Diekman,A.B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J. Reprod. Immunol.* **53**, 133-150.

von Bulow,M., Rackwitz,H.R., Zimbelmann,R., and Franke,W.W. (1997). CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp. Cell Res.* **233**, 216-224.

Walensky,L.D. and Snyder,S.H. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* **130**, 857-869.

Wang,H., Liu,J., Cho,K.H., and Ren,D. (2009). A novel, single, transmembrane protein CATSPERG is associated with CATSPER1 channel protein. *Biol. Reprod.* **81**, 539-544.

Wang,Q., Du,X., Cai,Z., and Greene,M.I. (2006). Characterization of the structures involved in localization of the SUN proteins to the nuclear envelope and the centrosome. *DNA Cell Biol.* **25**, 554-562.

Wang,X.F., Zhou,C.X., Shi,Q.X., Yuan,Y.Y., Yu,M.K., Ajonuma,L.C., Ho,L.S., Lo,P.S., Tsang,L.L., Liu,Y., Lam,S.Y., Chan,L.N., Zhao,W.C., Chung,Y.W., and Chan,H.C. (2003). Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat. Cell Biol.* **5**, 902-906.

Ward,C.R., Storey,B.T., and Kopf,G.S. (1992). Activation of a Gi protein in mouse sperm membranes by solubilized proteins of the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **267**, 14061-14067.

Wassarman,P.M. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* **96**, 175-183.

Watanabe,K., Takebayashi,H., Bepari,A.K., Esumi,S., Yanagawa,Y., and Tamamaki,N. (2011). Dpy19l1, a multi-transmembrane protein, regulates the radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development.* **138**, 4979-4990.

Worman,H.J. and Bonne,G. (2007). "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res.* **313**, 2121-2133.

Xiao,N., Kam,C., Shen,C., Jin,W., Wang,J., Lee,K.M., Jiang,L., and Xia,J. (2009). PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J. Clin. Invest.* **119**, 802-812.

Xu,M., Xiao,J., Chen,J., Li,J., Yin,L., Zhu,H., Zhou,Z., and Sha,J. (2003). Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 9-17.

Xu,X., Toselli,P.A., Russell,L.D., and Seldin,D.C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nat. Genet.* **23**, 118-121.

Yan,W. (2009). Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Mol. Cell Endocrinol.* **306**, 24-32.



- Yanagimachi,R., Katayose,H., Killian,G., Lee,C.N., Carrell,D.T., and Huang,T.T. (1993). Moderate heat treatment increases the penetrability of zonae pellucidae of salt-stored mammalian oocytes by spermatozoa. *Zygote*. *1*, 345-351.
- Yao,R., Ito,C., Natsume,Y., Sugitani,Y., Yamanaka,H., Kuretake,S., Yanagida,K., Sato,A., Toshimori,K., and Noda,T. (2002). Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11211-11216.
- Ye,Q. and Worman,H.J. (1996). Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1. *J. Biol. Chem.* *271*, 14653-14656.
- Yildiz,Y., Matern,H., Thompson,B., Allegood,J.C., Warren,R.L., Ramirez,D.M., Hammer,R.E., Hamra,F.K., Matern,S., and Russell,D.W. (2006). Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J. Clin. Invest.* *116*, 2985-2994.
- Yoshinaga,K. and Toshimori,K. (2003). Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc. Res. Tech.* *61*, 39-45.
- Yu,J., Lei,K., Zhou,M., Craft,C.M., Xu,G., Xu,T., Zhuang,Y., Xu,R., and Han,M. (2011). KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1061-1073.
- Zalata,A., Hassan,A., Christophe,A., Comhaire,F., and Mostafa,T. (2009). Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient. *Int. J. Androl.* *33*, 528-535.
- Zastrow,M.S., Vlcek,S., and Wilson,K.L. (2004). Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J. Cell Sci.* *117*, 979-987.
- Zhang,G.L., Zhang,X.F., Feng,Y.M., Li,L., Huynh,E., Sun,X.F., Sun,Z.Y., and Shen,W. (2012). Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.*
- Zhang,Q., Zhang,F., Chen,X.H., Wang,Y.Q., Wang,W.Q., Lin,A.A., Cavalli-Sforza,L.L., Jin,L., Huo,R., Sha,J.H., Li,Z., and Su,B. (2007). Rapid evolution, genetic variations, and functional association of the human spermatogenesis-related gene NYD-SP12. *J. Mol. Evol.* *65*, 154-161.
- Zhang,X., Lei,K., Yuan,X., Wu,X., Zhuang,Y., Xu,T., Xu,R., and Han,M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron*. *64*, 173-187.
- Ziyyat,A., Rubinstein,E., Monier-Gavelle,F., Barraud,V., Kulski,O., Prenant,M., Boucheix,C., Bomsel,M., and Wolf,J.P. (2006). CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J. Cell Sci.* *119*, 416-424.

# ANNEXES

Les autres articles auxquels j'ai participé





# Group X phospholipase A<sub>2</sub> is released during sperm acrosome reaction and controls fertility outcome in mice

Jessica Escoffier,<sup>1,2</sup> Ikram Jemel,<sup>3,4</sup> Akemi Tanemoto,<sup>5</sup> Yoshitaka Taketomi,<sup>5,6</sup> Christine Payre,<sup>3,4</sup> Christelle Coatrieux,<sup>3,4</sup> Hiroyasu Sato,<sup>5,6</sup> Kei Yamamoto,<sup>6</sup> Seiko Masuda,<sup>5,6</sup> Karin Pernet-Gallay,<sup>1,2</sup> Virginie Pierre,<sup>1,2</sup> Shuntaro Hara,<sup>5</sup> Makoto Murakami,<sup>5,6,7</sup> Michel De Waard,<sup>1,2</sup> Gérard Lambeau,<sup>3,4</sup> and Christophe Arnoult<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grenoble Institute of Neuroscience, INSERM U836, Grenoble, France. <sup>2</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

<sup>3</sup>Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS — UMR 6097, Valbonne, France. <sup>4</sup>Université de Nice–Sophia Antipolis, Valbonne, France.

<sup>5</sup>Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Tokyo, Japan. <sup>6</sup>Biomembrane Signaling Project, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan. <sup>7</sup>PRESTO, Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan.

**Ejaculated mammalian sperm must undergo a maturation process called capacitation before they are able to fertilize an egg. Several studies have suggested a role for members of the secreted phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>) family in capacitation, acrosome reaction (AR), and fertilization, but the molecular nature of these enzymes and their specific roles have remained elusive. Here, we have demonstrated that mouse group X sPLA<sub>2</sub> (mGX) is the major enzyme present in the acrosome of spermatozoa and that it is released in an active form during capacitation through spontaneous AR. mGX-deficient male mice produced smaller litters than wild-type male siblings when crossed with mGX-deficient females. Further analysis revealed that spermatozoa from mGX-deficient mice exhibited lower rates of spontaneous AR and that this was associated with decreased in vitro fertilization (IVF) efficiency due to a drop in the fertilization potential of the sperm and an increased rate of aborted embryos. Treatment of sperm with sPLA<sub>2</sub> inhibitors and antibodies specific for mGX blocked spontaneous AR of wild-type sperm and reduced IVF success. Addition of lysophosphatidylcholine, a catalytic product of mGX, overcame these deficiencies. Finally, recombinant mGX triggered AR and improved IVF outcome. Taken together, our results highlight a paracrine role for mGX during capacitation in which the enzyme primes sperm for efficient fertilization and boosts premature AR of a likely phospholipid-damaged sperm subpopulation to eliminate suboptimal sperm from the pool available for fertilization.**

## Introduction

Spermatogenesis within the testis leads to the production of morphologically mature sperm that are still functionally immature, immotile, and incompetent for fertilization. Before fertilization, sperm should undergo two major series of important morphological, biochemical, and functional modifications, one within the epididymis and the other within the female reproductive tract after ejaculation. During their transit through the epididymis, sperm acquire progressive motility and prime the signaling pathways that will eventually orchestrate capacitation. The full fertilization potential of spermatozoa will be reached in vivo only after capacitation, a final maturation process occurring in the female reproductive tract. Capacitation was discovered by Austin and Chang in the early 1950s and is defined as a complex set of molecular events that allow ejaculated sperm to fertilize an egg (1, 2). Fertilization then starts with sperm binding on the zona pellucida (ZP), followed by the physiological acrosome reaction (AR), which is essential for sperm-oocyte fusion. Only fully capacitated spermatozoa can bind to the zona-intact egg and are competent for AR (3). However, during capacitation, a large fraction of sperm (30%–40%) undergoes a premature AR called spontaneous AR (4). This process is currently interpreted as a sperm malfunction and suggests that a subpopu-

tion of ejaculated sperm does not tolerate the above-described final maturation process. The endogenous factors responsible for spontaneous AR and the possible physiological reasons for this process have not been identified. Indeed, the molecular mechanisms of sperm capacitation are still poorly understood, even after 50 years of intensive research (5–10). If capacitation clearly depends on cellular redox activity, ion fluxes, and protein phosphorylations, this process is also characterized by a strong dependence on the lipid membrane composition and lipid metabolism. Indeed, major lipid remodeling events of sperm including reorganization of the plasma membrane and formation of membrane subdomains, have been observed during capacitation at both chemical and biophysical levels (10, 11). During capacitation, the most well-known modification of the plasma membrane is cholesterol efflux, which plays a major role in sperm maturation both in vivo and in vitro (5). Other major changes during capacitation include remodeling of lipid rafts, efflux of desmosterol, and changes in sterol sulfates, phospholipids, sphingomyelin, and ceramides, all of them likely contributing to the increase in membrane fluidity by changing lipid packing and thereby providing heterogeneity of the sperm population (5, 12–14). If several families of lipolytic enzymes are involved in these lipid modifications (15), phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) are likely to be important, because of their abundant expression in male reproductive organs (16–19) and because of their great diversity of action, from phospholipid remodeling and lipid mediator release to inflammation and host defense (20, 21).

**Authorship note:** Gérard Lambeau and Christophe Arnoult are co-senior authors.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Citation for this article:** *J Clin Invest.* 2010;120(5):1415–1428. doi:10.1172/JCI40494.



PLA<sub>2</sub>s catalyze the hydrolysis of phospholipids at the *sn*-2 position to generate free fatty acids and lysophospholipids, which are precursors of different lipid mediators, such as eicosanoids and platelet-activating factor (PAF) (23, 23). PLA<sub>2</sub> metabolites either leave the cellular membrane and are involved in different cellular signaling pathways or accumulate in the leaflet of the membrane and change its biophysical properties. PLA<sub>2</sub>s constitute one of the largest families of lipid-hydrolyzing enzymes and have been classified into several groups (20). Based on their respective structure and cellular localization, PLA<sub>2</sub>s can be divided into 2 major sets of proteins: a set of 15 distinct Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent intracellular PLA<sub>2</sub>s and another set of 10 Ca<sup>2+</sup>-dependent secreted PLA<sub>2</sub>s (sPLA<sub>2</sub>s). The PLA<sub>2</sub> family also includes a set of intracellular and secreted forms of PAF acetylhydrolase. Deciphering the biological functions of each PLA<sub>2</sub> member is challenging. Studies over the last decade have shown that intracellular PLA<sub>2</sub>s and extracellular PLA<sub>2</sub>s are involved in the production of various lipid mediators in different tissues and cell types, these lipid mediators being important in numerous and diverse physiological and pathophysiological conditions (21–24).

Several intracellular and secreted PLA<sub>2</sub>s in the testis and other male reproductive organs have been described, but their respective functions in reproduction still remain largely obscure. Group VIII B PAF acetylhydrolase and group VIA calcium-independent PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub>β) have been found in sperm, and the corresponding deficient mice present defects in early spermatogenesis and sperm motility, respectively (17, 18, 25). Previous studies have also shown that several sPLA<sub>2</sub>s including group IIA, IIC, IID, IIE, IIF, V, and X are present in various genital male organs, such as testis, epididymis, vas deferens, seminal vesicles, and prostate, but their exact functions are still speculative (16, 26). More particularly, mouse group IIE, V, and X sPLA<sub>2</sub>s (mGIIE, mGV, and mGX, respectively) have been localized in spermatogenic cells, but their presence in mature sperm and their specific functions in capacitation and/or fertilization remain to be determined.

Irrespective of the above, different studies have shown that one or several uncharacterized PLA<sub>2</sub>s play an important role in capacitation, AR, and the early steps of fertilization, including sperm binding and sperm-oocyte fusion (19). First, several biochemical studies have demonstrated the presence of one or several low-molecular-weight Ca<sup>2+</sup>-dependent sPLA<sub>2</sub>-like proteins in spermatozoa from different species, yet their molecular nature still remains elusive (27–29). As for capacitation, a spontaneous release of PAF during capacitation has been linked to activation of spontaneous AR, but the enzyme responsible for PAF release has not been identified (30). As for AR, induction of AR using nonphysiological and physiological stimuli such as Ca<sup>2+</sup> ionophore, progesterone, and ZP produces the release of arachidonic acid and/or lysophosphatidylcholine (LPC) and is prevented by PLA<sub>2</sub> inhibitors on sperm from various species (31–34). However, the identity of the PLA<sub>2</sub>(s) involved in this exocytotic event has not yet been revealed, and the use of poorly specific PLA<sub>2</sub> inhibitors such as Ro-31-4493, aristolochic acid, or ONO RS-82 in these studies cannot provide any clue (31, 33, 34). PLA<sub>2</sub> activation during AR is also supported by the fact that LPC and fatty acids accelerate or promote exocytosis (35, 36). Finally, LPC improves sperm binding on ZP (37) and sperm-oocyte fusion (38), supporting the notion that one or several PLA<sub>2</sub>s including an sPLA<sub>2</sub> protein may be important for capacitation and fertilization.

In this study, we have used mouse group X sPLA<sub>2</sub>-deficient mice (referred to herein as mGX<sup>-/-</sup> mice), sPLA<sub>2</sub> inhibitors, and recom-

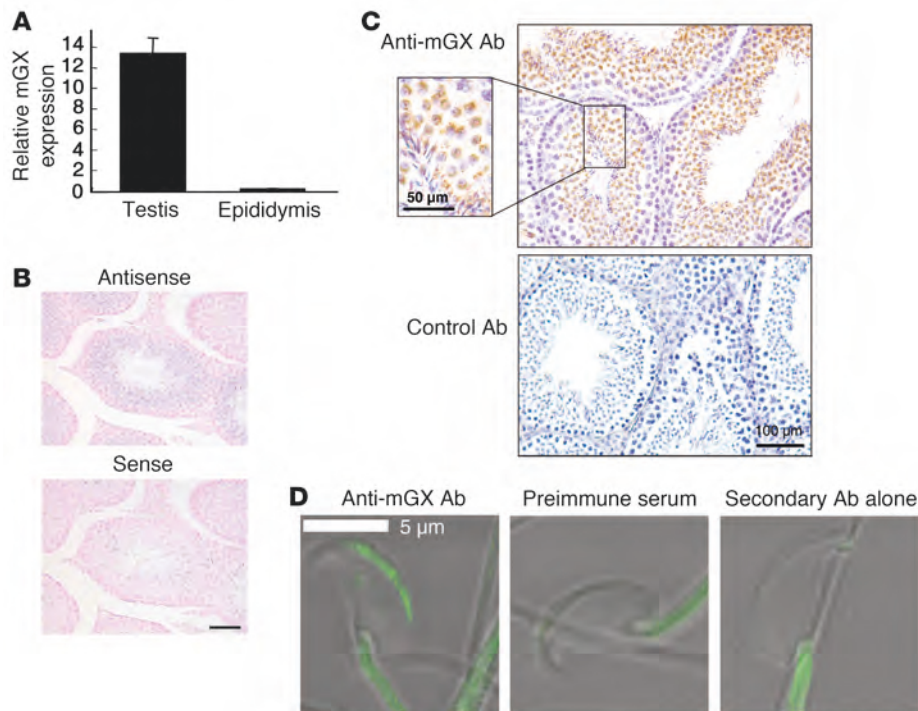
binant mGX protein to identify what we believe to be a novel role of this particular sPLA<sub>2</sub>. We demonstrated that mGX sPLA<sub>2</sub> is the major enzyme present in the acrosome of mature spermatozoa and is released as an active enzyme during AR. mGX controls sperm physiology at two levels: first, during capacitation, by triggering spontaneous AR of a specific subpopulation of sperm; and second, during the subsequent fertilization by improving the sperm fertilization potential.

In a companion to the present article, Sato et al. (39) show that another enzyme, the mouse group III sPLA<sub>2</sub>, is highly expressed in the proximal epithelium of epididymis and that mice deficient for this sPLA<sub>2</sub> exhibit male infertility because of profound defects in sperm maturation within the epididymis. Together, our results show that two catalytically active sPLA<sub>2</sub>s are expressed in different locations within the reproductive male organs and exert nonredundant functions at two major steps of maturation of spermatozoa — during their transit through the epididymis and during capacitation — with important impacts on male fertility in both cases.

