



HAL
open science

Impact du stress oxydant sur l'intégrité de l'épigénome spermatique murin

Alexandre Champroux

► **To cite this version:**

Alexandre Champroux. Impact du stress oxydant sur l'intégrité de l'épigénome spermatique murin. Génétique. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT: 2018CLFAC004 . tel-01818050

HAL Id: tel-01818050

<https://theses.hal.science/tel-01818050>

Submitted on 18 Jun 2018

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.

*ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT*
N° d'ordre : ED SVSAE

Thèse

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation

Présentée et Soutenue publiquement par

Alexandre CHAMPROUX

Le 11 Avril 2018

Impact du stress oxydant sur l'épigénome spermatique murin.

Rapporteurs :

Dr. Nathalie Beaujean DR2 Inserm U1208, INRA USC1361, Bron

Pr. François Vialard PUPH CHI, Poissy

Examineurs :

Dr. Valérie Grandjean CR Inserm U1065, C3M, Nice

Pr. Florence Brugnon PUPH CHU, INSERM 1240, IMoST, Clermont-Ferrand

Directeur de thèse :

Dr. Ayhan Kocer MCU UMR 6293, Clermont-Ferrand

Co-directeur de thèse :

Pr. Joël Drevet Pr UMR 6293, Clermont-Ferrand

*ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE,
ENVIRONNEMENT*
N° d'ordre : ED SVSAE

Thèse

Présentée à l'Université CLERMONT AUVERGNE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Génétique, Physiologie, Pathologie, Nutrition, Microbiologie, Santé, Innovation

Présentée et Soutenue publiquement par

Alexandre CHAMPROUX

Le 11 Avril 2018

Impact du stress oxydant sur l'épigénome spermatique murin.

Rapporteurs :

Dr. Nathalie Beaujean DR2 Inserm U1208, INRA USC1361, Bron

Pr. François Vialard PUPH CHI, Poissy

Examineurs :

Dr. Valérie Grandjean CR Inserm U1065, C3M, Nice

Pr. Florence Brugnon PUPH CHU, INSERM 1240, IMoST, Clermont-Ferrand

Directeur de thèse :

Dr. Ayhan Kocer MCU UMR 6293, Clermont-Ferrand

Co-directeur de thèse :

Pr. Joël Drevet Pr UMR 6293, Clermont-Ferrand

A ce spermatozoïde sans qui je ne serais pas là

Remerciements

Remerciements

Tout d'abord, je remercie sincèrement le docteur Nathalie Beaujean et le professeur François Vialard d'avoir accepté de considérer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également le docteur Valérie Grandjean et le professeur Florence Brugnion, toutes deux examinatrices, pour l'investissement dont elles ont fait preuve dans l'évaluation de ce travail de thèse. Pour le temps précieux que chacun de vous a pu accorder à la lecture attentive de ce manuscrit, merci.

Je tiens à remercier le professeur Joël Drevet pour m'avoir accueilli dans l'équipe et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer mon stage de Master 2 ainsi que mes quatre années de doctorat dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le docteur Ayhan Kocer. Merci pour la confiance que tu as pu m'accorder pour la réalisation de ce projet de recherche. J'ai beaucoup appris à tes côtés et t'en suis reconnaissant. Tout le temps que tu as pu me consacrer parfois en contre parti de celui dédié à ta vie de famille, là aussi je t'en suis infiniment reconnaissant. Même si certains jours n'ont pas été faciles nous avons réussi à avancer ensemble sur ce projet malgré quelques frustrations. J'espère que l'on continuera à discuter/collaborer par la suite.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe MePTI.

Marjorie je voulais te remercier pour ton accueil chaleur et ton aide dès mon arrivé en master. Toujours de bons conseils et à l'écoute. Je te souhaite le meilleur et de grandes réussites pour ton post-doc à Paris. En espérant que l'on se retrouvera quand tu seras chef d'équipe...

Allison, au moins tu éviteras la crise cardiaque après mon départ comme il n'y aura plus personne pour te faire peur ! Ta fin de thèse va être chargée mais je suis sûr que tu t'en sortiras même si tu te retrouves seule doctorante de l'équipe.

Rachel, merci pour ta bonne humeur et pour les corrections d'orthographe de chaque rapport ou manuscrit.