## Results

*mGX sPLA<sub>2</sub> is specifically expressed in late spermatogenic cells and in the acrosome of mature spermatozoa.* Quantitative RT-PCR analysis showed that the mRNA coding for mGX is present at much higher levels in the testis than epididymis (Figure 1A). Furthermore, in situ hybridization on tissue sections of the testis from 8-week-old C57BL/6J mice showed that mGX mRNA is present in late spermatogenic cells (spermatocytes and spermatids, but not spermatogonia) in the seminiferous tubules (Figure 1B). In accordance with these results, immunohistochemistry experiments on parallel tissue sections with a specific polyclonal mGX antibody showed the presence of mGX in spermatocytes and spermatids, but not in spermatogonia (Figure 1C). In magnified views (Figure 1C, inset), scattered signals with crescent and elongated shapes were evident in spermatocytes and spermatids, suggesting that mGX is localized in the acrosomal area. In human testis, immunohistochemistry experiments showed that group X sPLA<sub>2</sub> was also present in spermatocytes and spermatids (Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI40494DS1), in contrast to group IIF and V sPLA<sub>2</sub>s, which were present at different locations (Supplemental Figure 1, B and C). To further support the acrosomal location of mGX sPLA<sub>2</sub>, spermatozoa from caudae epididymis were stained with anti-mGX or control antibodies. A strong and specific immunofluorescent signal for mGX was confined to the sperm head, and more particularly in the acrosomal crescent zone (Figure 1D).

*mGX sPLA<sub>2</sub> is released during AR.* To further demonstrate that mGX is an acrosomal protein, we monitored its release from mouse mature sperm undergoing in vitro capacitation in conditions known to induce spontaneous AR of 30%–40% of the sperm population over a 90-minute incubation time. The presence of mGX and other sPLA<sub>2</sub>s possibly found in the acrosome was first determined using specific and sensitive (down to 5 pg per assay for mGX) time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIAs) recently developed for the different mouse sPLA<sub>2</sub>s (40). Our experiments demonstrated that the amount of mGX protein was increased in the supernatant, with a concomitant decrease in the pellet during capacitation (Figure 2A). Moreover, inducing AR by the Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 resulted in a 2.5-fold increase in the amount of mGX released at 90 minutes of capacitation. Remarkably, the sum amount of mGX was constant during capacitation, showing

**Figure 1**

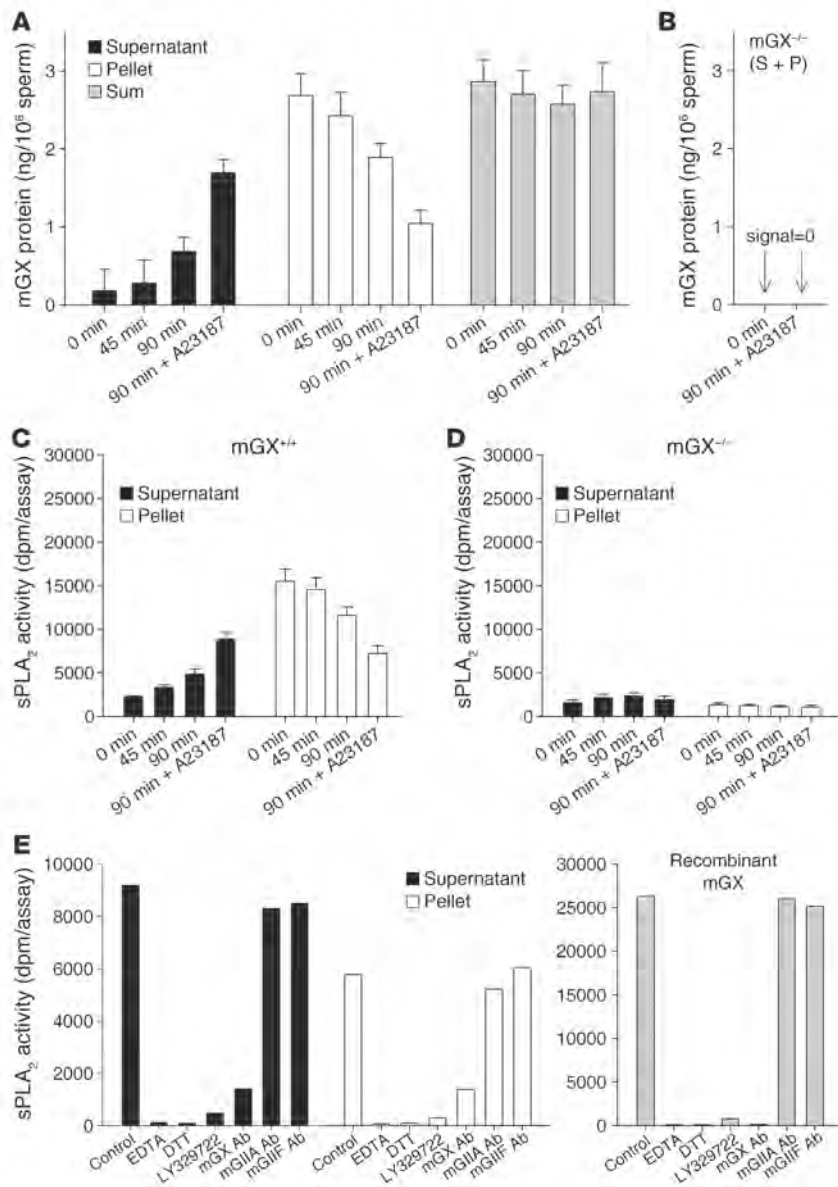
Expression of mGX sPLA<sub>2</sub> in mouse spermatogenic cells. **(A)** Quantitative RT-PCR analysis shows that mGX mRNA is expressed in the testis, but only minimally in the epididymis. **(B)** In situ hybridization. Sections of testis from 8-week-old C57BL/6J mice were hybridized with antisense and sense probes for mGX. Positive signal for mGX was detected in spermatogenic cells (spermatocytes and spermatids, but not spermatogonia) in the seminiferous tubules. Original magnification,  $\times 200$ . Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **(C)** Immunohistochemistry. Sections of the testis from 8-week-old C57BL/6J mice were stained with anti-mGX antibody or control antibody. Intense staining was found in spermatocytes and spermatids in the seminiferous tubules but not in spermatogonia (original magnification,  $\times 200$ ). In magnified views, scattered signals with crescent and elongated shapes were evident in spermatocytes and spermatids, suggesting labeling in the acrosomal area. **(D)** Spermatozoa from caudae epididymis were stained with anti-mGX antibody or control antibodies. Immunofluorescent signal for mGX sPLA<sub>2</sub> was confined to the sperm head. Note that the staining along the tail was nonspecific, since sperm treated with preimmune serum or only secondary antibody were also stained.

the accuracy of our measurements in supernatants and pellets (Figure 2A). The fact that mGX redistributed from the pellet to the supernatant during capacitation or after A23187-induced AR clearly demonstrates that the enzyme is present in the acrosome of mature sperm. When mGX<sup>-/-</sup> sperm were used in similar capacitation experiments, no mGX TR-FIA signal was detected, validating the specificity of the results (Figure 2B). We also examined the presence of other sPLA<sub>2</sub>s including mGIIA, mGIID, mGIIE, mGIIF, and mGV in the sperm of various mouse strains (C57BL/6J, BALB/c, and OF1), and none of these sPLA<sub>2</sub>s were detected (Supplemental Figure 2). We then monitored the sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity in supernatant and pellet during capacitation by a sensitive sPLA<sub>2</sub> enzymatic assay utilizing radiolabeled *E. coli* membranes as a substrate. In accordance with the mGX sPLA<sub>2</sub> TR-FIA data, the sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity was increased in the supernatant and decreased in the pellet (Figure 2C). The respective increases and decreases in sPLA<sub>2</sub> activity during capacitation were entirely due to mGX, since only barely detectable and constant levels of enzymatic activity were measured with mGX<sup>-/-</sup> sperm (Figure 2D). The fact that the sPLA<sub>2</sub> activity specifically released during capacitation was due

to mGX sPLA<sub>2</sub> was further confirmed by inhibition with an antibody raised against mGX, with no effect of antibodies raised against mGIIA or mGIIF (Figure 2E). Finally, the enzymatic activity was of an sPLA<sub>2</sub> type, but not cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) or iPLA<sub>2</sub> $\beta$ , since these latter enzymes are known to be inactive on *E. coli* membranes (41, 42) and since the measured PLA<sub>2</sub> activity was fully blocked by EDTA, DTT, and LY329722 (Figure 2E), which are broad but specific inhibitors of sPLA<sub>2</sub>s (43, 44). Parallel experiments performed with recombinant mGX protein and the above inhibitors further demonstrate that mGX is responsible for most of the sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity in supernatant and pellet (Figure 2E). Together, these results demonstrate that mGX is the major sPLA<sub>2</sub> present in the acrosome of mature mouse sperm, that the enzyme is released during AR in an active form, and that it contributes to most if not all of the sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity released in the sperm bathing medium during capacitation.

*Disruption of the Pla2g10 gene coding for mGX sPLA<sub>2</sub> results in an impaired fertility outcome.* Although no obvious reproductive phenotype has been reported for mGX<sup>-/-</sup> male mice (45, 46), we reinvestigated this point by studying the fertility outcome in natural mating and in vitro fertilization (IVF) experiments. Both male and female mGX<sup>-/-</sup> mice were fertile when mated with WT littermate C57BL/6J mice (Figure 3A). However, the average litter size of mGX<sup>-/-</sup> male mice crossed with mGX<sup>-/-</sup>

females ( $5.70 \pm 0.42$  pups,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ ) was slightly lower than that of WT littermates ( $7.75 \pm 0.49$  pups,  $n = 37$ ) (Figure 3A), suggesting a lower fertility of mGX<sup>-/-</sup> animals. Because of the large amount of mGX in the sperm acrosome, we reinvestigated the role of mGX in sperm by performing IVF with mGX<sup>-/-</sup> sperm and WT oocytes. We scored the different types of egg/oocytes obtained 24 hours after mixing sperm with oocytes: unfertilized oocytes, 2-cell embryos (normal stage), and aborted embryos; and we used the 2-cell embryo values to measure fertility (47), since 2-cell embryos are appropriate for transfer into the female tract (Figure 3, B and C). As a control, we confirmed that oocytes incubated without sperm in M16 medium for 24 hours did not present any type of cell division (data not shown). In IVF experiments, the fertilizing potential of mGX<sup>-/-</sup> sperm was clearly impaired when compared with that of WT littermate sperm (Figure 3D). Indeed, the rate of 2-cell embryos was reduced from  $67.6\% \pm 2.2\%$  ( $n = 13$ ) to  $37.6\% \pm 3.9\%$  ( $n = 11$ ,  $P < 0.01$ ) for mGX<sup>+/+</sup> sperm and mGX<sup>-/-</sup> sperm, respectively. Furthermore, the rate of aborted embryos increased from  $7.7\% \pm 1.6\%$  to  $11.9\% \pm 1.9\%$  ( $n = 11$ ,  $P < 0.05$ ) for mGX<sup>+/+</sup> and mGX<sup>-/-</sup> sperm, respectively. Finally, the



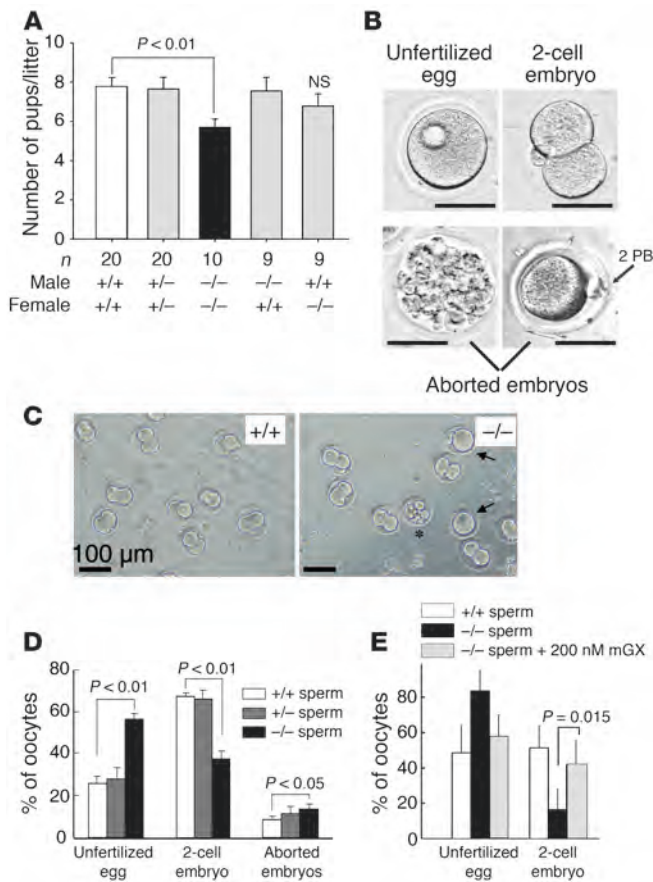
**Figure 2**

Catalytically active mGX sPLA<sub>2</sub> is released from sperm during AR. (A) Total amount of mGX protein measured by TRF-IA in supernatants and cell pellets of WT sperm during capacitation (up to 90 minutes) and after AR triggered by addition of the Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 (5 μM) between 60 and 90 minutes. “Sum” corresponds to the total amount of mGX in both fractions at various times. (B) Similar assays using mGX<sup>-/-</sup> sperm, showing no mGX signal (sum of supernatant and pellet [S + P]) before capacitation (0 minutes) and after A23187-induced AR. (C) Total sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity measured using *E. coli* radiolabeled enzymatic assays in supernatants and cell pellets of WT sperm during capacitation (n = 5). (D) Similar enzymatic assays using mGX<sup>-/-</sup> sperm, showing no variation in sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity throughout capacitation in both fractions (n = 4). (E) sPLA<sub>2</sub> enzymatic activities of supernatants and cell pellets of WT sperm (at 90 minutes + A23187) and of recombinant mGX (0.1 nM, n = 2) are inhibited by EDTA (20 mM), DTT (10 mM), LY329722 (10 μM), and anti-mGX antibody (IgG fraction, 5 μg), but not by anti-mGIIA and anti-mGIIF antibodies (n = 2).

percentage of unfertilized oocytes for mGX<sup>-/-</sup> sperm was more than 2-fold higher than that for mGX<sup>+/+</sup> sperm. Interestingly, the impaired fertility of mGX<sup>-/-</sup> sperm was rescued by a short incubation of mGX<sup>-/-</sup> sperm with recombinant mGX protein at the end of the capacitation period (Figure 3E; see also the detailed protocol of IVF with treated sperm in Supplemental Figure 3).

*Endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> regulates spontaneous AR.* The fact that mGX sPLA<sub>2</sub> is released during AR and lysophospholipids and fatty acids, two products of sPLA<sub>2</sub>, activity can activate AR (35, 48) makes possible that the mGX released during the early time points of capacitation boosts spontaneous AR in a paracrine manner. To explore this possibility, we compared the kinetics of spontaneous AR in sperm from mGX<sup>+/+</sup> and mGX<sup>-/-</sup> mice. The early onset of spontaneous AR was unchanged between mGX<sup>+/+</sup> and mGX<sup>-/-</sup> sperm. However, the level of spontaneous AR of mGX<sup>-/-</sup> sperm occurring during the late phase of capacitation (55–90 minutes) was markedly lower than that of mGX<sup>+/+</sup> sperm (Figure 4A) and reached a plateau during the late phase of capacitation (55–90 minutes);

a statistically significant difference was found between 55 and 90 minutes of capacitation for WT sperm ( $P < 5 \times 10^{-3}$ ), while no significant difference was observed for deficient sperm ( $P = 0.94$ ). Addition of recombinant mGX in the capacitation medium of mGX<sup>-/-</sup> sperm at 80 minutes rescued a normal level of spontaneous AR at 90 minutes (Figure 4A). To confirm the involvement of mGX in spontaneous AR, we evaluated the capacity of exogenous recombinant mGX to trigger AR during capacitation (Figure 4, B and C). The mGX recombinant enzyme was highly effective on noncapacitated sperm, since concentrations as low as 0.2 nM led to a 2-fold increase in spontaneous AR, while a maximal increase in AR up to approximately 65% was observed at 500 nM (Figure 4B). Noncapacitated sperm and sperm capacitated for 90 minutes were equally sensitive to a 10-minute incubation with mGX, indicating that mGX retained the ability to induce AR throughout capacitation (Figure 4C). Together, our results demonstrate that spontaneous AR occurring during the late phase of capacitation is controlled by the secretion and paracrine activity of mGX. Our



**Figure 3**

The lack of mGX sPLA<sub>2</sub> in sperm affects male fertility. **(A)** The litter sizes of intercrosses between male and female mGX-deficient mice are lower than those of littermate WT mice. Note that male and female mGX<sup>-/-</sup> mice produced normal litter size when mated with WT C57BL/6J mice **(B)** Pictures of the different stages obtained after IVF at 24 hours: unfertilized oocytes; 2-cell embryos (normal development); aborted embryos corresponding to oocytes with either multiple and uncontrolled divisions or presenting a second polar body (2 PB) but no cell division (arrows). Scale bars: 50  $\mu$ m. **(C)** Images of embryo development 24 hours after fertilization: +/+, WT sperm crossed with WT oocytes; -/-, mGX<sup>-/-</sup> sperm crossed with WT oocytes; arrows show unfertilized oocytes and asterisks show aborted embryos. **(D)** IVFs performed with mGX<sup>-/-</sup> sperm and WT oocytes have a lower rate of 2-cell embryos and higher rate of aborted embryos compared with IVFs performed with sperm from WT (+/+) or heterozygous (+/-) littermates and WT oocytes ( $n = 11$ ). **(E)** The low fertilizing potential of mGX<sup>-/-</sup> sperm is rescued by recombinant mGX. IVF was performed by mixing WT oocytes with (a) WT sperm from littermates ( $n = 4$ ); (b) mGX<sup>-/-</sup> sperm ( $n = 4$ ); or (c) mGX<sup>-/-</sup> sperm briefly treated with 200 nM mGX (treatment for 10 minutes at the end of the capacitation period [gray bars,  $n = 4$ ]). The development of eggs was evaluated after 24 hours by counting the different stages.

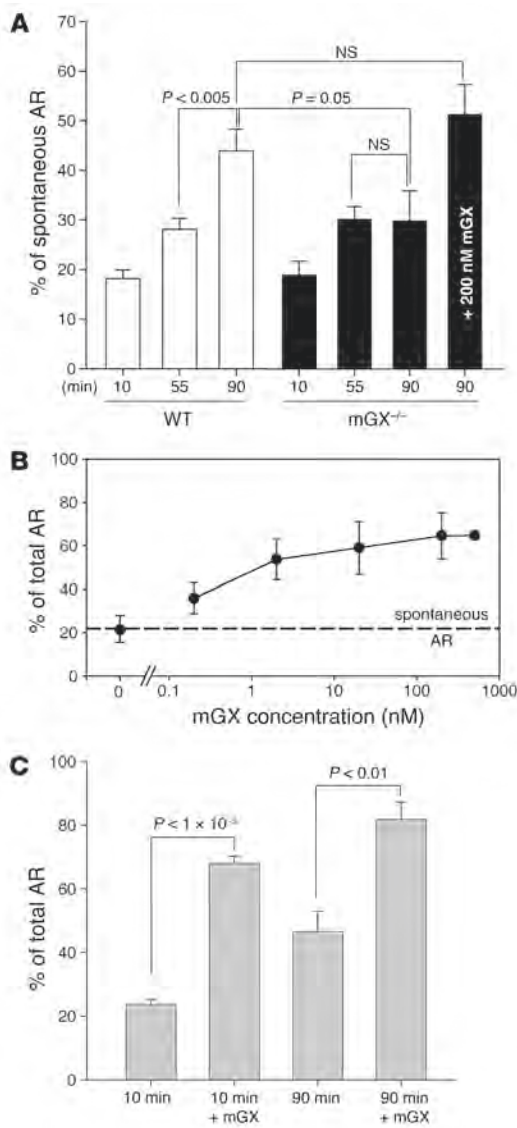
results also indicate that mGX modifies the ratio between two sperm subpopulations: the acrosome-reacted and the non-acrosome-reacted sperm. Importantly, we observed that very high concentrations of recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> did not induce AR of the entire sperm population. Indeed, about 35% of the noncapacitated sperm population remained fully resistant to mGX when treated for 10 minutes, while about 18% of sperm remained resistant to mGX treatment when first capacitated for 90 minutes.

mGX sPLA<sub>2</sub> triggers AR via its catalytic activity and independently of cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise. To determine whether the catalytic activity of mGX is required for the induction of AR, we first tested the catalytically inactive H48Q mutant of mGX, which has less than 0.1% of WT catalytic activity (49). This mutant was unable to trigger AR of noncapacitated sperm (Figure 5A). We then tested the effect of recombinant pro-mGX, the zymogen form of mGX, which has very low enzymatic activity (50). Pro-mGX was also unable to trigger AR at 500 nM (Figure 5A). Finally, we tested LY329722, a specific sPLA<sub>2</sub> inhibitor (compound A in ref. 44), and found that this inhibitor blocked the sPLA<sub>2</sub>-induced AR of capacitated sperm at 1  $\mu$ M (Figure 5B). Together, these results demonstrate that the catalytic activity of mGX is essential for inducing AR. We also wondered whether Ca<sup>2+</sup> influx was required for mGX-induced AR. To address this question, sperm were loaded during 30 minutes in a noncapacitating medium with BAPTA-AM, a cell-permeant and fast chelator of Ca<sup>2+</sup>, known to block cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and AR induced by ZP3 (51). Sperm were then washed and incubated for another 30 minutes to allow for a complete de-esterification of BAPTA-AM. At the end of this procedure, sperm were immobile, indicating effi-

cient chelation of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> by BAPTA. Sperm were then incubated with mGX for 10 minutes and scored for AR. The effect of mGX was not prevented by BAPTA, indicating that calcium signaling is not involved in sPLA<sub>2</sub>-induced AR (Figure 5C).

Acrosome-reacted and non-acrosome-reacted sperm treated with mGX sPLA<sub>2</sub> present a normal ultrastructural morphology. The subpopulation of sperm that is resistant to mGX-dependent AR is obviously the one that can fertilize eggs. This is because only non-acrosome-reacted sperm can bind to the egg and cross the ZP. It thus appeared important to check the ultrastructural integrity of the acrosome of sperm resistant to mGX treatment by electron microscopy. We found that non-acrosome-reacted sperm treated for 10 minutes with 200 nM mGX (Figure 6A) presented ultrastructural characteristics that were indistinguishable from those of untreated sperm (Figure 6B), without any apparent defect in the acrosomal area. We next analyzed the morphology of acrosome-reacted sperm. There are 3 morphological criteria by which an AR can be evaluated as normal: (a) the outer acrosomal membrane should present vesiculation; (b) the plasma membrane should fuse with the outer acrosomal membrane; and (c) the fused membrane should present a characteristic double-hairpin shape at the base of the acrosome (52). We compared A23187-induced and mGX-induced AR. All the sperm that were acrosome reacted by A23187 presented a complete AR exhibiting the 3 above morphological criteria (data not shown). The sperm that were acrosome reacted by mGX were judged as normal on the basis of the same criteria (Figure 6C). We also observed very early stages of AR-like cavitation of the acrosomal matrix (Figure 6D). Together, our analyses indicate





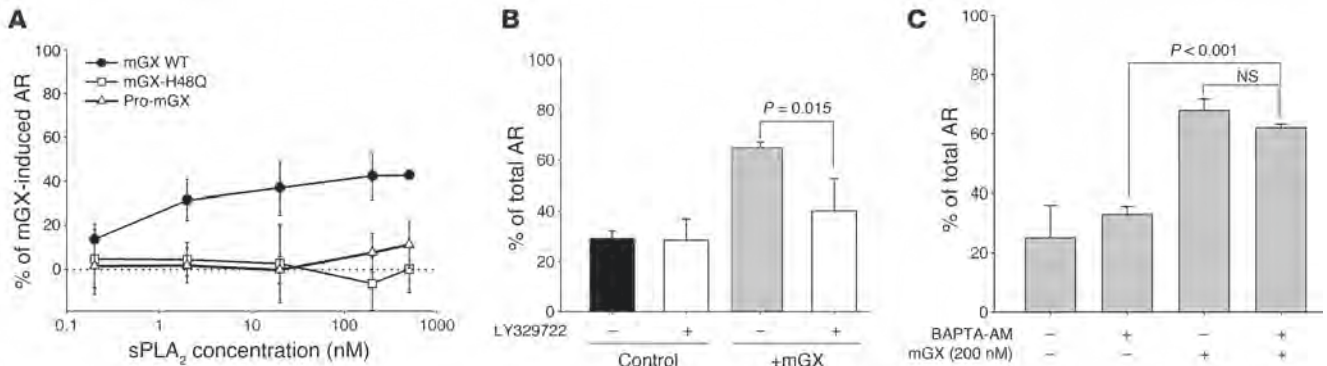
**Figure 4**

Endogenous and recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> both regulate spontaneous AR during capacitation. **(A)** Spontaneous AR of mGX<sup>-/-</sup> sperm does not progress beyond 55 minutes of in vitro capacitation, in contrast to WT sperm. Addition of mGX during the last 10 minutes of 90-minute capacitation rescues normal spontaneous AR in mGX<sup>-/-</sup> sperm. Spontaneous AR was quantified during capacitation at 10, 55, and 90 minutes in mGX<sup>+/+</sup> littermate sperm (*n* = 11) and mGX<sup>-/-</sup> sperm (*n* = 6). **(B)** Recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> is a potent inducer of AR. Dose-response curve for AR of noncapacitated WT sperm triggered by mGX (*n* = 3–8). **(C)** Treatment with mGX sPLA<sub>2</sub> (200 nM) for 10 minutes triggers AR of both noncapacitated WT sperm (23.7% ± 1.4% to 68.1% ± 2.1% for control and mGX-treated sperm, respectively; *n* = 23) and WT sperm capacitated for 90 minutes (46.5% ± 6.3% to 81.8% ± 5.4% for control and mGX-treated sperm, respectively; *n* = 3).

sperm with LY329722 decreased the rate of 2-cell embryos by 23% (*n* = 8, *P* = 0.023), which was compensated by an increased rate of aborted embryos (Figure 7A). Importantly, the inhibitor did not alter the fertilizing potential of sperm, since the rate of unfertilized oocytes remained constant. We also followed spontaneous AR in the presence of LY329722 during capacitation (Figure 7B). In accordance with the results obtained for mGX<sup>-/-</sup> sperm (Figure 4A), the onset of spontaneous AR was not modified by LY329722. However, the spontaneous AR occurring during the late phase of capacitation (55–90 minutes) was markedly reduced by the inhibitor. The level of spontaneous AR at 90 minutes in the presence of LY329722 was not statistically different from the level of AR of mGX<sup>-/-</sup> sperm at 90 minutes. Similar results were obtained with indoxam, another sPLA<sub>2</sub> inhibitor (50) (data not shown). Interestingly, we found that addition of 1 μM LPC, a major product of mGX sPLA<sub>2</sub> activity (43), to sperm treated with LY329722 partially rescues the level of spontaneous AR, indicating that LY329722 specifically targets mGX sPLA<sub>2</sub>. In contrast, LPC alone had no effect on spontaneous AR at this concentration (Figure 7B). Since sPLA<sub>2</sub> inhibitors such as LY329722 have a low membrane permeability (53), the inhibition of spontaneous AR is likely due to the inhibition of mGX present in the cell medium after its release, and not to inhibition of mGX still present in the acrosome. The fact that LY329722 blocks spontaneous AR and reduces 2-cell embryos (and thus fertility; see ref. 47) suggests that the level of spontaneous AR controlled by mGX is an important factor controlling the fertility outcome. To confirm this view, we performed IVF with OF1 sperm briefly treated with 200 nM recombinant mGX during the last 10 minutes of capacitation (see Supplemental Figure 3 for the time course of this experiment). In accordance with the results of Figure 4C, this treatment elicited AR of approximately 65% of treated sperm, and this effect was blocked by LY329722 (Figure 8A). This treatment led to an increased rate of 2-cell embryos from 38.09% ± 5.27% to 57.50% ± 4.69% (*n* = 13, *P* < 0.0001) for control and treated sperm, respectively (Figure 8B). Similar experiments performed with sperm and oocytes from C57BL/6J inbred mice produced an even larger increase, with a 2-fold higher rate of 2-cell embryos for mGX-treated sperm (Supplemental Figure 4). As for LY329722 (Figure 7A), mGX treatment did not change the fertilization potential of sperm, since the rate of unfertilized oocytes remained constant: the increased rate of 2-cell embryos was compensated by the decreased rate of aborted embryos (Figure 8B), from 32.95% ± 5.06% to 19.85% ± 2.96% (*n* = 13, *P* < 0.01). Furthermore, we found that embryos obtained with mGX-treated sperm

that treatment of sperm with mGX produces acrosome-reacted sperm and non-acrosome-reacted sperm with a normal morphology. The fact that the non-acrosome-reacted sperm do not appear to be damaged and have an intact acrosome indicates that it is this subpopulation of sperm that fertilizes eggs.

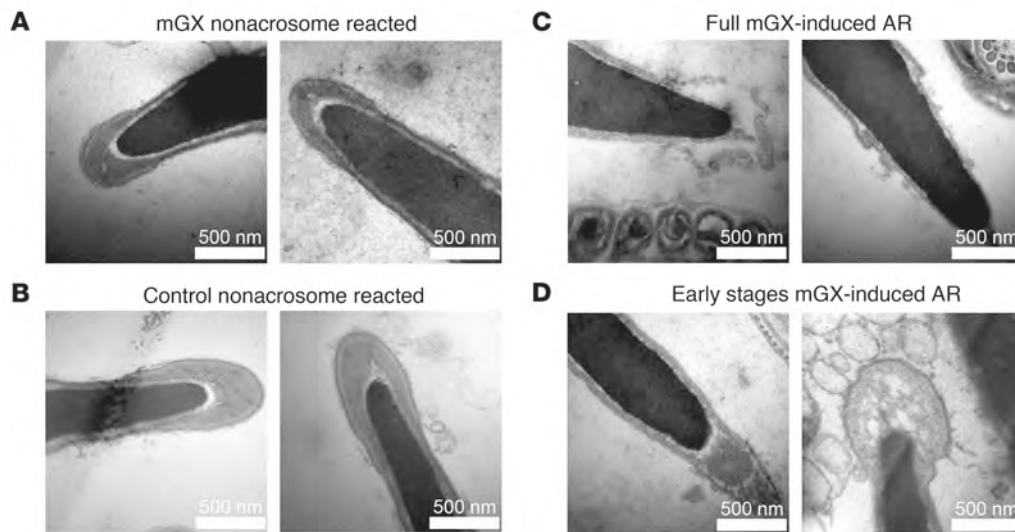
The fertility outcome is dependent on the rate of spontaneous AR controlled by mGX sPLA<sub>2</sub>. A fraction of the sperm population was found to be fully resistant to recombinant mGX, even at concentrations as high as 500 nM (Figure 4B). This suggests that recombinant mGX specifically targets a subpopulation of sperm and triggers their AR prematurely, i.e., before fertilization. Since endogenous mGX is released during capacitation (Figure 2), a similar mechanism may be operating physiologically, and the role of endogenous mGX would be to target a specific subpopulation of sperm that may have defective sperm function. To address this hypothesis, we performed IVF experiments with WT sperm and oocytes from outbred OF1 animals. Outbred mice were first chosen because inbred mice, and more particularly C57BL/6 mice, present a subfertile phenotype that may interfere with the results. Sperm were pretreated with the sPLA<sub>2</sub> inhibitor LY329722 throughout capacitation. Treating



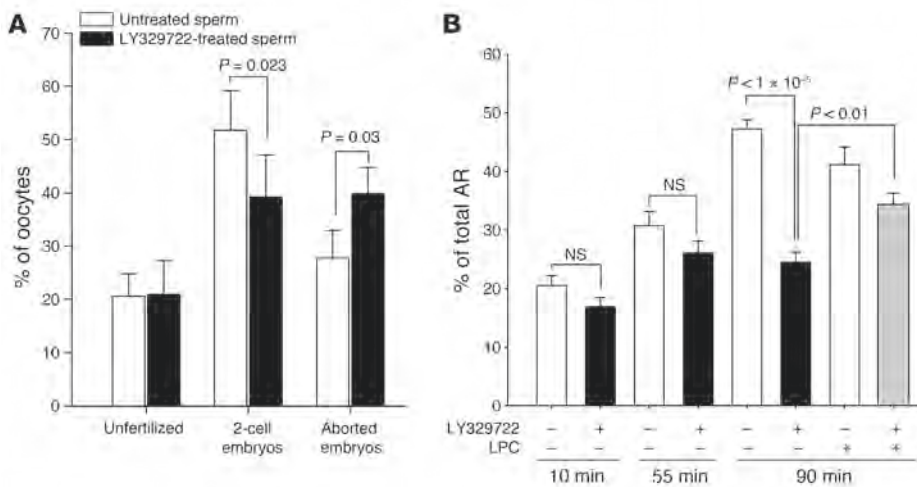
**Figure 5** mGX sPLA<sub>2</sub> triggers AR via its catalytic activity and independently of cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise. **(A)** Dose-response curves for AR of noncapacitated sperm triggered by mGX (*n* = 3–8), mGX-H48Q (*n* = 3), and pro-mGX (*n* = 3). Results are expressed as sPLA<sub>2</sub>-specific AR, i.e., total AR minus spontaneous AR. **(B)** The specific sPLA<sub>2</sub> inhibitor LY329722 (1 μM) blocked the ability of 200 nM mGX to trigger AR of sperm capacitated during 45 minutes (*n* = 3). Results correspond to total AR. **(C)** Loading sperm with 10 μM BAPTA did not modify spontaneous AR (2 left bars, *n* = 3) and mGX-induced AR (2 right bars, *t* test; NS; *n* = 3) of sperm incubated in a noncapacitating medium (no BSA). In the presence of BAPTA-AM, the difference in the level of AR between nontreated and mGX-treated sperm is statistically significant.

developed normally to the blastocyst stage (Figure 8C) and that reimplanted blastocyst embryos gave rise to normal pups (data not shown). The effect of exogenous mGX on fertility was dependent on its enzymatic activity, since preincubation of mGX with LY329722 for 15 minutes before the short treatment of sperm prevented the positive effect on IVF (Figure 8D). We then reasoned that mGX may influence fertility by decreasing the number of sperm able to cross the ZP, and thus by decreasing the risk of polyspermy. Indeed, the number of sperm in an IVF droplet greatly exceeded the minimal number necessary to maximize the IVF outcome. To test this hypothesis, we evaluated the IVF outcome (2-cell embryos) with a

concentration of non-acrosome-reacted sperm equivalent to that obtained after mGX treatment. At a sperm concentration of  $3 \times 10^5$ , treating sperm with 200 nM mGX led to a drop in the number of non-acrosome-reacted sperm from  $2.1 \times 10^5$  (70% of  $3 \times 10^5$  cells) to  $0.9 \times 10^5$  (30% of  $3 \times 10^5$  cells); percent values are shown in Figure 8A. This drop was mimicked by performing IVF either at  $1.5 \times 10^5$  or  $3 \times 10^5$  sperm, and this dilution did not increase the fertility rate (Figure 8E). This result ruled out the hypothesis of a decreased risk of polyspermy due to mGX treatment. Together, the results shown in Figures 7 and 8 clearly indicate that the fertility outcome of our IVF experiments is linked to the level of AR controlled by mGX.