Fabrice, depuis le début de mes cours en licence tu m'impressionnais et tu me faisais « peur ». Maintenant je sais que ce n'est que ton côté enseignant et aujourd'hui tu es beaucoup moins impressionnant.

Joëlle merci pour tout tes conseils sur le projet et l'aide pour comprendre la bio-informatique !!

Remerciements

Je remercie également Christelle pour toute l'aide apportée en histologie, en immunofluorescence et microscopie. Tes conseils, ta grande expérience, ta gentillesse ont été d'une grande aide durant ces années. Comment dire, tu es l'expert de l'histologie que chaque laboratoire rêve d'avoir.

Chantal et Stéphanie les dernières arrivées dans l'équipe mais sans qui une partie de ce travail n'aurait pu être présenté. Chantal, il faudra désormais compter sur tes collègues de bureau pour ton café du matin. Stéphanie, ton aide pour le génotypage et à l'animalerie ont été d'un grand secours et un gain de temps en cette dernière année. J'espère pour toi que tu pourras progresser dans de bonnes conditions au niveau de ta carrière. A toutes les deux, je resterais à votre disposition pour tous vos tracas informatiques même à distance. Et un grand merci pour votre écoute.

Marion ici depuis quelques mois, mais je sais que tu prends la relève et que la suite du sujet ainsi que les petites souris sont entre de bonnes mains ; hâte de voir tes nombreux résultats.

Marie-Jo, merci pour ta disponibilité (même quand tu es débordée de travail), ton humour et ton sourire quotidien. Ton énergie communicative va me manquer.

Sandrine, Khirredine et Philippe, ce fût un plaisir de partager avec vous cette expérience. Merci d'avoir cédé avec compréhension, soutien et efficacité à mes caprices animaliers !

Angélique, pour nos discussions en salle BET aux Cézeaux et tous les petits trucs que j'ai pu te demander en matériel, merci.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire pour leur aide, leurs conseils et l'humour que vous pouvez communiquer.

Caroline et Pierre, merci pour la formation confocale et celle sur la modélisation informatique. François et Alexandre (LIMOS), merci pour votre collaboration à ce projet (futur) de modélisation tridimensionnelle.

Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès ou conférences

1. **CHAMPROUX A.**, Damon-Soubeyrand C., Goubely C., Henry-Berger J., Guiton R., Saez F., Drevet JR., Kocer A (2017) Les dommages oxydants à l'ADN spermatique n'affectent pas la topologie des chromosomes mais plutôt l'organisation de la chromatine. Journées de l'école doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement (SVSAE). Premier Prix Communication Orale. Clermont-Ferrand.
2. **CHAMPROUX A**, Noblanc A., Henry-Berger J., Soubeyrand C., Goubely C., Drevet JR., Kocer A. (2017) *Correlation between chromosome localization and oxidative damage in sperm nucleus*. Congrès GDR Repro, Tours.
3. **CHAMPROUX A.**, Henry-Berger J., Soubeyrand C., Carreira J., Drevet JR., Kocer A. (2016) *Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: size matters*. Testis workshop, St Malo.
4. **CHAMPROUX A**, Noblanc A., Henry-Berger J., Soubeyrand C., Drevet JR., Kocer A. (2015) Corrélation entre la position des chromosomes spermatiques et la sensibilité aux dommages oxydants. Congrès de la SALF (Société d'Andrologie de Langue Française), Dijon. Prix Master.

Communications affichées

5. **CHAMPROUX A.**, Damon-Soubeyrand C., Goubely C., Henry-Berger J., Guiton R., Saez F., Drevet JR., Kocer A. (2017) *Chromatin packaging but not chromosome territories is affected by oxidative DNA damage in mouse spermatozoa*. EMBO: Chromatin & Epigenetics, Heidelberg, Allemagne.
6. **CHAMPROUX A**, Noblanc A., Henry-Berger J., Soubeyrand C., Goubely C., Drevet JR., Kocer A. (2017) *Correlation between chromosome localization and oxidative damage in sperm nucleus*. Congrès GDR Repro, Tours.
7. **CHAMPROUX A**, Noblanc A., Henry-Berger J., Soubeyrand C., Carreira J., Drevet JR., Kocer A. (2016) *Correlation between chromosome localization and oxidative damage in sperm nucleus*. Congrès GDR Repro, Rennes.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles soumis ou en cours de soumission :

CHAMPROUX A., Damon-Soubeyrand C., Goubely C., Henry-Berger J., Guiton R., Saez F., Drevet JR, Kocer A. (2018) *Does oxidative DNA damage affect the topology of the mouse sperm nuclear organization?* Soumis au journal *Scientific Report*.

CHAMPROUX A., Cocquet C., Drevet J., and Kocer A. (2018) *A decade of exploring the mammalian sperm epigenome- biological and transgenerational implications.* Soumis au journal *Frontiers in Genetics, Epigenomics and Epigenetics*. Revue.

Gharagozloo, P., Gutiérrez-Adán, A., **CHAMPROUX, A.**, Noblanc, A., Kocer, A., Calle, A., Pérez-Cerezales, S., Pericuesta, E., Polhemus, A., Moazamian, A., et al. (2016). *A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models.* *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 31, 252–262.

CHAMPROUX, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J.R., and Kocer, A. (2016). *Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities.* *Basic Clin. Androl.* 26, 17. Revue.

Kocer, A., Henry-Berger, J., Noblanc, A., **CHAMPROUX, A.**, Pogorelnik, R., Guiton, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Saez, F., Johnson, G.D., et al. (2015). *Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: Size matters.* *Free Radic. Biol. Med.*

Les articles suivants sont présentés en annexe.

CHAMPROUX A., Cocquet C., Drevet J., and Kocer A. (2018). *A decade of exploring the mammalian sperm epigenome- biological and transgenerational implications.* Soumis au journal *Frontiers in Genetics, Epigenomics and Epigenetics*. Revue.

CHAMPROUX, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J.R., and Kocer, A. (2016). *Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities.* *Basic Clin. Androl.* 26, 17. Revue.

Résumé

Chez les Mammifères, le succès de la fécondation et d'un développement embryonnaire viable résident principalement dans la qualité des cellules reproductrices : les gamètes mâles (spermatozoïdes) et femelles (ovocytes) apportant chacun la moitié du patrimoine génétique du futur individu. Dès lors que ce patrimoine génétique est endommagé par différents processus tels que les attaques radicalaires communément appelées stress oxydant, cela peut compromettre la qualité des gamètes et par conséquent le succès de la reproduction. En effet, les dommages oxydants à l'ADN spermatique sont une des causes d'infertilité masculine fréquemment associés aux échecs reproductifs dans le cadre de conception naturelle ou artificielle chez l'homme. Afin de mieux appréhender l'impact des dommages oxydants sur la qualité des spermatozoïdes, notre équipe a généré des modèles murins présentant des atteintes oxydantes de l'ADN associées à des échecs reproductifs. Dans un de ces modèles nous avons pu montrer que tout le noyau spermatique n'était pas concerné de la même façon par les altérations oxydantes. De même, à l'échelle des chromosomes murins les investigations de l'équipe suggéraient que tous n'étaient concernés de la même façon. Dans ce travail de thèse, j'ai développé et mis en œuvre des protocoles d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permettant de montrer que la susceptibilité des chromosomes à l'oxydation est déterminée par la position des chromosomes dans le noyau spermatique murin. En parallèle de cette étude, je me suis intéressé à l'épigénome spermatique et plus particulièrement à la méthylation de l'ADN en conditions de stress oxydant. Les résultats préliminaires montrent qu'un environnement post-testiculaire pro-oxydant peut altérer le profil épigénétique spermatique. Dans un développement pré-clinique du sujet, j'ai contribué à montrer qu'une supplémentation orale antioxydante permettait de corriger les dommages oxydants à l'ADN, en modifiant la réponse antioxydante globale du tissu épидидymaire des animaux.

Mots-clés : Noyau spermatique, stress oxydant, épigénome spermatique, positionnement des chromosomes, supplémentation orale antioxydante

Abstract

In Mammals, the success of fertilization and embryonic development, are associated to the quality of the reproductive cells: male gametes (spermatozoa) and female gametes (oocytes); each bringing half of the genetic heritage of the future individual. This genetic heritage may be compromised by various processes a very common one being radical attacks in cases of oxidative stress, it could diminish the quality of gametes and therefore the success of reproduction. It is well described that sperm DNA oxidative damage (SDOD) is one of the causes of male infertility frequently associated with reproductive failures in the context of natural or artificial conception in humans. To better understand the impact of oxidative damage on the quality of sperm, our team generated mouse models with SDOD. Characterization of these transgenic mice has shown that SDOD alone was associated with increased embryo defects, miscarriages and perinatal mortality. The team also brought forward that SDOD concerns preferentially specific regions of the sperm nucleus. In addition, the team suggested that sperm chromosomes were not identically susceptible to oxidative damage.