**Figure 6** Ultrastructure of the head of mGX sPLA<sub>2</sub>-treated sperm. **(A)** Electron micrographs of non-acrosome-reacted sperm treated with 200 nM mGX (noncapacitated sperm). **(B)** Electron micrographs of non-acrosome-reacted control (untreated) sperm (noncapacitated sperm). **(C)** Acrosome-reacted sperm (noncapacitated sperm) in the presence of 200 nM mGX presented normal morphological features of sperm undergoing AR: fusion between the plasma and acrosomal membrane produced vesiculation (left), and the outer acrosomal membrane was fused with the plasma membrane and presented a typical double-hairpin shape at the base of the acrosome (right) or **(D)** presented early stages of AR, i.e., cavitation. Scale bars: 500 nm.



**Figure 7** Blocking endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> with the specific inhibitor LY329722 impacts both fertility outcome and spontaneous AR. (A) Endogenous mGX, secreted during spontaneous AR, controls the yield of viable embryos, without changing the rate of fertilization. IVF experiments were performed with either control sperm or the same sperm treated throughout capacitation with 1 μM LY329722 (n = 8) and unfertilized oocytes. Two-cell embryos and aborted embryos were scored. Inhibiting mGX decreases 2-cell embryos and increases aborted embryos. The design of the experiment clearly indicates that LY329722 controls the yield of viable embryos by inhibiting endogenous mGX secreted during spontaneous AR. (B) The sPLA<sub>2</sub> inhibitor LY329722 blocked the late phase of spontaneous AR. Spontaneous AR was quantified during capacitation at 10, 55, and 90 minutes in the absence or presence of 1 μM LY329722 (n = 10–14). Incubation of sperm with 1 μM LPC during the last 45 minutes partially rescued the inhibition of spontaneous AR induced by LY329722 (n = 7).

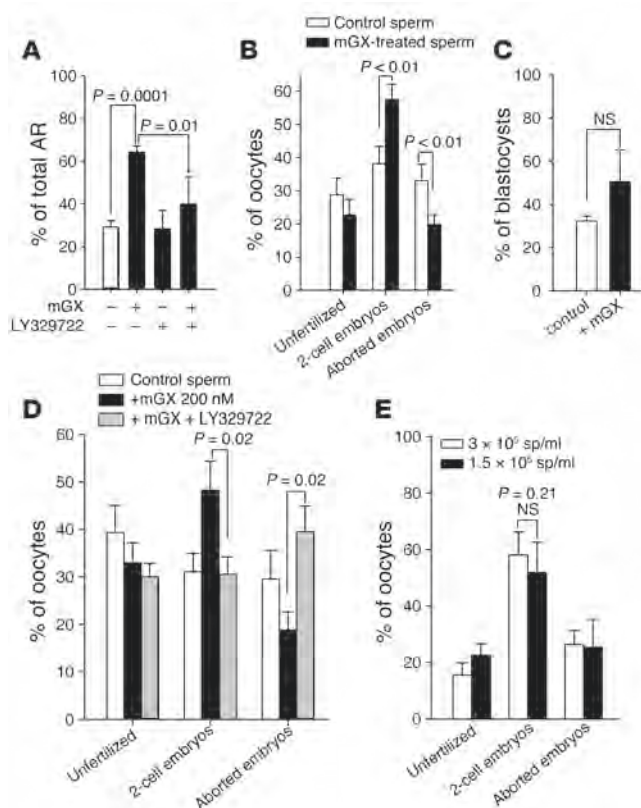
LPC, an sPLA<sub>2</sub> metabolite, increases the fertilization potential of sperm. We have demonstrated above that mGX, which is spontaneously released by sperm during capacitation, triggers AR of a subpopulation of sperm via a paracrine amplification loop. Our IVF experiments further support the notion that this subpopulation of sperm is less fertile and poorly promotes normal embryo development. Moreover, mGX<sup>-/-</sup> sperm also present a deficit of fertilization potential, as indicated by the decrease in fertilization rate (Figure 3D). This observation is suggestive of a second role for mGX or its catalytic products downstream of capacitation, i.e., during fertilization. To test this hypothesis, we allowed WT sperm to capacitate in the presence of YM26734, another potent sPLA<sub>2</sub> inhibitor (54), then washed the sperm by centrifugation to remove the inhibitor, and finally performed IVF experiments in the absence or presence of LPC, a major catalytic product of mGX (55). Interestingly, treatment with YM26734 alone decreased the rate of 2-cell embryos by 40%, from 58.9% ± 6.8% to 35.6% ± 5.7% (n = 3). Furthermore, addition of LPC could rescue the fertilization potential of YM26734-pre-treated sperm, with a 2-cell embryo rate of 52.7% ± 9.7% (n = 3) (Figure 9A). To confirm the effect of YM26734, we performed similar experiments in the presence of an mGX rabbit polyclonal antibody and obtained similar results: the 2-cell embryo rate decreased from 51.7% ± 5.2% to 32.4% ± 2.1% for control sperm and sperm treated with mGX antibody, respectively. Addition of LPC, after the capacitation of sperm treated with the antibody, rescued the 2-cell embryo rate up to 57.1% ± 8.2% (n = 3) (Figure 9B). Importantly, we observed that treatment of sperm with LPC alone had no effect on the rate of fertilization at this concentration (data not shown). This result demonstrates that LPC, an

mGX metabolite, is required for normal fertilization and suggests a second role for mGX, in addition to its role in the control of spontaneous AR. The fertilization potential of the non-acrosome-reacted sperm subpopulation is thus dependent on mGX enzymatic activity, and mGX or its downstream metabolic products including LPC are likely involved in one of the different steps of fertilization occurring after capacitation, including sperm binding on ZP, ZP-induced AR, and/or sperm-egg fusion.

### Discussion

This study shows for the first time to our knowledge that mGX sPLA<sub>2</sub> is present in large amounts in the sperm acrosome and plays an important paracrine role in the control of spontaneous AR during capacitation, which is associated with a strong impact on fertility outcome. Our results also provide indirect evidence that mGX plays a role during the downstream fertilization step and thus likely acts at two major stages of reproduction, capacitation and fertilization. Finally, our findings may open new possibilities for the improvement of assisted reproduction techniques.

We first unambiguously identified mGX as the major sPLA<sub>2</sub> enzyme loaded in the mouse sperm acrosome. Although several sPLA<sub>2</sub>s are present in mouse male reproductive organs (16), we did not detect mGIIA, mGIID, mGIIE, mGIIF, and mGV sPLA<sub>2</sub> proteins in mature mouse sperm, while the expression of mGX was very high, with several nanograms of mGX protein per million sperm. This value appears very high when compared with the level of mGX protein in various mouse tissues (56) and fits with the very high level of mGX mRNA in testis versus other tissues (57). Our finding is important, since there have been numerous biochemical reports during the past 40 years showing the presence of an sPLA<sub>2</sub> protein in sperm from several mammalian species, the molecular identity of which was never clarified (19, 27–29). This unknown sPLA<sub>2</sub> was of low molecular mass; was reported as a proenzyme; was resistant to heat and acid extraction; was Ca<sup>2+</sup>-dependent; could hydrolyze both phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine; and was sensitive to nonspecific sPLA<sub>2</sub> inhibitors such as Mepacrine, p-bromophenacyl bromide, aristolochic acid, Ro-31-4493, and Ro-4639. Many of these features match those of group X sPLA<sub>2</sub> (43, 57, 58). The presence of group X sPLA<sub>2</sub> in the sperm acrosome in other species including humans, however, remains to be determined. Our preliminary data obtained by RT-PCR (59) and immunohistochemistry (Supplemental Figure 1) on human testis suggest that group X sPLA<sub>2</sub> is a likely candidate, but a more thorough analysis should be performed at the protein level on purified human sperm. Interestingly, a proenzyme form was detected in human sperm (28), and this would fit with human group X sPLA<sub>2</sub>, which has a propeptide sequence (58). More recently, the presence and release of an sPLA<sub>2</sub> from human sperm has been

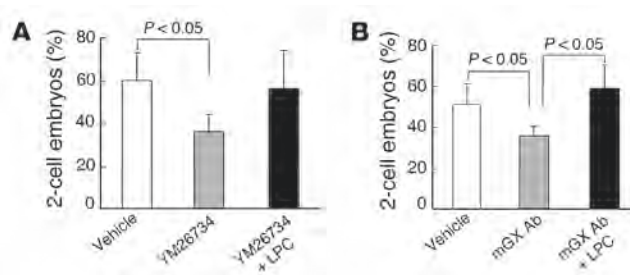
**Figure 8**

Exogenous mGX sPLA<sub>2</sub> reinforces the effect of endogenous mGX on spontaneous AR and improves fertility outcome. (A) Sperm used for IVF and briefly pretreated with exogenous mGX present a higher rate of spontaneous AR. WT sperm were incubated during the last 10 minutes of capacitation with mGX alone (200 nM), LY329722 alone (1 μM), or mGX preincubated with LY329722. Only mGX treatment triggered significant AR over the untreated condition ( $n = 6$ ). (B) Recombinant mGX controls the yield of viable embryos, without changing the rate of fertilization. IVF was performed either with OF1 control sperm or with the same sperm briefly treated with 200 nM mGX, and IVF outcome was scored ( $n = 13$ ). Recombinant mGX increases 2-cell embryos and decreases aborted embryos. (C) Two-cell embryos obtained with mGX-treated sperm developed normally to the blastocyst stage. (D) LY329722 blocks the mGX-dependent increase in fertility. IVF was performed with either control sperm or the same sperm treated briefly with 200 nM mGX or with the same sperm treated briefly with 200 nM mGX but preincubated with 1 μM LY329722 ( $n = 6$ ). (E) The number of sperm incubated with oocytes does not impact fertility outcome. IVF was performed at 2 different concentrations:  $1.5 \times 10^5$  and  $3 \times 10^5$  sperm (sp) ( $n = 4$ ).

reported (29, 38), but the two studies were performed using antibodies with unclear specificity toward the different sPLA<sub>2</sub> isoforms and were thus inconclusive regarding the identity of the human sperm sPLA<sub>2</sub>. Finally, there is evidence suggesting that other PLA<sub>2</sub>s including iPLA<sub>2</sub>β and likely a cPLA<sub>2</sub> member are present in sperm (18, 19). The locations of these intracellular PLA<sub>2</sub>s and their likely distinct roles in sperm function remain to be investigated using inhibitors specifically targeting these enzymes.

We then investigated the role of mGX during *in vitro* capacitation and found that the sPLA<sub>2</sub> controls to a large extent the percentage of sperm undergoing “spontaneous” or premature AR, thereby inactivating them for the fertility race. Our experiments with WT versus mGX-deficient sperm indicate a delayed paracrine effect of endogenous mGX sPLA<sub>2</sub> on the rate of spontaneous AR (Figure 4A). Since different lipid mediators such as prostaglandin E<sub>1</sub> and PAF can trigger AR and are produced at the onset of *in vitro* capacitation (30, 60), it is tempting to speculate that such lipid mediators are produced by an intracellular PLA<sub>2</sub>-dependent mechanism in a subpopulation of “excessively primed” or damaged sperm, trigger initial AR, and release mGX sPLA<sub>2</sub>, which in turn amplifies spontaneous AR in a paracrine loop of activation. Recombinant mGX sPLA<sub>2</sub> can promote AR at low nM concentrations and over the entire time course of capacitation (Figure 4, B and C), demonstrating its high potency in AR. Interestingly, the effect of mGX reaches a plateau (Figure 4B) and leaves intact a subpopulation of sperm showing a normal morphology (Figure 6) and capable of fertilizing oocytes (Figure 8). Together, our results indicate that mGX makes an important contribution during *in vitro* capacitation, at least by triggering AR in a subpopulation of likely damaged sperm. This suggests a role of mGX in sperm cell sorting during capacitation as a mechanism to improve fertility

outcome. Our current view of the *in vivo* situation is that the heterogeneous population of ejaculated sperm becomes exposed to mGX sPLA<sub>2</sub> (and possibly other sPLA<sub>2</sub> activities) after their mixing with seminal plasma secretions and/or during their swimming through the female tract. Indirect evidence supporting this view include the facts that (a) various populations of sperm with a different lipid composition, a damaged plasma membrane, and externalization of phosphatidylserine associated with spontaneous AR have been identified (13, 14); (b) seminal plasma and female tract secretions contain endogenous PLA<sub>2</sub> regulators (26, 61–63); and

**Figure 9**

Addition of LPC during fertilization rescues the fertilization potential of sperm treated with sPLA<sub>2</sub> inhibitor or anti-mGX antibody during capacitation. (A) IVF experiments were performed with sperm treated or not with the sPLA<sub>2</sub> inhibitor YM26734 (1 μM) only during the capacitation period. LPC (1 μg/ml) was added only during gamete mixing. The approximately 40% reduction in 2-cell embryo rate measured with YM26734-treated sperm ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ) was restored by supplementation with LPC. (B) Similar reduction and recovery of IVF were observed with sperm treated with anti-mGX antibody (50 μg/ml) during capacitation and LPC added during gamete mixing ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ), respectively.



(c) a relationship was found among PLA<sub>2</sub> activity in human sperm, seminal fluid, and male fertility (64).

The mechanism by which mGX promotes AR clearly depends on its enzymatic activity, because (a) the catalytically inactive mutant H48Q and the proenzyme form of mGX are inactive and (b) the specific sPLA<sub>2</sub> inhibitor LY329722 prevents mGX-induced AR (Figure 5, A and B). The fact that the two major products of mGX sPLA<sub>2</sub>, LPC and free fatty acids, are able to trigger AR also supports this mechanism (35, 36, 48). This direct mechanism also fits with our results showing that mGX-induced AR does not require intracellular Ca<sup>2+</sup> (Figure 5C). Based on the specificity and action of group X sPLA<sub>2</sub> on different cells (43, 65), the phospholipid targets of mGX on sperm are likely phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine, especially those enriched in polyunsaturated fatty acids at the *sn*-2 position. Such phospholipids are present in caudae epididymal sperm and reorganized into microdomains in the sperm head plasma membrane during capacitation (10, 11, 66–69). The fact that about 30% of the sperm population is insensitive to mGX sPLA<sub>2</sub> while the other 70% is gradually sensitive (Figure 4) is likely related to the heterogeneous lipid nature of the sperm plasma membrane producing various subpopulations of sperm with different levels of cholesterol, lipid peroxidation, lipid dynamics, and phospholipid asymmetry (70). Indeed, the enzymatic activity of group X sPLA<sub>2</sub> has been shown to be influenced by the lipid composition of the plasma membrane, notably by the ratio between sphingolipids and phosphatidylcholine species (71). Furthermore, it has been shown that the enzymatic activity of several sPLA<sub>2</sub>s is dependent on lipid packing and phospholipid asymmetry (72). The ratio of phospholipids to sphingomyelin is changed during sperm maturation, and this is likely a way to control mGX activity on distinct sperm subpopulations. Interestingly, sphingomyelinase speeds up sperm capacitation and increases spontaneous AR (73). Whether mGX may be acting on a particular population of damaged sperm with altered plasma phospholipid asymmetry including externalized phosphatidylserine or oxidized phospholipids associated with a decreased fertility potential remains to be determined (15, 70, 74, 75).

We have clearly demonstrated that mGX sPLA<sub>2</sub> is a potent regulator of spontaneous AR during capacitation and that a defect in this process or its inhibition reduces fertility outcome by increasing the rate of aborted embryos and decreasing the rate of 2-cell embryos. We have indeed demonstrated that (a) decreasing AR by inhibition of mGX decreases fertility outcome, while increasing AR by addition of recombinant mGX increases fertility outcome; and (b) mGX<sup>-/-</sup> sperm show simultaneously a lower rate of spontaneous AR and a higher rate of aborted embryos. In sperm from CD46-deficient mice, a positive link between the rate of spontaneous AR and fertility has also been mentioned but not demonstrated (4). It is important to note that the effectors used to modify the rate of spontaneous AR have been applied only during capacitation and then washed out, and thus these effectors or mGX catalytic products are unlikely to affect the downstream fertilization events. Our experiments thus support a model whereby mGX sPLA<sub>2</sub> targets a subpopulation of sperm, triggers their premature AR during capacitation, and thereby discards them from the competition race for fertilization, since only non-acrosome-reacted sperm can cross the ZP. Therefore, the so-called spontaneous AR would correspond in part to the premature AR triggered by mGX, and the latter would represent a physiological mechanism of sperm cell sorting that compensates for the unreliability in sperm production and quality (75, 76).