In this thesis work, I developed and implemented fluorescence *in situ* hybridization (FISH) protocols to study chromosome positioning in the mouse sperm. I confirmed that susceptibility of chromosomes to oxidation is determined by their position in the murine sperm nucleus. In parallel, I addressed the question whether the sperm epigenome (particularly DNA methylation) was modified in a situation of post-testicular oxidative stress. Preliminary results seem to show that SDOD disturbs the sperm epigenetic profile.

In parallel, in a pre-clinical approach, I contributed to show that an oral antioxidant supplementation can correct SDOD by modifying the antioxidant response of the epididymal tissue of the treated animals.

Keywords: sperm nucleus, oxidative stress, sperm epigenome, chromosome positioning, antioxidant oral supplementation.

Abréviations

°C : degré celsius

+F : plus Fertilix®

3D : Trois dimensions

5caC : 5-carboxycytosine

5fC : 5-formylcytosine

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

5mC : 5-méthylcytosine

8-OHdG : 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine

A : Adénine

ACE : *angiotensin 1 converting enzyme*

ADAM : *A Disintegrin And Metalloprotease*

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AID/APOBEC : cytosine déaminase

Akap4 : *A-Kinase Anchoring Protein 4*

APC/C : *Anaphase promoting complex/cyclosome*

APE1 : *apurinic/apyrimidic endonuclease 1*

ARN : acide ribonucléique

ARNnc : acide ribonucléique non-codants

ATP : Adénosine triphosphate

Bax : Bcl-2 associated X

Bcl-2 : *B-cell leukemia/lymphoma 2*

BER : *Base Excision Repair*

BET : Bromure d'éthidium

BMP4 : *Bone morphogenetic protein 4*

BRDT : *bromodomain testis-specific protein*

BrdU : Bromodéoxyuridine

C : Cytosine

CAMK4 : *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase 4*

Cdh13 : *Cadherin 13*

CENP-A : *centromere protein A*

C.E.O. : *chief executive officer*

cHC : constitutive hétérochromatine

CHD5 : pour *Chromodomain helicase DNA binding protein 5*

ChIP : *Chromatin Immunoprecipitation*

Chr : Chromosome
Cpm : *carboxypeptidase*
CREM : *cAMP responsive element modulator*
CRISP3 : *Cystein rich secretory protein 3*
CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide
CycloB : Cyclophiline B
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DAZL : *Deleted in azoospermia like*
DFI : *DNA fragmentation index*
DKO : *Double knock-out (=Sngpx4; Gpx5^{-/-})*
DMR : *differentially-methylated region*
DNMT : *DNA methyltransferase*
dNTP : désoxyribonucléotide
dpc : *days post-coitum*
DTT : dithiothréitol
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
EOR : Espèces oxygénées réactives
EPC1 : *Enhancer of Polycomb homolog 1*
ES: *embryonic stem cells*
EZH2 : *enhancer of zeste 2*
F : forward
FISH : *Fluorescence in situ hybridization*
FIV : fécondation *in vitro*
Foxg1b : *Forkhead Box Protein G1B*
G : Guanine
Gata6 : *GATA Binding Protein 6*
GFP : *Green fluorescent protein*
Gli3: *Gli family zing finger 3*
GPx : glutathione peroxydase
GRB10 : *Growth Factor Receptor Bound Protein 10*
GST : Glutathione-S-transférase
H : Heure
H1t : *histone 1 testis*
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