Our experiments also provide evidence for a second role of mGX during fertilization, after ZP-induced AR and the release of mGX in the sperm-egg environment. Indeed, we have shown that mGX<sup>-/-</sup> sperm presented fertilization rates much lower than those of mGX<sup>+/+</sup> sperm, with mean decreases of 44%–68% (Figure 3, D and E). In comparison, blocking mGX activity during capacitation of mGX<sup>+/+</sup> sperm also produced a decrease in the fertilization rate, but smaller than that with mGX<sup>-/-</sup> sperm, with mean decreases of only 24% (with LY329722, Figure 7A), 39% (with YM26734, Figure 9A), and 37% (with mGX antibody, Figure 9B). These results clearly support a second role of mGX downstream of capacitation. Assuming that mGX has two different mechanisms of action, one during capacitation and another during fertilization, one should expect to see a more robust effect on fertility when using mGX<sup>-/-</sup> sperm than when using an sPLA<sub>2</sub> inhibitor or an antibody, which were only added during capacitation and only blocked released mGX sPLA<sub>2</sub>. Indeed, it is important to note that in the experiments using LY329722 or mGX antibody, the acrosomal mGX of non-acrosome-reacted sperm should remain fully active, since LY329722 analogs have low permeability (53), antibodies are impermeant, and these compounds were washed out before gamete mixing. The fact that addition of LPC during the fertilization step was able to restore the fertilizing potential of sperm capacitated in conditions where mGX was inhibited also supports a role of mGX when secreted during ZP-induced AR. Besides, LPC increases both sperm binding to ZP and sperm-oocyte fusion (37, 38). The targets of the mGX metabolites allowing sperm to efficiently fertilize an egg, however, remain to be determined. In conclusion, we have demonstrated that the *in vitro* fertility outcome is controlled by mGX, acting at two different stages, and any defects in mGX activity at these stages produces a drop in fertility.

We have, however, observed no defect in fertility when mGX-deficient male mice were crossed with WT females. This would argue for a noncritical role of mGX in sperm function, but given the essential role of sperm in the propagation of life, a redundancy of systems would not be unexpected. Indeed, there are many examples of knockout mice lacking important genes in sperm physiology and AR that are apparently fertile because of redundant or compensatory mechanisms. A nonexhaustive list of such genes includes Ca<sup>2+</sup> channels (77, 78), acrosin (79), caveolin-1 (80), and a sperm-specific aminophospholipid transporter (15). The lack of obvious reproductive defect in mGX<sup>-/-</sup> mice may be linked to the presence and role of multiple extra- or intracellular PLA<sub>2</sub> activities in sperm physiology that may act in concert or may be partially redundant (17–19). However, we observed a lower fertility when crossing male and female mGX-deficient mice (Figure 3). This result suggests that mGX is also present in the female tract and may compensate for the deficit of mGX in sperm. This view is supported by our preliminary data showing the presence of mGX sPLA<sub>2</sub> in the female reproductive tract, notably in the uterine epithelium (56). Similar observations have been made for iPLA<sub>2</sub>β-deficient mice, where crossings between iPLA<sub>2</sub>β-deficient males and females produced no offspring, while crossings between iPLA<sub>2</sub>β-deficient males and WT females did produce offspring, though at less than the normal rate (18). This mGX<sup>-/-</sup> sperm phenotype may be reminiscent of a well-known human infertility situation where the infertility of a couple is due to the combination of male and female deficits. Such a cause is involved in 20% of infertile couples (79).

Finally, we have demonstrated that recombinant mGX boosts the effect of endogenous mGX on spontaneous AR and signifi-



cantly improves the rate of success of IVF in the mouse species, an improvement that is even greater in inbred mice known to present a subfertile phenotype. Moreover, non-acrosome-reacted sperm that were resistant to mGX treatment showed a normal ultrastructural morphology, and the oocytes fertilized with this sperm developed normally up to the blastocyst stage in vitro and gave rise to normal pups when reimplanted. Thus, mGX is a peculiar sPLA<sub>2</sub> that represents a hope for new therapeutic strategies to fight against human male infertility: mGX could be used as a potent therapeutic agent in assisted reproduction techniques, either to improve IVF outcome or to select sperm for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) based on their acrosomal status. This strategy would be based on prior treatment of the sperm population with group X sPLA<sub>2</sub> (or another relevant human sPLA<sub>2</sub>) and subsequent selection of non-acrosome-reacted sperm for IVF or ICSI.

## Methods

**Animals.** All animal procedures were performed according to French and Japanese guidelines on the use of living animals in scientific investigations with the approval of the respective local ethical review committees (the Grenoble Institut des Neurosciences ethical committee and the Institutional Animal Care and Use Committees of Showa University and of the Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science). mGX-deficient mice (null for the *Pla2g10* gene) on a C57BL/6J background were obtained from Lexicon Inc. as described previously (45). All other animals were from Charles River Laboratories. All animals used were 2–6 months old.

**In situ hybridization.** A 355-bp DNA fragment corresponding to the nucleotide positions 221–576 of mouse cDNA (GenBank NM\_011987) was subcloned into a pGEMT-Easy vector (Promega) and was used for generation of sense or antisense RNA probes. Digoxigenin-labeled RNA probes were prepared with DIG RNA Labeling Mix (Roche). Paraffin-embedded mouse testis sections (6 µm) were obtained from Genostaff Co. For in situ hybridization, the sections were hybridized with digoxigenin-labeled RNA probes (300 ng/ml) at 60°C for 16 hours. The bound label was detected using NBT-BCIP, an alkaline phosphate color substrate. The sections were counterstained with Kernechtrot (Muto Pure Chemicals Co.).

**Quantitative RT-PCR.** Total RNA was isolated from testis and epididymis of 8-week-old male C57BL/6J mice with TRIzol reagent (Invitrogen) and purified using an RNeasy Purification Kit (QIAGEN). First-strand cDNA synthesis was performed using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR analysis was carried out on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the TaqMan probe for mGX (Mm00449530\_m1). The thermal cycling conditions comprised initial steps at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds, and 72°C for 30 seconds. The expression of 18S mouse ribosomal RNA (accession number X00686) was used for normalization.

**Immunohistochemistry.** Mouse testis samples were fixed in 4% PFA and embedded in paraffin. The tissue sections (4 µm thick) were incubated with Target Retrieval Solution (Dako Cytomation) as required and then incubated overnight at 4°C with rabbit anti-mGX antibody (from M.H. Gelb, University of Washington, Seattle, Washington, USA) or normal rabbit IgG at 1:100 dilution in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.15 M NaCl (TBS). The sections were then treated with a catalyzed signal-amplified System Staining Kit (Dako Cytomation) with diaminobenzidine substrate, followed by counterstaining with hematoxylin and eosin. Human testis sections (from 16-year-old males) were obtained by surgery at Toho University Ohmori Hospital (Tokyo, Japan) following approval by the ethical committee of the faculty and receipt of informed consent from the patients.

**Immunofluorescence microscopy.** Epididymal spermatozoa from C57BL/6J mice were washed with PBS and fixed on glass slides with 3% (v/v) PFA in TBS for 1 hour. After 3 washes with PBS, fixed cells were treated with blocking solution (1% [w/v] bovine serum albumin and 0.5% [w/v] saponin in TBS) for 1 hour; then with rabbit anti-mGX or control antibody at 1:200 dilution in blocking solution for 2 hours; and then with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody at 1:200 dilution in blocking solution for 2 hours, with 3 washes between each incubation. After 6 washes with TBS, immunofluorescent signals were visualized with a laser scanning confocal microscope (IX70; Olympus).

**Capacitation and AR assay.** Sperm from caudae epididymides were allowed to swim in M2 medium for 10 minutes. When specified, sperm were capacitated in M16 medium with 2% fatty acid-free BSA at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for various times. For sPLA<sub>2</sub> treatment, sperm were incubated with sPLA<sub>2</sub> in M16 medium at 37°C for the last 10 minutes. Cells were transferred in PBS solution and then fixed with 4% PFA solution for 2 minutes. Sperm were washed (100 mM ammonium acetate, 2 minutes), wet mounted on slides, and air dried. Slides were then rinsed with water and stained with Coomassie blue (0.22%) for 2 minutes and finally rinsed. Slides were analyzed, and at least 150 sperm were scored.

**Electron microscopy.** Sperm were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na<sup>+</sup> cacodylate pH 7.4 during 2 hours at room temperature. Cells were washed with buffer and postfixed with 1% osmium tetroxide in the same buffer for 1 hour at 4°C. After washing with water, cells were stained overnight at 4°C with 0.5% uranyl acetate pH 4.0. Cells were dehydrated through graded alcohol (30%, 60%, 90%, 100%, 100%, and 100%) and infiltrated with a mix of 1:1 Epon/alcohol 100% during 1 hour before several baths of fresh Epon (Fluka) during 3 hours. Finally, cells were centrifuged and immersed in fresh Epon and polymerized during 3 days at 60°C. Ultrathin sections of the cell pellet were cut with an ultramicrotome (Leica). Sections were post-stained with 4% uranyl acetate and 1% lead citrate before being observed in an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX).

**Detection of sPLA<sub>2</sub> proteins in sperm.** Sperm from caudae epididymides of different mouse strains (mGX<sup>-/-</sup> or WT C57BL/6J littermates, OF1, and BALB/c) were allowed to swim for 15 minutes at 37°C in 2.5 ml of M2 medium. Sperm were then washed by centrifugation at 500 g twice with M2 medium, then resuspended in 2.5 ml M16 medium. Five hundred microliters of sperm were then diluted in 4.5 ml M16 medium containing 2% fatty acid-free BSA and further incubated at 37°C for 10, 45, and 90 minutes. In some assays, A23187 Ca<sup>2+</sup> ionophore (5 µM) was added between 60 and 90 minutes of incubation. After incubation, sperm were spun down for 8 minutes at 500 g, and supernatants and cell pellets were flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. sPLA<sub>2</sub> protein and enzymatic activity were analyzed on crude supernatants and cell pellets after resuspension in 500 µl M16 medium containing a cocktail of protease inhibitors (EDTA-free complete inhibitor set, Roche Biochemicals) and lysis with a Branson 350 Sonifier Cell Disruptor. TR-FIAs for sPLA<sub>2</sub> were performed as described previously with minor modifications (56). Briefly, 1–5 µl of protein sample were diluted in 100 µl of DELFIA assay buffer (Tris-HCl-buffered NaCl solution, pH 7.8, containing NaN<sub>3</sub>, BSA, bovine gamma globulins, Tween 40, DTPA, and inert red dye, PerkinElmer Wallac) and added to sPLA<sub>2</sub> IgG-coated microtiter wells previously washed twice with TR-FIA washing solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.9% NaCl, 0.04% NaN<sub>3</sub>, and 0.02% Tween 20). After incubation at room temperature with constant shaking at 200 cycles/min for 30 minutes, wells were washed 4 times with TR-FIA washing solution, incubated with 100 µl of Eu-labeled mGX IgG tracer (0.5 µg/ml diluted in DELFIA assay buffer), and washed again 4 times as above. After washing, 100 µl of DELFIA enhancement solution was added to wells and incubated at room temperature for 5 minutes with shaking at 200 cycles/min and thereafter for 10 minutes without shak-



ing. Time-resolved fluorescence was measured using a Wallac Envision PerkinElmer plate reader and optimized optical modules for DELFIA assays. sPLA<sub>2</sub> enzymatic activity was measured using radiolabeled *E. coli* membranes as substrate (43). Briefly, 5–50 µl of cell lysates or supernatants were incubated for 60 minutes in 300 µl of sPLA<sub>2</sub> activity buffer (0.1 M Tris pH 8.0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, and 0.1% BSA containing 100,000 dpm of [<sup>3</sup>H]oleate-radiolabeled *E. coli* membranes. Reactions were stopped by addition of 300 µl stop buffer (0.1 M EDTA pH 8.0 and 0.5% fatty acid-free BSA). Mixtures were centrifuged at 10,000 g for 5 minutes, and supernatants containing released [<sup>3</sup>H]oleate were counted.

**Production of recombinant sPLA<sub>2</sub>s and sPLA<sub>2</sub> antibodies.** Recombinant mouse group IIA, IID, IIE, IIF, V, and X sPLA<sub>2</sub>s were produced as described previously (81). Pro-mGX sPLA<sub>2</sub> and the H48Q mutant of mGX sPLA<sub>2</sub> were produced as for mature WT mGX sPLA<sub>2</sub> using the pAB3 vector, in which the nucleotide sequence coding for the propeptide and mature sequence of mGX (56) was inserted in-frame with the ΔGST protein and the factor Xa cleavage site, which were removed by cleavage with the factor Xa protease (81). Recombinant H48Q mGX and pro-mGX sPLA<sub>2</sub> were found to have 0.1% and 0.3% of WT mGX sPLA<sub>2</sub>, respectively (data not shown). All sPLA<sub>2</sub> antibodies were produced in rabbit as polyclonal antibodies raised against the different recombinant sPLA<sub>2</sub>s. The IgG fractions used above for TRF-IA and experiments depicted in Figure 2E and Figure 9 were obtained by purification on protein A-Sepharose as described previously (56).

**IVF.** Sperm, obtained by manual trituration of caudae epididymides from male mice (OF1, C57BL/6J, mGX<sup>-/-</sup> or WT littermates), were allowed to swim in M2 medium for 10 minutes. Eggs were collected from mature OF1 females (6 weeks old) synchronized with 7.5 units of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and 7.5 units of human chorionic gonadotrophin (hCG) before collection. The number of scored oocytes per condition was 43 ± 19 (min, 20; max, 109). We carried out IVF using standard protocols (82). Eggs were incubated with 1.5 × 10<sup>5</sup> to 5 × 10<sup>5</sup> sperm/ml (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in M16 medium for 4 hours. Unbound sperm were washed away after incubation. Twenty-four hours after fertilization, we scored the different stages (unfertilized oocytes, aborted embryos, and 2-cell embryos as an indication of successful fertilization). The schematic course of IVF experiments is presented in Supplemental Figure 3: after swimming, sperm were capacitated for 35–60 minutes in M16 2% BSA (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). When specified, sPLA<sub>2</sub> inhibitors or mGX antibody was added during the full period of capacitation. For treatment with recombinant mGX, sperm were incubated after capacitation for the last 10 minutes in M16 medium containing 200 nM mGX (or 1 µM LY329722 or mGX plus LY329722 in some experiments). After treatment, sperm were washed by centrifugation (500 g, 5 minutes) to remove unbound drug, possible lipid metabolites, and all acrosomal compounds released during sPLA<sub>2</sub>-induced AR. The rationale for this procedure was to avoid a subsequent and uncontrolled effect on

IVF outcome by an uncharacterized compound released during AR such as PAF (30). After drug washing, the concentration of remaining unbound mGX was estimated to be lower than 1 nM, based on dilution calculation. We checked that 1 nM mGX did not induce effects on sperm-oocyte fusion (37). For this purpose, we performed IVF experiments in which sperm and oocytes were incubated with 1 nM mGX throughout capacitation and fertilization: no difference was found between control and treated gametes (data not shown). Finally, washed sperm were introduced into droplets containing between 20 and 109 oocytes. For LPC rescue experiments, LPC was introduced in the fertilization droplets at the same time as sperm. After 4 hours of incubation, unbound sperm were washed away, and IVF outcomes were scored at 24 hours.

**Chemical compounds.** M2 medium, M16 medium, and BSA (Cohn fraction V-low fatty acid) were from Sigma-Aldrich. PMSG and HCG were from CEVA Santé Animal and Intervet, respectively. LPC (L-α-LPC from chicken egg) was from Avanti and YM26734 from Yamanouchi Pharmaceuticals.

**Statistics.** Statistical analyses were performed with SigmaPlot. *t* test and paired *t* test were used to compare the effect of various compounds on AR and fertility, respectively. Data represent mean ± SEM. Statistical tests with a 2-tailed *P* values ≤ 0.05 were considered significant.

### Acknowledgments

This work was supported in part by the Région Rhône-Alpes (to C. Arnoult), CNRS (to C. Arnoult and G. Lambeau), INSERM (M. De Waard), the Association pour la Recherche sur le cancer (grant 3977) and the Agence Nationale de la Recherche (to G. Lambeau), and by grants-in aid for scientific research from the Ministry of Education, Science, Culture, Sports and Technology of Japan (to M. Murakami and S. Hara), and grants from the PRESTO program of the Japan Science and Technology Agency, the NOVARTIS Foundation for the Promotion of Science, and the Toray Science Foundation (to M. Murakami). J. Escoffier was supported by a fellowship from the Région Rhône-Alpes. We thank Lexicon Genetics Inc. for providing mGX-deficient mice and Michael Gelb for providing LY329722, indoxam, and mGX antibody. We thank H. de Pomyers and Latoxan for their support.

Received for publication July 13, 2009, and accepted in revised form February 10, 2010.

Address correspondence to: Christophe Arnoult, Grenoble Institute of Neurosciences, Equipe 3 “Calcium channels, functions and pathologies,” Bâtiment Edmond J. Safra, Site Santé à La Tronche, BP 170 38042 Grenoble Cedex 9, France. Phone: 33.4.56.52.05.64; Fax: 33.4.56.52.05.72; E-mail: christophe.arnoult@ujf-grenoble.fr.