H3t : *histone 3 testis*

hCap-18 : *association of human cathelicidin*

HCl : *Acide chlorhydrique*

HDAC : *histone deacetylase*

HE2/EP2 : *Human Epididymis-Specific Protein 2/Epididymal Protein 2*

HILS1 : *spermatid-specific linker histone H1-like*

HOX : *Homeobox*

HP1 : *heterochromatin protein 1*

HPLC : *high pressure liquid chromatography*

HRP : *horseradish peroxidase*

HSF2 : *Heat shock transcription factor 2*

HSPA : *Heat shock protein A*

IAP : *intracisternal A particles*

IB : *Immunoblot*

ICSI : *Intracytoplasmic sperm injection*

IF : *immunofluorescence*

Igf2 : *Insulin growth factor 2*

IgG : *Immunoglobulin G*

kb : *kilobases*

KCL : *chlorure de potassium*

Kcnq1 : *Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 1*

KO : *Knock-out*

KRAB : *Kruppel-Associated Box Domain*

LC/MS : *liquid chromatography mass spectrometry*

Lig : *Ligase*

LINE : *Long interspersed nuclear element*

LIMOS : *Laboratoire d'Informatique, de Modélisation et d'Optimisation des Systèmes.*

M : *molaire*

MAR : *matrix attachment region*

MDA : *malondialdéhyde*

MEB : *Microscope électronique à balayage*

MEST : *mesoderm specific transcript*

MET : *Microscope électronique à transmission*

MgCl₂ : *chlorure de magnésium*

miARN : microARN

Min : minute

Mnase : Nucléase Micrococcale

MNase : nucléase micrococcale

MR : *Mismatch Repair*

MSOME : *motility sperm organelle morphology examination*

NA-DNA : *nuclear annulus DNA-sequence*

NaCL : chlorure de sodium

Nb : Nombre

NER : *Nucleotide Excision Repair*

nm : nanomètre

NP-40 : *nonyl phenoxypolyethoxyethanol*.

N.S. : Non significatif

O₂ : Oxygène

O₂[°] : anion superoxyde

Oct4 : *octamer-binding transcription factor 4*

OGG1 : *oxoguanine glycosylase 1*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PARP : poly(ADP)ribose polymérase

Pb : Paires de bases

PBS : *phosphate buffered saline*

PCR : *Polymerase chain reaction*

PEG3 : *paternally expressed gene 3*

PGC : *primordials germ cells*

pH : Potentiel hydrogène

PI : *Protease inhibitor*

piARN: *piwi-interacting RNA*

PLAGL1 : *Pleiomorphic Adenoma Gene-Like 1*

PMA : Procréation Médicalement Assistée

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

Pol : Polymérase

PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*

PRC : *Polycomb repressive complex*

PRDX : Peroxirédoxine

PRM : protamine

QSP : quantité suffisante pour (*Quantum Satis*)

R : reverse

Rasgrf1 : *Ras Protein Specific Guanine Nucleotide Releasing Factor 1*

RNF8 : *Ring finger protein 8*

Rpm : rotation par minute

RT : *reverse transcription*

S/MAR : *scaffold/matrix attachment region*

SCSA : *sperm chromatins structure assay*

SDS : *sodium dodecil sulfate*

SEM : Somme des écarts à la moyenne

SINE : *Short interspersed nuclear element*

Sl : slot-blot

snARN : *small nuclear RNA*

SNGPx4 : *sperm nuclear glutathione peroxidase 4*

SnoARN : *small nucleolar RNA*

SNP : *single nucleotide polymorphism*

Snrpn : *small nuclear riboprotein*

SOD : superoxide dismutase

Sox2 : *Sry-box 2*

SPAG4 : *Sperm associated antigen 4*

Spata17 : *Spermatogenesis associated 17*

Spef2 : *Sperm flagellar 2*

Sry : *Sex-determining region on the Y Chromosome*

SWI/SNF : *Switching and sucrose non-fermenting*

T : Thymine

TA : Température ambiante

Ta : *annealing temperature* (température d'hybridation)

TBS : *Tris buffered saline*

TDG : *thymidine DNA glycosylase*

TE : Tris-EDTA

TERF : *telomeric repeat-binding factor*

TET : *Ten-eleven translocation*

TH2B : *testis-histone H2B*

TIP60 : *Tat Interactive Protein 60*

TNP : protéine de transition

TopoII β : Topoisomérase-II β

Trim28 : *Tripartite Motif Containing 28*

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TUNEL : *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