- Austin CR. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*. 1952;170(4321):326.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*. 1951; 168(4277):697–698.
- Jungnickel MK, Sutton KA, Florman HM. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms. *Cell*. 2003;114(4):401–404.
- Inoue N, et al. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol*. 2003;23(7):2614–2622.
- Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*. 2002;110(6):731–736.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 16(5):581–588.
- O’Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(4):528–540.
- Fraser LR, Adeoya-Osiguwa SA, Baxendale RW, Gibbons R. Regulation of mammalian sperm capacitation by endogenous molecules. *Front Biosci*. 2006; 11:1636–1645.
- Salicioni AM, et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007;65:245–259.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Int J Dev Biol*. 2008;52(5–6):473–480.
- Jones R, James PS, Howes L, Bruckbauer A, Klenerman D. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J Androl*. 2007;9(4):438–444.
- Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Dondero F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update*. 1996;2(3):246–256.
- Buffone MG, Verstraeten SV, Calamera JC, Doncel GF. High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl*. 2009;30(5):552–558.
- Zalata A, Hassan A, Christophe A, Comhaire F, Mostafa T. Cholesterol and desmosterol in two sperm populations separated on Sil-Select gradient [published online ahead of print March 25, 2009]. *Int J Androl*. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.00961.
- Wang L, Beserra C, Garbers DL. A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asym-



- metry and normal fertilization. *Dev Biol.* 2004; 267(1):203–215.
16. Masuda S, et al. Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1686(1–2):61–76.
17. Koizumi H, et al. Targeted disruption of intracellular type I platelet activating factor-acetylhydrolase catalytic subunits causes severe impairment in spermatogenesis. *J Biol Chem.* 2003;278(14):12489–12494.
18. Bao S, et al. Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce spermatozoa with impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem.* 2004;279(37):38194–38200.
19. Roldan ER, Shi QX. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* 2007;12:89–104.
20. Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(11):1246–1259.
21. Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:495–520.
22. Leslie CC. Regulation of arachidonic acid availability for eicosanoid production. *Biochem Cell Biol.* 2004;82(1):1–17.
23. Kita Y, Ohto T, Uozumi N, Shimizu T. Biochemical properties and pathophysiological roles of cytosolic phospholipase A2s. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1761(11):1317–1322.
24. Kikawada E, Bonventre JV, Arm JP. Group V secretory PLA2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2 $\alpha$  activation. *Blood.* 2007; 110(2):561–567.
25. Yan W, Assadi AH, Wynshaw-Boris A, Eichele G, Matzuk MM, Clark GD. Previously uncharacterized roles of platelet-activating factor acetylhydrolase 1b complex in mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7189–7194.
26. Kallajoki M, Alanen KA, Nevalainen M, Nevalainen TJ. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. *Prostate.* 1998;35(4):263–272.
27. Thakkar JK, East J, Seyler D, Franson RC. Surface-active phospholipase A2 in mouse spermatozoa. *Biochim Biophys Acta.* 1983;754(1):44–50.
28. Antaki P, Guerette P, Chapdelaine A, Roberts KD. Detection of pro-phospholipase A2 in human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1989;41(2):241–246.
29. Lessig J, Reibetanz U, Arnhold J, Glander HJ. Destabilization of acrosome and elastase influence mediate the release of secretory phospholipase A2 from human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2008; 10(6):829–836.
30. Wu C, et al. Evidence for the autocrine induction of capacitation of mammalian spermatozoa. *J Biol Chem.* 2001;276(29):26962–26968.
31. Roldan ER, Frago C. Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca<sup>2+</sup>/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J Biol Chem.* 1993;268(19):13962–13970.
32. Yuan YY, et al. Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003; 68(3):904–913.
33. Pietrobon EO, Soria M, Dominguez LA, Monclus ML, Fornes MW. Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol Reprod Dev.* 2005;70(1):58–63.
34. Shi QX, et al. Progesterone primes zona pellucida-induced activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *J Cell Physiol.* 2005;205(3):344–354.
35. Fleming AD, Yanagimachi R. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J Exp Zool.* 1984;229(3):485–489.
36. Llanos MN, Morales P, Riffo MS. Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool.* 1993;267(2):209–216.
37. Riffo M, Nieto A. Lysophosphatidylcholine induces changes in physicochemical, morphological, and functional properties of mouse zona pellucida interaction. *Mol Reprod Dev.* 1999;53(1):68–76.
38. Riffo MS, Parraga M. Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. *J Exp Zool.* 1997;279(1):81–88.
39. Sato H, et al. Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal sperm maturation and fertility in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1400–1414.
40. Nevalainen TJ, Eerola LI, Rintala E, Laine VJ, Lambeau G, Gelb MH. Time-resolved fluoroimmunoassays of the complete set of secreted phospholipases A2 in human serum. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1733(2–3):210–223.
41. Kabre E, Chaib N, Boussard P, Merino G, Devleeschouwer M, Dehaye JP. Study on the activation of phospholipases A2 by purinergic agonists in rat submandibular ductal cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1436(3):616–627.
42. Marshall LA, Roshak A. Coexistence of two biochemically distinct phospholipase A2 activities in human platelet, monocyte, and neutrophil. *Biochem Cell Biol.* 1993;71(7–8):331–339.
43. Singer AG, et al. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48535–48549.
44. Smart BP, Oslund RC, Walsh LA, Gelb MH. The first potent inhibitor of mammalian group X secreted phospholipase A2: elucidation of sites for enhanced binding. *J Med Chem.* 2006;49(10):2858–2860.
45. Henderson WR Jr, et al. Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med.* 2007;204(4):865–877.
46. Fujioka D, et al. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation.* 2008; 117(23):2977–2985.
47. Muller CH. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J Androl.* 2000; 21(1):10–30.
48. Meizel S, Turner KO. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 1983; 161(2):315–318.
49. Surrel F, et al. Group X phospholipase A2 stimulates the proliferation of colon cancer cells by producing various lipid mediators. *Mol Pharmacol.* 2009;76(4):778–790.
50. Morioka Y, et al. Mouse group X secretory phospholipase A2 induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A2 receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 381(1):31–42.
51. O'Toole CM, Arnoult C, Darszon A, Steinhart RA, Florman HM. Ca<sup>2+</sup> entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell.* 2000; 11(5):1571–1584.
52. Green DP. The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J Cell Sci.* 1978;32:137–151.
53. Mounier CM, et al. Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A(2) occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A(2)- $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2004;279(24):25024–25038.
54. Hamaguchi K, et al. Induction of distinct sets of secretory phospholipase A(2) in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1635(1):37–47.
55. Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, Murakami M. Human group III phospholipase A2 suppresses adenovirus infection into host cells. Evidence that group III, V and X phospholipase A2s act on distinct cellular phospholipid molecular species. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(11):1389–1396.
56. Eerola LI, Surrel F, Nevalainen TJ, Gelb MH, Lambeau G, Laine VJ. Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(7):745–756.
57. Valentin E, Ghomashchi F, Gelb MH, Lazdunski M, Lambeau G. On the diversity of secreted phospholipases A(2). Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31195–31202.
58. Cupillard L, Koumanov K, Mattei MG, Lazdunski M, Lambeau G. Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J Biol Chem.* 1997;272(25):15745–15752.
59. Valentin E, Singer AG, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb MH, Lambeau G. Cloning and recombinant expression of human group IIF-secreted phospholipase A(2). *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279(1):223–228.
60. Schaefer M, Hofmann T, Schultz G, Gudermann T. A new prostaglandin E receptor mediates calcium influx and acrosome reaction in human spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3008–3013.
61. Morishita T, Nozaki M, Sano M, Yokoyama M, Nakamura G, Nakano H. Regional differences of phospholipase A2 activity in the rabbit oviductal epithelium. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1992;47(3):199–202.
62. Manjunath P, Soubeyrand S, Chandonnet L, Roberts KD. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J.* 1994;303(pt 1):121–128.
63. Upreti GC, Hall EL, Koppens D, Oliver JE, Vishwanath R. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim Reprod Sci.* 1999;56(2):107–121.
64. Wang SK, Huang YF, Li BT, Xia XY, Wang ZZ. Detection and clinical significance of phospholipase A2 in semen of male infertile patients. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2003;9(2):90–93.
65. Mitsuishi M, Masuda S, Kudo I, Murakami M. Group V and X secretory phospholipase A2 prevents adenoviral infection in mammalian cells. *Biochem J.* 2006;393(pt 1):97–106.
66. Asano A, et al. Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts. *J Cell Physiol.* 2009;218(3):537–548.
67. Parks JE, Arion JW, Foote RH. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 1987;37(5):1249–1258.
68. Thaler CD, Thomas M, Ramalje JR. Reorganization of mouse sperm lipid rafts by capacitation. *Mol Reprod Dev.* 2006;73(12):1541–1549.
69. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod.* 2007;77(2):190–201.
70. Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 2006; 65(5):958–978.
71. Singh DK, Subbaiah PV. Modulation of the activity and arachidonic acid selectivity of group X secretory phospholipase A2 by sphingolipids. *J Lipid Res.* 2007;48(3):683–692.
72. Jensen LB, et al. Mechanisms governing the level of susceptibility of erythrocyte membranes to secretory phospholipase A2. *Biophys J.* 2005;88(4):2692–2705.
73. Cross NL. Sphingomyelin modulates capacitation of human sperm in vitro. *Biol Reprod.* 2000; 63(4):1129–1134.
74. Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Muller K. Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction. *Reproduction.* 2005;130(5):615–626.





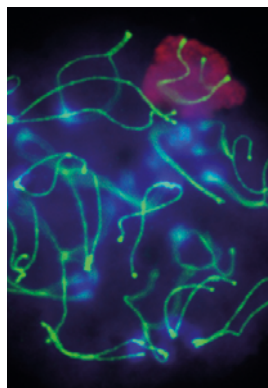
75. de Vantery Arrighi C, Lucas H, Chardonens D, de Agostini A. Removal of spermatozoa with externalized phosphatidylserine from sperm preparation in human assisted medical procreation: effects on viability, motility and mitochondrial membrane potential. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:1.
76. Marti E, Perez-Pe R, Colas C, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Study of apoptosis-related markers in ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2008; 106(1-2):113-132.
77. Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, Florman HM. Trp2 regulates entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol.* 2001;3(5):499-502.
78. Escoffier J, et al. Expression, localization and functions in acrosome reaction and sperm motility of Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 channels in sperm cells: an evaluation from Ca(V)3.1 and Ca(V)3.2 deficient mice. *J Cell Physiol.* 2007;212(3):753-763.
79. Nayernia K, Adham IM, Shamsadin R, Muller C, Sancken U, Engel W. Proacrosin-deficient mice and zona pellucida modifications in an experimental model of multifactorial infertility. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(5):434-440.
80. Drab M, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science.* 2001;293(5539):2449-2452.
81. Rouault M, et al. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry.* 2007;46(6):1647-1662.
82. Fraser LR. In vitro capacitation and fertilization. *Methods Enzymol.* 1993;225:239-253.

mifères, la physiologie du sperme dans les voies génitales femelles et plusieurs étapes bien définies menant à la fécondation. Les phospholipases, qui ont pour rôle de contrôler la composition lipidique du spermatozoïde en hydrolysant les phospholipides de manière très spécifique, sont impliquées dans des mécanismes aussi variés que le mouvement flagellaire, la capacitation acrosomique, ainsi que dans les oscillations calciques de la queue qui entraînent l'activation ovocytaire. Les phospholipases, la PLC $\zeta$  et la PLA $_2$  sécrétée par le spermatozoïde pourraient représenter des cibles thérapeutiques pour lutter contre l'infertilité

## Les phospholipases, enzymes clés de la physiologie spermatique

### Quels enjeux thérapeutiques ?

**Christophe Arnoult<sup>1,2</sup>, Jessica Escoffier<sup>3</sup>, Léa Munch<sup>1,2</sup>, Virginie Pierre<sup>1,2</sup>, Sylviane Hennebicq<sup>1,2,4</sup>, Gérard Lambeau<sup>5,6</sup>, Pierre Ray<sup>1,2,7</sup>**



constituées d'une tête polaire phospholipidique reliée, *via* une molécule de glycérol, à une queue hydrophobe constituée de deux acides gras [1]. La choline et l'éthanolamine sont les résidus les plus courants au niveau de la partie polaire, mais d'autres, tels que la sérine ou l'inositol biphosphate, composent certaines GPL (Figure 1). Tous ces GPL sont hydrolysés par une superfamille de protéines, les phospholipases (PL). Les PL sont séparées en quatre familles chez les mammifères

<sup>1</sup>Équipe génétique, infertilité et thérapeutiques, laboratoire AGIM (âge, imagerie et modélisation), CNRS FRE3405, 38700 La Tronche, France ;

<sup>2</sup>Université Joseph Fourier, Grenoble, 38000, France ;

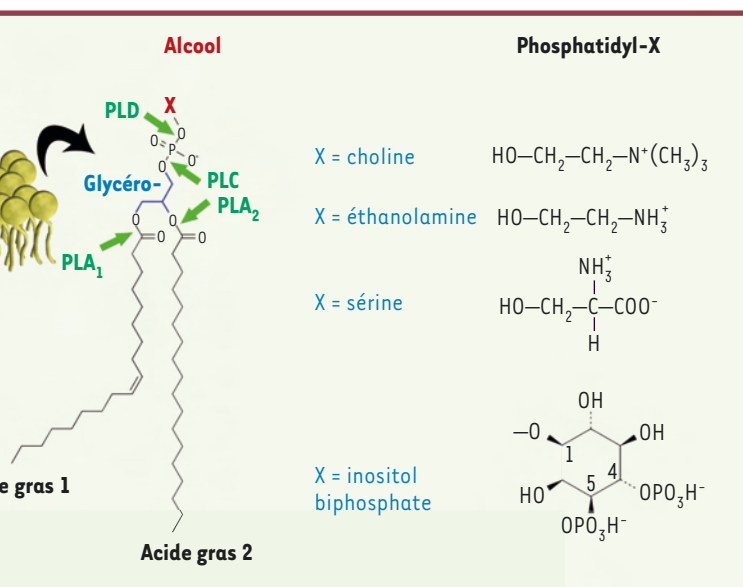
<sup>3</sup>Department of veterinary and animal sciences, university of Massachusetts-Amherst, Amherst, 01003 MA, États-Unis ;

<sup>4</sup>Centre hospitalo-universitaire (CHU) de Grenoble, centre d'assistance médicale à la procréation - centre d'étude et de conservation des œufs et du sperme (AMP-CECOS), Grenoble, 38043, France ;

<sup>5</sup>CNRS, UMR7275, Sophia Antipolis, Valbonne, 06560, France ;

<sup>6</sup>Université de Nice-Sophia Antipolis, Valbonne, 06000, France ;

<sup>7</sup>CHU de Grenoble, unité fonctionnelle (UF) de biochimie et génétique moléculaire



**Chimie des glycérophospholipides.** Les GPL sont construits autour d'une molécule de glycérol dont les deux groupes hydroxyles sont estérifiés par différents acides gras (AG) et le troisième par un alcool (X). Différents alcools (molécules X) sont finalement greffés sur l'acide phosphorique pour former du phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine ou phosphatidylinositol 4,5 biphosphate. Leur propriété amphipathique est notable avec une partie hydrophobe due aux AG et un pôle hydrophile dû à l'ester phosphorique et à l'alcool. La localisation des sites de coupure par les différentes PL est indiquée par des flèches vertes. La PLB coupe les deux chaînes d'acides gras et a donc une activité PLA<sub>1</sub> et PLA<sub>2</sub>.

Les GPL agissent alors de manière autocrine/paracrine. Les différents types de GPL agissent soit directement comme médiateurs lipidiques, soit en participant à la synthèse de médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes). Chaque type cellulaire possède un profil particulier de PL lui permettant de répondre à des signaux externes qu'internes [2, 3].

Plusieurs enzymes ont été décrites. Leur rôle est très important dans la physiologie spermatique : trois PLC (PLCβ1, PLCδ4, PLCγ2), une PLA<sub>2</sub> sécrétée [sPLA<sub>2</sub>] de groupe X [sPLA<sub>2</sub>-intracellulaire indépendante du calcium [iPLA<sub>2</sub>]] et agissent à différents niveaux et régulent les grandes étapes de la physiologie spermatique que sont la mobilité spermatozoïde, la réaction acrosomique. La PLCβ1 permet à l'acide gras 1 de passer de la position sn-3 à sn-1.

La réaction acrosomique est un processus important et complexe [5, 6] mais dont la description est hors du champ de cette revue. L'acquisition de la mobilité va permettre aux spermatozoïdes de traverser la glaire cervicale et de progresser dans le tractus génital femelle où ils interagissent fortement avec l'épithélium utérin et tubaire [7]. L'arrivée dans l'utérus correspond à un nouveau changement d'environnement (pH, concentrations ioniques, osmolarité, présence d'un nouvel environnement protéique) qui influe considérablement sur les spermatozoïdes. De profondes modifications protéiques et lipidiques interviennent donc lors du cheminement du spermatozoïde vers l'ovocyte [8]. Cette étape obligatoire, appelée capacitation [9], prépare le spermatozoïde à sa rencontre avec l'ovocyte. Lors de celle-ci, autre étape importante de la physiologie spermatique, le spermatozoïde réalise alors la réaction acrosomique [10]. Celle-ci, longtemps considérée comme un simple événement d'exocytose, permet non seulement la sécrétion de protéases facilitant l'entrée du spermatozoïde à travers la zone pellucide ovocytaire, mais également l'extériorisation des récepteurs Izumo<sup>1</sup> [48] (→) (identifiés chez la souris) jusqu'alors masqués et intervenant dans la fusion des deux gamètes [11].