TXN : Thiorédoxine

TXNL : Thioredoxine-like

UV : Ultraviolet

Vs : *versus*

Wnt5a : *Wingless-Type MMTV Integration Site Family*

WT : *Wild-type*

XRCC1 : *X-ray repair cross-complex protein 1*

Zfp57 : *Zing finger protein 57*

μm : micromètre

Sommaire

Introduction Bibliographique	1
I. Généralités sur la chromatine	2
A. L'acide désoxyribonucléique	2
B. Le nucléosome : l'unité de base de la chromatine	2
C. Les différents niveaux de repliement de la chromatine	3
II. La structure particulière de la chromatine spermatique	5
A. La spermatogenèse	5
a. L'incorporation de variants d'histones	6
1. Les variants de l'histone H1	6
2. Les variants des histones H2A et H2B	7
3. Variants de l'histone H3	8
b. La spermiogenèse : remodelage de la chromatine	10
1. Les modifications post-traductionnelles des histones	11
• La phosphorylation	11
• L'acétylation	12
• L'ubiquitinylation	13
• La crotonylation	14
• La méthylation	14
• Les cassures ADN au cours de la spermiogenèse	15
2. Les protéines de transition (TNP)	15
3. Les protamines (PRM)	16
4. L'organisation de la chromatine du spermatozoïde	18
• L'organisation en nucléo-protamines	18
• Les histones persistantes	19
B. Les altérations de l'organisation de la chromatine spermatique et infertilité masculine.21	21
a. L'infertilité	21
b. Les défauts de remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse et infertilité	23
C. La maturation épидидymaire.....	26
a. Les fonctions de l'épididyme	26
1. Le transport et le stockage des spermatozoïdes	27
• Le transport	27
• Le stockage	28
2. La maturation membranaire	28
• La composition lipidique	28
• La composition protéique	29
3. La maturation nucléaire	30
4. La protection des spermatozoïdes	31
b. Les EOR et leurs effets sur le spermatozoïde	32
1. L'oxydation des protéines	33
2. La peroxydation lipidique	33
3. L'oxydation des acides nucléiques	34
4. Le processus de réparation des dommages à l'ADN	34
5. L'équilibre oxydant	35
6. L'étude du stress oxydant sur l'intégrité du spermatozoïde	36
7. Le stress oxydant et l'infertilité masculine	38
III. L'épigénome du spermatozoïde	39
A. La méthylation de l'ADN	39
a. Généralités	39
b. La méthylation de l'ADN spermatique	41
c. L'infertilité et la méthylation de l'ADN	42
B. Les acides ribonucléiques (ARNs)	43
a. Généralités	43

1.	Les ARN de ménage	43
2.	Les ARN régulateurs : différentes classes d'ARN non codants	44
b.	Les ARN des spermatozoïdes.....	45
c.	L'infertilité masculine et les ARN spermatiques.....	46
C.	L'épigénome paternel post-fécondation	47
a.	La méthylation de l'ADN spermatique.	47
1.	La déméthylation du génome.....	47
2.	Le maintien de la méthylation.....	49
b.	Le rôle des histones paternelles	50
1.	L'histone H1	51
2.	Les variants H2A	51
3.	Les variants H3	52
c.	Le rôle des ARN spermatiques.....	52
d.	L'épigénome et effets transgénérationnels.....	53
IV.	Les conséquences post-fécondation des dommages oxydants sur le noyau spermatique.....	55
	<i>Projet de Recherche</i>	58
	<i>Matériels et Méthodes</i>	61
	<i>Résultats</i>	71
I.	L'organisation chromatinienne spermatique murine.	72
	Title: Does oxidative DNA damage affect the topology of the mouse sperm nuclear organization?	75
II.	L'appréciation des séquences liées aux histones persistantes attachées à la matrice nucléaire.	76
III.	Impact du stress oxydant sur l'intégrité de l'épigénome spermatique.....	80
IV.	Une supplémentation orale antioxydante peut-elle corriger le stress oxydant épididymaire ?.....	88
	<i>Title: A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models.</i>	88
	<i>Discussion Perspectives</i>	97
I.	L'impact du stress oxydant sur l'organisation chromatinienne spermatique.....	99
II.	L'identification des séquences liées aux histones persistantes attachées à la matrice nucléaire.	104
III.	L'épigénome spermatique en situation de stress oxydant épididymaire.....	105
IV.	La correction du stress oxydant par un supplémentation en antioxydants.....	110
	<i>Annexes</i>	116
	<i>Références Bibliographiques.....</i>	117

Introduction
Bibliographique

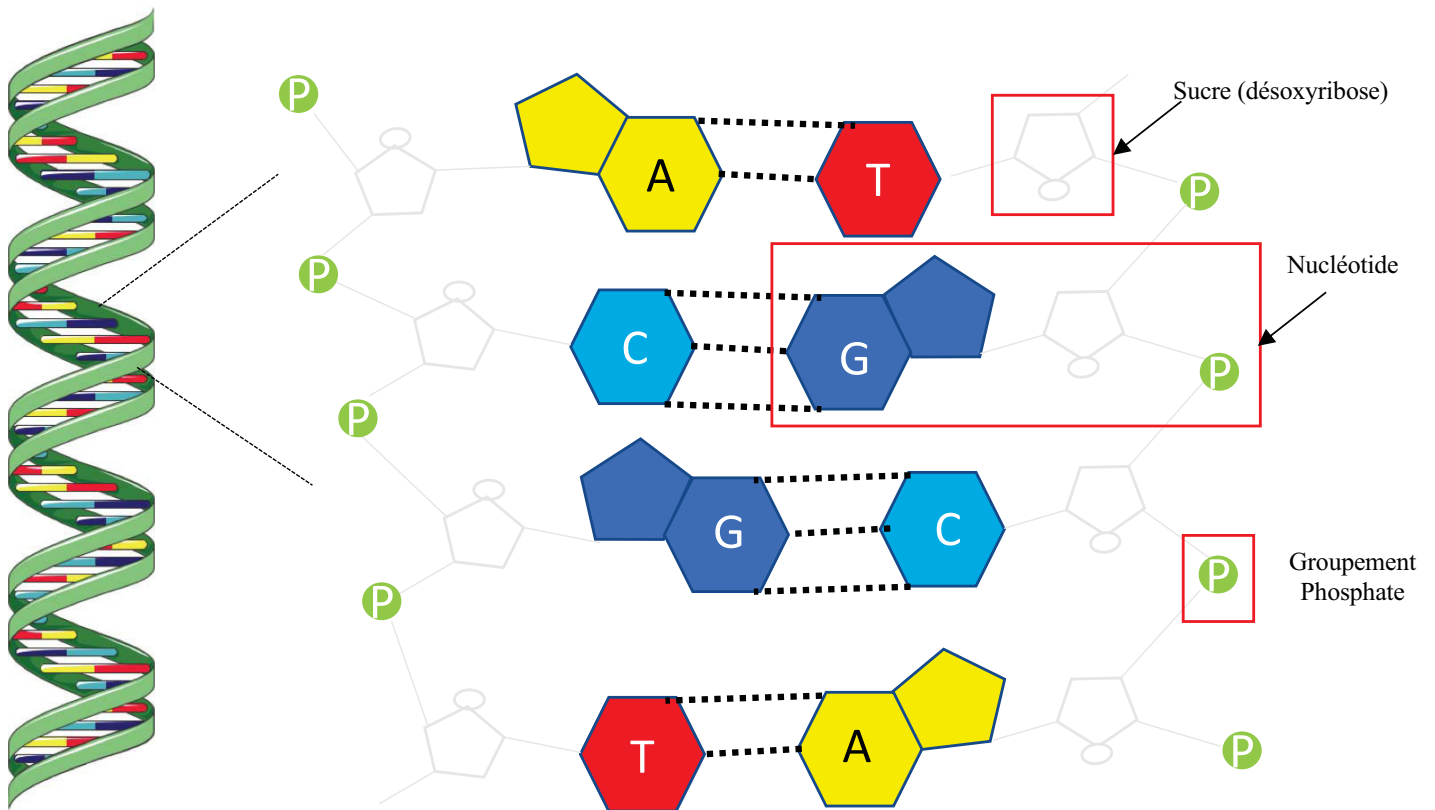


Figure 1 : La double hélice d'ADN.

L'ADN est une longue double hélice composée d'un enchaînement de bases azotées appariées entre elles, la cytosine (C, bleu clair) avec la guanine (G, bleu foncé), l'adénine (A, jaune) avec la thymine (T, rouge). Une base azotée est liée par son sucre à un groupement phosphate relié lui-même au sucre suivant de l'autre base.

(Modifiée d'après *Watson and Crick*, 1953).