(→) Voir m/s n° 5, mai 2005, page 480

Ces trois étapes que sont la modification de la mobilité, la capacitation et la réaction acrosomique impliquent chacune spécifiquement des dizaines, voire des centaines de protéines différentes et de nombreuses voies de signalisation.



omme et explique les variations importantes du t des spermatozoïdes. Les causes de cette hétéro- comprises mais pourraient impliquer les processus méiose, de la spermiogenèse ainsi que les processus ididymaire [45]. La maturation des spermatozoïdes tion est asynchrone, voire incomplète, ce qui accoît té chez l'homme comme chez la souris. Au final, sur ons de spermatozoïdes éjaculés, moins d'une dizaine yte. Ainsi, les étapes que constituent la progression permatique dans les voies génitales femelles et l'in- pithélium utérinaire constitueraient de véritables n [12].

### Phospholipases dans la mobilité spermatique

er spermatozoïde contient de plusieurs centaines à un es différentes [13]. Leur rôle spécifique reste encore tement inconnu pour nombre d'entre elles, ce qui eu de connaissances des mécanismes moléculaires tement flagellaire. Plusieurs enzymes jouent un rôle ttement : la sérine-thréonine kinase, la protéine t les tyrosine kinases qui contrôlent les cycles de déphosphorylation des protéines structurales de type calcium, messenger secondaire complexe, est aussi un ce processus. Il contrôle l'adénylate cyclase soluble tion d'AMP cyclique [15], et les cycles de phospho- norylation *via* la calmoduline [16]. Par ailleurs, il ent sur les protéines structurales de l'axonème et peractivation [17].

isation lipidique ait été peu étudiée, plusieurs argu- les lipides membranaires du flagelle dans le contrôle ellulaire. Tout d'abord, si une grande partie du calcium extracellulaire *via* un canal calcique spécifique aux ppelé CatSper [18], une partie provient aussi d'un tracellulaire et spécifique au spermatozoïde situé veloppe nucléaire [19]. Ce calcium est relâché *via* le (canal calcique), l'IP3 provenant de l'hydrolyse du (voir plus loin) [20].

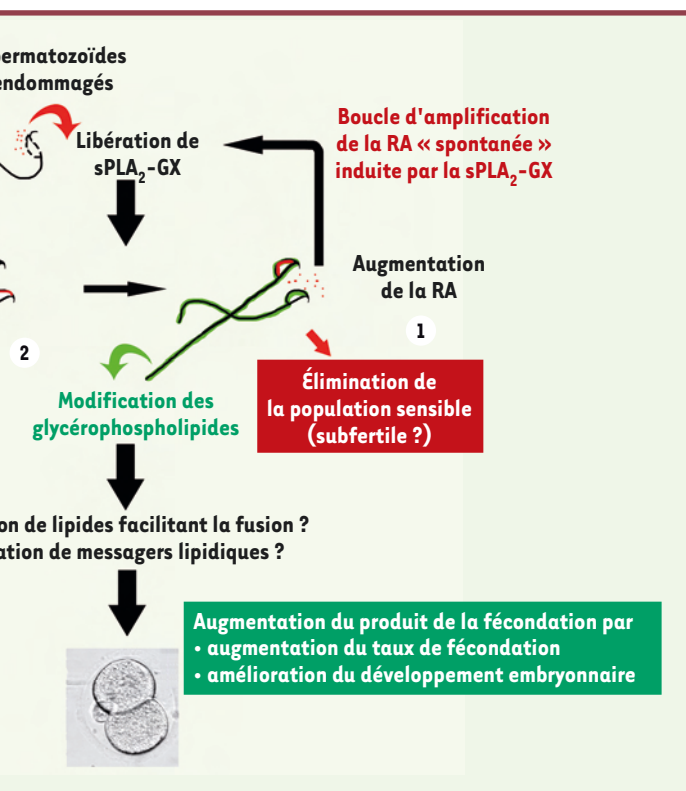
études ont montré que certaines asthénozoosper- faible mobilité des spermatozoïdes [47] (a) sont

la composition en lipides. Chez la souris, deux PL ont été impliquées dans le contrôle du battement flagel- laire des spermatozoïdes matures : la PLA<sub>2</sub> de groupe VIA (Ca<sup>2+</sup>-*independent phospholipase* A<sub>2</sub> ou iPLA<sub>2</sub>β) et la PLA<sub>2</sub> sécrétée de groupe X (sPLA<sub>2</sub>-GX). Les ani- maux déficients en iPLA<sub>2</sub>β ont une asthénozoospermie marquée et, chez les animaux contrôles, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme produit un effet similaire sur la mobilité du spermatozoïde, deux observations qui démontrent le rôle de cette enzyme dans le maintien de la fonction flagellaire du sperma- tozoïde mature [24]. La sPLA<sub>2</sub>-GX sécrétée au cours de la capacitation inhibe quant à elle la mobilité fla- gellaire. Cependant, l'enzyme semble cibler plus par- ticulièrement les spermatozoïdes dont la mobilité est déficiente, en rapport avec une composition lipidique membranaire particulière [25].

### Rôles des phospholipases dans la capacitation

La capacitation est définie comme une série d'événe- ments complexes qui affectent le spermatozoïde lors de sa progression dans le tractus génital femelle et qui sont nécessaires pour que le spermatozoïde puisse féconder l'ovocyte [8, 9]. Les modifications biologiques nombreuses incluent, entre autres, la diminution du cholestérol de la membrane plasmique, un change- ment de fluidité membranaire, une réorganisation des lipides et des protéines membranaires, de multiples événements de phosphorylation, une alcalinisation du cytoplasme et une hyperpolarisation membranaire. Le rôle et l'importance de toutes ces modifications, et en particulier ceux de la polymérisation de l'actine, dans le pouvoir fécondant du spermatozoïde restent encore mal compris. Malgré tout, il a été montré que la formation des filaments d'actine est inhibée par des inhibiteurs de la PLD et est stimulée par l'apport de PLD exogène ou d'acide phosphatidique [26].

Cette multitude d'événements biologiques augmente l'efficacité de la fécondation. La fin de cette période



**Figure 2. Rôles physiologiques possibles de la sPLA<sub>2</sub> de groupe X (sPLA<sub>2</sub>-GX) au cours de la capacitation du spermatozoïde de souris.**

Voie 1 : la sPLA<sub>2</sub>-GX déclenche la réaction acrosomique (RA) d'une sous-population sensible. Ces spermatozoïdes ne peuvent plus participer à la fécondation, car ils sont incapables de traverser la zone pellucide et sont donc éliminés du processus de fécondation. Voie 2 : la sPLA<sub>2</sub>-GX change la composition lipidique des spermatozoïdes insensibles à l'effet de la sPLA<sub>2</sub> sur la réaction acrosomique, et ces modifications sont nécessaires pour optimiser la fécondation (d'après [27]).

PLCδ4, seule PLCδ4 semble intervenir dans la production d'IP3 au cours de la réaction acrosomique chez la souris. En effet, seules les souris mâles déficientes en protéine PLCδ4 ont une fécondité diminuée [30]. De plus, en l'absence de la PLCδ4, la signalisation calcique induite par ZP3 (*zona protein 3*), un des agonistes naturels de la réaction acrosomique chez la souris, est complètement inhibée [31].

atiqua. Curieusement, seule une sous-population de est sensible à l'activité de la sPLA<sub>2</sub>-GX. L'inhibition ou génétique de la sPLA<sub>2</sub>-GX entraîne une diminution adation et a un effet délétère sur le développement ce, alors que le traitement de spermatozoïdes avec ogène conduit à l'effet inverse [27]. Ces résultats modifications lipidiques induites par la sPLA<sub>2</sub>-GX au itation sont importantes pour insérer dans le sper- messagers lipidiques secondaires favorisant le déve- onnaire précoce. La sélection des spermatozoïdes dans un premier temps, sur la traversée du mucus les interactions entre les spermatozoïdes et les cel- utérotubaires [28] et, finalement, sur le contrôle de mique précoce par la sPLA<sub>2</sub>-GX [25].

tion calcique induite par ZP3 (*zona protein 3*), un des agonistes naturels de la réaction acrosomique chez la souris, est complètement inhibée [31].

Il est classiquement admis que le calcium ainsi mobilisé se fixe sur le complexe SNARE (*soluble NSF attachment receptor*)-synaptotagmine et permet la fusion entre la membrane plasmique et la membrane externe de l'acro- some [10]. Cependant, certains résultats font penser qu'une PLA<sub>2</sub> pourrait être impliquée dans le mécanisme de fusion de ces deux membranes *via* la production de lipides qui facilitent la fusion. En effet, l'acide arachi- donique et la lysophosphatidylcholine sont produits au cours de la réaction acrosomique, et ces deux molé- cules résultent de l'hydrolyse de phospholipides par une PLA<sub>2</sub>. De plus, le prétraitement des spermatozoïdes par un inhibiteur non spécifique des PLA<sub>2</sub> bloque la réaction



Contraception	Tri de spermatozoïdes FIV/ICSI	ICSI - activation
Non	Oui Augmentation du taux de réaction acrosomique spontanée	Non
?	Non	Non
Non	Non	Non
Oui Souris KO infertiles	Non	Non
Oui Mutations de PLCζ entraînent une infertilité masculine Absence dans les cellules somatiques	Oui Absence dans 30 % des spermatozoïdes humains	Oui Activation ovocytaire chez les patients sans PLCζ
?	Non	Non

#### Phosphatidylinositases présentes dans le spermatozoïde et leur potentialité comme cible thérapeutique dans le cadre de la contraception et de

... d'une banque d'ADN complémentaire de testicule... PLCζ est la plus petite des PLC connues à ce jour, ... des domaines habituellement présents comme ... (*Src homology 2*), SH3 ou PH (*pleckstrin homology*). ... ovocytaire de la protéine ou de son ARN messager est ... l'activation ovocytaire et de déclencher des oscilla- ... milaires à celles que provoque la fécondation [34]. ... PLCζ se présente sous la forme d'un anneau à la base ... localisation subcellulaire reste encore peu comprise ... d'un acrosome est nécessaire puisque cette protéine ... spermatozoïdes de patients atteints de globozoosper- ... PLCζ a la particularité d'être extrêmement sensible ... pense qu'elle est naturellement active aux concen- ... tions de calcium (10-100 nM) [36]. Cependant, dans ... elle serait inactivée par la fixation de son domaine ... (*SH3 motif*) à certains phosphatidylinositides comme ... [37].

thérapeutique, car chez l'homme son absence liée à des facteurs génétiques cause une infertilité [38].

La qualité du sperme recueilli pour les fécondations *in vitro* (FIV) fait l'objet d'une grande attention lors des techniques d'aide médicale à la procréation (AMP) et plusieurs paramètres sont étudiés : concentration spermatique, morphologie, mobilité et plus récemment niveau de fragmentation de l'ADN. Cependant, ces paramètres ont une faible valeur prédictive quant à la réussite ultérieure de la FIV [39]. Les spermatozoïdes utilisés au cours de l'AMP sont généralement triés par une procédure de centrifugation dans un gradient de densité qui permet de sélectionner ceux qui sont mobiles et dont la morphologie est normale. Lors d'une procédure d'ICSI, le spermatozoïde est en plus sélectionné au microscope sur sa morphologie. Aujourd'hui, de nouvelles méthodes permettant d'éliminer une partie des spermatozoïdes présentant une fragmentation de l'ADN sont en cours d'évaluation [40].

er une sous-population de spermatozoïdes présentes des lipides composant leur membrane plasmique montré que le traitement des spermatozoïdes par cette avant FIV permet d'augmenter la fréquence de clivage (embryons deux cellules). On peut donc envisager l'uti- de PL dans le cadre de l'AMP. Des expériences sur un on humain sont actuellement en cours afin de tester des sPLA<sub>2</sub> dans la FIV humaine.

yttaire lors de l'ICSI reste une étape délicate qui de la libération du facteur spermatique par le sper- me entrée artificielle de calcium lorsque la pipette e brèche dans la membrane plasmique. La trituration e, qui permet de déchirer la membrane plasmique e et libère le facteur spermatique, est une étape ès de l'activation ovocytaire. Chez l'homme, environ ozoïdes d'un éjaculat normal ne possèdent pas de s, certaines infertilités comme la globozoospermie une absence de PLC $\zeta$  et les spermatozoïdes sont d'activer les ovocytes même lorsqu'ils sont injectés l'ooplasme [43]. Afin de pallier cette déficience, que A23187 a été utilisé avec succès au cours de la . Cependant, le signal calcique qu'induit l'A23187 de celui que produit la libération naturelle de PLC $\zeta$  [44], et l'utilisation de PLC $\zeta$ , pourrait se substituer à celle d'ionophores calciques. Il apparaît évident s objectif de la quantité de PLC $\zeta$  libérée lors de l'ICSI ctueur améliorant le rendement et la sécurité de ces oleau I résume les potentialités de chaque PL comme ue.

us avons montré que les PL sont des enzymes cen- trôle de la physiologie spermatique et, par consé- quification de la composition phospholipidique de la que des spermatozoïdes affecte l'activité des PL et signalisation en aval. Ces résultats permettent d'ex- es relations qui existent entre infertilité et altération e spermatique chez les patients mâles infertiles. sentent des cibles thérapeutiques intéressantes pour olécules stimulant la fertilité comme la sPLA<sub>2</sub>-GX que le développement d'inhibiteurs ciblant la PLC $\zeta$  nterrait une piste intéressante dans le cadre de la

processes such as 1) the control of flagellum beats, 2) capacitation - the molecular transformations prepara- ing the sperm for fertilization, 3) acrosome reaction and 4) oocyte activation by eliciting calcium oscilla- tions. The emerging important role of phospholipases is also emphasized by the fact that alterations of sperm lipids can lead to infertility. Phospholipases may repre- sent valuable targets to develop anti- and pro-fertility drugs. Results obtained in mice are encouraging, since treatment of sperm with recombinant sPLA<sub>2</sub> of group X, known to be involved in capacitation, improves fertiliza- tion *in vitro*, while co-injection of PLC $\zeta$  RNA with infertile sperm restores oocyte activation.  $\blacklozenge$

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les don- nées publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Larsson K, Quinn P, Sato K, Tiberg F. *Lipids : structure, physical properties and functionality*. Bridgwater : The Oily Press Lipid Library, 2006.
2. Lambeau G, Gelb MH. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem* 2008 ; 77 : 495-520.
3. Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 ; 9 : 162-76.
4. Verma RJ. Sperm quiescence in cauda epididymis : a mini-review. *Asian J Androl* 2001 ; 3 : 181-3.
5. Robertson SA. Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res* 2005 ; 322 : 43-52.
6. Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, et al. Seminal plasma proteins : what role do they play ? *Am J Reprod Immunol* 2011 ; 66 : 11-22.
7. Hung PH, Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the ruminant oviduct. *Soc Reprod Fertil* 2010 ; 67 : 257-66.
8. Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil* 2007 ; 65 : 245-59.
9. Travis AJ, Kopf GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest* 2002 ; 110 : 731-6.
10. Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol* 2008 ; 52 : 503-10.
11. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, et al. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005 ; 434 : 234-8.
12. Suarez SS. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol* 2008 ; 52 : 455-62.
13. Escalier D. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update* 2006 ; 12 : 449-61.
14. Luconi M, Carloni V, Marra F, et al. Increased phosphorylation of AKAP



inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular  $Ca^{2+}$  store is sperm hyperactivated motility. *Biol Reprod* 2001 ; 65 : 1606-15.

ankaynak K, *et al.* Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Essent Fatty Acids* 2006 ; 75 : 75-9.

ten SV, Calamera JC, *et al.* High cholesterol content and decreased human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation enzymes. *J Androl* 2009 ; 30 : 552-8.

ogai Y, *et al.* Group III secreted phospholipase A2 regulates epididymal and fertility in mice. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 1400-14.

*et al.* Male mice that do not express group VIA phospholipase A2 produce impaired motility and have greatly reduced fertility. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 10408-12.

emel I, *et al.* Group X secreted phospholipase A2 specifically decreases sperm motility. *J Physiol* 2011 ; 226 : 2601-9.

6, Gur Y, *et al.* Crosstalk between protein kinase A and C regulates F-actin formation during sperm capacitation. *Dev Biol* 2004 ; 267 : 230-41.

anemoto A, *et al.* Group X phospholipase A2 is released during sperm capacitation and controls fertility outcome in mice. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 1415-28.

oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 934-43.

arszon A, *et al.*  $Ca^{2+}$  entry through store-operated channels in mouse spermatozoa and drives the acrosome reaction. *Mol Biol Cell* 2000 ; 11 : 1571-84.

Inoue T, *et al.* Requirement of phospholipase Cdelta4 for the zona pellucida binding and acrosome reaction. *Science* 2001 ; 292 : 920-3.

Inoue T, *et al.* Phospholipase Cdelta4 is required for  $Ca^{2+}$  mobilization and acrosome reaction in sperm. *J Cell Biol* 2003 ; 161 : 79-88.

erm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci* 2007 ; 12 : 10408-12.

MG, Parrington J, *et al.* PLC zeta : a sperm-specific trigger of  $Ca^{2+}$  release and embryo development. *Development* 2002 ; 129 : 3533-44.

unders CM, *et al.* Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkey oocytes: localization, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 2005 ; 130 : 10408-12.

rschedi MS, *et al.* Complete globozoospermia associated with PLCzeta mutation: treatment with calcium ionophore and ICSI results in pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2005 ; 10 : 10408-12.

shikano T, *et al.* Recombinant phospholipase Czeta has high  $Ca^{2+}$  sensitivity and is essential for fertilization in mouse eggs. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 10408-12.

37. Kouchi Z, Shikano T, Nakamura Y, *et al.* The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase Czeta. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 21015-21.
38. Kashir J, Konstantinidis M, Jones C, *et al.* A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLCzeta) leads to male infertility. *Hum Reprod* 2012 ; 27 : 222-31.
39. Muller CH. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J Androl* 2000 ; 21 : 10-30.
40. Rawe VY, Boudri HU, Sedo CA, *et al.* Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 2010 ; 20 : 320-3.
41. Polak DF, Denaday F. Single and twin ongoing pregnancies in two cases of previous ART failure after ICSI performed with sperm sorted using annexin V microbeads. *Fertil Steril* 2010 ; 94 : 351.
42. Escoffier J, Couvet M, de Pomyers H, *et al.* Snake venoms as a source of compounds modulating sperm physiology: secreted phospholipases A2 from *Oxyuranus scutellatus scutellatus* impact sperm motility, acrosome reaction and *in vitro* fertilization in mice. *Biochimie* 2010 ; 92 : 826-36.
43. Yoon SY, Jellerette T, Salicioni AM, *et al.* Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce  $Ca^{2+}$  release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 3671-81.
44. Ciapa B, Arnoult C. Could modifications of signalling pathways activated after ICSI induce a potential risk of epigenetic defects ? *Int J Dev Biol* 2011 ; 55 : 143-52.
45. Noblanc A, Drevet J, Kocer A. Dommages post-testiculaires aux gamètes mâles : rôles de l'épididyme. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 519-25.
46. Montellier E, Rousseaux S, Kochbin S. Feux croisés sur le nucléosome : bases moléculaires de la compaction du génome mâle haploïde. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 485-9.
47. Escalier D, Touré A. Malformations de l'appareil flagellaire du spermatozoïde impliquées dans l'infertilité chez l'homme. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 503-11.
48. Gilgenkrantz S. Izumo ou le mariage fusionnel entre spermatozoïde et ovocyte. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 480.

---

## TIRÉS À PART

C. Arnoult

**Bon de commande**

À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris



[6]. Peut-être le tra-  
é plus complet si une  
ts nés de conception  
été prise en compte

### uels rassurants

en se limitant à l'ICSI  
zoïdes épидидymai-  
te technique ait a été  
e sans respecter « le  
aution », les résultats  
rassurants sur l'avenir  
nts nés par ICSI dans le

### Follow-up of the children born by ICSI

#### REMERCIEMENTS

À Pierre Jouannet et à Stéphane Viville pour  
leur relecture du manuscrit.

#### CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts  
concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Olivennes F, Fanchin R, Righini C, et al. La fécondation  
*in vitro* : aujourd'hui et demain. *Med Sci (Paris)* 2000 ;  
16 : 316-23.
2. Guenedal ML, Falquet C, Warter S, et al. Les risques  
liés à l'injection intracytoplasmique du spermatozoïde  
(ICSI). *Med Sci (Paris)* 2001 ; 17 : 44-53.
3. Buffat C, Patrat C, Merlet F, et al. CSI outcomes in  
obstructive azoospermia: influence of the origin of  
surgically retrieved spermatozoa and the cause of  
obstruction. *Hum Reprod* 2006 ; 21 : 1018-24.
4. Belva F, De Schrijver F, Tournaye H, et al. Neonatal  
outcome of 724 children born after ICSI using non-  
ejaculated sperm. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 1752-8.
5. Woldrinfh GH, Horvers M, Janssen AJ, et al. Follow-  
up of children born after ICSI with epididymal  
spermatozoa. *Hum Reprod* 2011 ; 26 : 1759-67.
6. Van der Meulen BF, Ruiter SAJ, Lutje HC, et al. *Bayley  
scales of infant development*, 2<sup>nd</sup> ed. Nederlandse  
versie, Swets Test Publishers, 2002.
7. Jouannet P. L'assistance médicale à la procréation :  
enjeux et mutations. *BEH* 2011 ; 23-24 : 261-2.
8. Thépot F. Assistance médicale à la procréation : état  
des pratiques en France. *BEH* 2011 ; 23-24 : 263-83.

## NOUVELLE

### iotactisme du tozoïde est régulé par ion de la progestérone anal calcique CATSPER

ult, Virginie Pierre, Pierre F. Ray

Équipe génétique, infertilité et thérapeutique,  
Laboratoire AGIM, CNRS FRE3405,  
Université Joseph Fourier de Grenoble, domaine de la Merci,  
Faculté de médecine, bâtiment Jean Roget,  
38700 La Tronche, France.  
[christophe-arnoult@ujf-grenoble.fr](mailto:christophe-arnoult@ujf-grenoble.fr)

ues en mars 2011 dans  
ont réussi à démontrer  
SPER (*cation channel  
d protein*) était direc-  
ar la progestérone [1,  
SPER est un canal cal-  
la mobilité du sper-  
Sa structure est ainsi

du spermatozoïde et est responsable  
de l'hyperactivation nécessaire à la  
traversée de la couche protectrice de  
l'ovocyte appelée zone pellucide (ZP).  
Des souris déficientes (*knock out*) pour  
n'importe quelle sous-unité du canal  
CATSPER sont totalement stériles, car  
leurs spermatozoïdes sont incapables

### Amplification par la progestérone du courant produit par CATSPER

Les auteurs de ces deux publications  
ont utilisé le *patch clamp* et la mesure  
de  $[Ca^{2+}]$  pour mesurer, soit le courant  
calcique, soit les variations du  $[Ca^{2+}]$   
intracellulaire dans le spermatozoïde en  
présence de progestérone. Ils ont ainsi

0 pM, le maximum de étant atteint pour des de l'ordre 100 nM. La tations de  $Ca^{2+}$  a per- que la réponse à la t constituée de deux ansitoire de  $Ca^{2+}$  suivi atation lente. La rapi- ise à la progestérone du  $Ca^{2+}$  intracellulaire après l'introduction de - est en faveur d'une e cette hormone sur le ulaire CATSPER. Cette nforcée par le fait que agoniste du récepteur rogestérone, ne modi- tialisation du courant e plus, les auteurs ont estérone afin qu'elle énétrer dans la cellule ue la potentialisation PER n'est pas altérée cation, démontrant *in* ation membranaire du rogestérone dans le alement, ils ont aussi rence de réponse entre des selon qu'ils ont ape de capacitation<sup>1</sup>. du  $Ca^{2+}$  est plus faible moins prolongée dans es qui n'ont pas subi plus, la capacitation zoïdes sensibles à des lus faibles de prog- tats montrent que le evient particulièrement rogestérone quand il

les folliculaires qui entourent l'ovocyte, induit une entrée de  $Ca^{2+}$  dans le spermatozoïde qui entraîne la modification des battements du flagelle [8] et serait impliquée dans des mécanismes de chimiotactisme [9, 10]. Le chimiotactisme permet à une cellule ou un animal de se guider vers sa cible en suivant un gradient de facteurs chimiques appelés chimioattractants et relâchés par la cible elle-même. À faibles concentrations, de l'ordre de 1 à 100 pM, la progestérone induit un chimiotactisme tandis que pour des concentrations supérieures à 10  $\mu$ M le chimiotactisme disparaît. Seuls les spermatozoïdes qui ont acquis la capacitation sont sensibles à ce chimioattractant.

Le chimiotactisme du spermatozoïde vers l'ovocyte a été démontré pour la première fois chez l'oursin en 1960. Le chimiotactisme a un sens chez l'oursin, puisque la probabilité de rencontre des gamètes mâles et femelles libérés simultanément dans l'océan est très faible. En revanche, on a longtemps pensé que ce type de mécanisme n'existait pas chez les mammifères chez lesquels la fécondation est interne. Les preuves de la présence d'un chimioattractant dans le liquide folliculaire chez les mammifères seront apportées en 1990, mais l'identité de ce dernier restait inconnue [11]. Les chimioattractants sont produits par les cellules du cumulus qui entourent l'ovocyte ou par l'ovocyte lui-même [12] mais ne se limitent pas à la progestérone décrite ici. De plus, seuls les spermatozoïdes pour lesquels

transmembranaire. Cette dernière induit une augmentation de la concentration d'AMPc intracellulaire responsable de l'augmentation du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique, qui à son tour modifie la direction du spermatozoïde. Les spermatozoïdes humains sont en outre thermosensibles et un gradient de température de 0,5 °C peut changer leur direction. Le canal calcique TRPM8 (*transient receptor potential M8* [15]) est responsable de ce « thermotactisme » du spermatozoïde [16] et là encore, seuls les spermatozoïdes capités y sont sensibles. Ce thermotactisme joue probablement un rôle important *in vivo* puisqu'il existe un gradient de température le long de l'appareil génital femelle qui s'accroît en période d'ovulation [17].

### Le canal CATSPER : un récepteur non nucléaire de la progestérone

Depuis ces vingt dernières années, la question de l'identité des chimioattractants responsables du chimiotactisme du spermatozoïde et des voies de signalisation activées par ces molécules est au cœur des débats. La progression du spermatozoïde dans les voies génitales femelles chez les mammifères semble faire intervenir plusieurs étapes impliquant différents chimioattractants ainsi que le thermotactisme. Il est à noter que chez la souris, CATSPER n'est pas potentialisé par la progestérone, ce qui indique l'existence de différentes stratégies de chimiotactisme selon les espèces. Les travaux présentés dans *Nature* [1, 2] permettent donc une meilleure compré-



'avoir aucun conflit d'intérêts  
publiées dans cet article.

IL, Kirichok Y. Progesterone  
al Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm.  
87-91.

l, Brenker C, et al. The CatSper  
ogesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx  
ure 2011 ; 471 : 382-6.

ez G, et al. A sperm ion channel  
otility and male fertility. *Nature*

arro B, et al. All four CatSper ion  
required for male fertility and  
ated motility. *Proc Natl Acad Sci*  
-23.

Ren D. A novel, single,  
n CATSPERG is associated with  
tein. *Biol Reprod* 2009 ; 81 : 539-44.

6. Chung JJ, Navarro B, Krapivinsky G, et al. A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat Commun* 2011 ; 2 : 153.
7. Kirichok Y, Navarro B, Clapham DE. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca<sup>2+</sup> channel. *Nature* 2006 ; 439 : 737-40.
8. Publicover SJ, Giojalas LC, Teves ME, et al. Ca<sup>2+</sup> signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci* 2008 ; 13 : 5623-37.
9. Teves ME, Barbano F, Guidobaldi HA, et al. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil Steril* 2006 ; 86 : 745-9.
10. Guidobaldi HA, Teves ME, Unates DR, et al. Progesterone from the cumulus cells is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *PLoS One* 2008 ; 3 : e3040.
11. Villanueva-Diaz C, Vadillo-Ortega F, Kably-Ambe A, et al. Evidence that human follicular fluid contains a chemoattractant for spermatozoa. *Fertil Steril* 1990 ; 54 : 1180-2.

12. Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, et al. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 11039-43.
13. Eisenbach, M. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev Genet* 1999 ; 25 : 87-94.
14. Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, et al. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 2003 ; 299 : 2054-8.
15. Vassort G, Fauconnier J. Les canaux TRP (*transient receptor potential*). Une nouvelle famille de canaux à expression variée. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 163-8.
16. De Blas GA, Darszon A, Ocampo AY, et al. TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* 2009 ; 4 : e6095.
17. Bahat A, Tur-Kaspa I, Gakamsky A, et al. Thermotaxis of mammalian sperm cells : a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med* 2003 ; 9 : 149-50.

## NOUVELLE

### miR-122, un microARN « à tout fer »

Sophie Vaumont

(miARN) constituent  
ante de petits ARN non  
ulent l'expression des  
u post-transcriptionnel  
cion dans de nombreux  
giques fondamentaux  
t, différenciation et  
t désormais reconnue.  
res interagissent avec  
on traduite (Z'UTD)

que l'expression régulée de miR-122 est  
importante pour le maintien des fonc-  
tions hépatiques.

Ainsi, le blocage de miR-122 hépatique  
conduit-il à la diminution des taux de  
cholestérol plasmatique et de trigly-  
cérides chez les rongeurs et les prima-  
tes. En outre, les souris chez lesquelles  
miR-122 a été inhibé sont résistantes  
au développement de la stéatose hépa-

Inserm U1016, CNRS UMR 8104,  
Université Paris Descartes,  
Institut Cochin,  
24, rue du Faubourg Saint-Jacques,  
75014 Paris, France.  
[sophie.vaultont@inserm.fr](mailto:sophie.vaultont@inserm.fr)

circadien [3]. miR-122 apparaît donc  
comme un élément crucial du réseau  
de régulation de l'expression des gènes  
hépatiques et pourrait être nécessaire  
à la synchronisation des gènes à l'inter-  
face entre plusieurs voies métaboliques  
(revue [4]).

Contrôle de l'homéostasie du fer  
par l'hépatocyte

## RÉSUMÉ

Le spermatozoïde est une cellule hautement spécialisée qui doit être capable de réaliser des fonctions spécifiques pour être capable de féconder un ovocyte. Il doit être capable de réaliser une réaction acrosomique qui consiste en l'exocytose d'une vésicule géante de sécrétion attachée au noyau. Cette vésicule contient des enzymes qui vont permettre au spermatozoïde de traverser la zone pellucide qui entoure l'ovocyte. Mon travail a consisté à étudier l'effet d'une des enzymes contenue dans l'acrosome, la sPLA<sub>2</sub> de mammifère de groupe X (mGX). C'est la seule phospholipase de mammifères parmi les 5 testées qui a un effet d'inhibition sur une population spécifique de spermatozoïdes ayant une mobilité diminuée. Mon travail a ainsi confirmé la spécificité de cette phospholipase sur la régulation de la physiologie spermatique. Dans un deuxième temps, j'ai participé à la découverte du gène DPY19L2 impliqué dans une infertilité masculine rare, la globozoospermie. La globozoospermie se caractérise par des spermatozoïdes ayant une tête ronde dépourvue d'acrosome. Le gène DPY19L2 est spécifiquement exprimé dans les testicules, il est absent chez 80% des patients globozoospermiques. J'ai caractérisé le rôle de cette protéine et montré qu'elle est impliquée dans l'attachement de l'acrosome au noyau. J'ai pu montrer que cette protéine appartient à la membrane nucléaire interne où elle interagit avec la protéine Sun5, une protéine qui appartient aussi à la membrane nucléaire interne et dont l'expression est spécifique à la spermiogénèse. Sun5 est impliquée dans la formation de complexes LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) qui permettent de relier le cytosquelette au nucléosquelette, constitué entre autres par les lamines. Le rôle de DPY19L2 pourrait permettre de stabiliser l'ancrage de la protéine SUN5 afin de transmettre les forces exercées par le cytosquelette au noyau de la spermatide. DPY19L2 appartient à une famille de protéines DPY19L1 à L4 dont les fonctions restent encore peu caractérisées. Une étude récente montre qu'une diminution de l'expression de Dpy19l1 chez la souris entraîne un défaut de migration des neurones glutamatergiques sur la glie radiale. Mon travail a montré l'importance de DPY19L2 dans le contrôle des interactions noyau-cytosquelette et devrait permettre de mieux comprendre le rôle des autres protéines de cette famille dans divers organes.

## ABSTRACT

The spermatozoon is a highly specialized cell that must be able to perform specific functions to fertilize the oocyte. It must be able to perform the acrosome reaction, an exocytosis of a giant vesicle of secretion, attached to the nucleus. This vesicle contains enzymes that allow the sperm to penetrate the zona pellucida surrounding the oocyte. The aim of my work was first to study the effect of an enzyme present in the acrosome, the sPLA<sub>2</sub> of group X in mouse (mGX). This is the only mammalian phospholipase among the five tested that has an inhibitory effect on sperm specific population with low mobility. My work has confirmed the specificity of this phospholipase on the regulation of sperm physiology. Second, I participated in the discovery of the gene DPY19L2 involved in male infertility, globozoospermia. The globozoospermia is characterized by round head spermatozoa without acrosome. DPY19L2 gene is specifically expressed in the testis and is absent in 80% of globozoospermic patients. I then identified the role of this protein, which is involved in the attachment of the acrosome to the nucleus. I showed that this protein belongs to the inner nuclear membrane where it likely interacts with the protein sun5 which also belongs to the inner nuclear membrane and whose expression is specific to spermiogenesis. Sun5 is involved in the complex formation, called LINC that connects the cytoskeleton to the nucleoskeleton lamina. The role of Dpy19l2 could help stabilizing the anchoring of protein sun5 in order to transmit the forces exerted by the cytoskeleton to the nucleus of the spermatid during acrosome spreading. Dpy19l2 belongs to a protein family containing 4 members, Dpy19l1 to l4, which has not been poorly studied so far. A recent study shows that the knock-down of Dpy19l1 resulted in defective glutamatergics neurons migration on the radial glia. The results obtained during my work would improve the knowledge of Cytoskeleton-nucleoskeleton interaction, and give new insight on this new family of proteins.