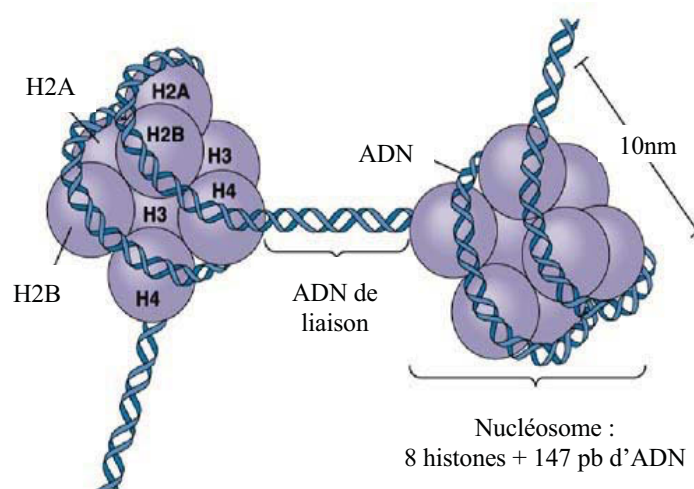


Figure 2 : Assemblage d'un nucléosome.

L'assemblage de deux homodimères de H2A-H2B à un tétramère d'histones H3-H4 forme un nucléosome où s'enroule environ 147 pb d'ADN. Les queues amino- et carboxy-terminales sortent de chaque octamère. L'ADN entre deux nucléosomes est appelé ADN de liaison (*linker DNA*), où vient se positionner l'histone H1.

(Modifiée d'après Pearson Education, 2012).

I. Généralités sur la chromatine

A. L'acide désoxyribonucléique

Toute cellule eucaryote possède un noyau qui contient l'information génétique de l'individu, l'ADN pour acide désoxyribonucléique. C'est une longue molécule linéaire d'environ deux mètres. Elle est composée de quatre bases azotées classées en deux groupes selon leur configuration chimique, les purines contenant la guanine (G) et l'adénine (A) et les pyrimidines avec la cytosine (C) et la thymine (T). Chacune des bases est liée à un sucre, le désoxyribose formant ainsi un nucléoside relié par un groupement phosphate pour donner des nucléotides. L'ADN étant une molécule à double hélice, chaque base s'associe à sa base complémentaire sur l'autre brin, la guanine s'apparie avec la cytosine et la thymine avec l'adénine (figure 1 ; Watson and Crick, 1953).

L'ADN est une molécule chargée négativement étant donné sa richesse en groupements phosphates. De manière générale, nous retrouvons liées à l'ADN, des protéines riches en résidus chargés positivement. Parmi elles, les histones qui sont riches en résidus arginines et lysines (25% des résidus totaux), possèdent une charge globale positive. L'association des histones avec l'ADN neutralise une grande partie des charges négatives et permet ainsi son repliement sur lui-même et donc sa compaction. Seuls le squelette sucré et les phosphates de l'ADN interagissent directement avec les histones. Cet ensemble nucléoprotéique est appelé un nucléosome (figure 2), l'unité de base de la chromatine. L'ADN est associé majoritairement aux histones, mais il est lié également à des protéines telles que les facteurs de transcription.

B. Le nucléosome : l'unité de base de la chromatine

Les histones dites canoniques, H2A, H2B, H3 et H4, ont un poids moléculaire allant de 11 à 14 kDa (Luger et al., 1997). Ce sont des protéines conservées entre les espèces. Elles sont composées d'un domaine de type globulaire et d'une queue sans structure définie dans leur partie amino-terminale. Cette dernière est le site de modifications post-traductionnelles qui vont induire des changements dans le comportement des histones au sein de la chromatine (pour revue voir Tessarz and Kouzarides, 2014). Le domaine globulaire, appelé « *histone fold* », est une succession de trois hélices α séparées par deux boucles (Arents et al., 1991). Ce domaine est le site d'interaction des histones entre elles. Ainsi, les histones H2A et H2B s'associent en hétérodimère, tandis que les histones H3 et H4 forment un hétérotétramère. Puis, deux dimères d'H2A/H2B et un tétramère d'histones H3/H4 s'assemblent pour former l'octamère qui est l'unité fonctionnelle de l'histone (figure 2). Cette particule ressemble à un disque de 11 nm de

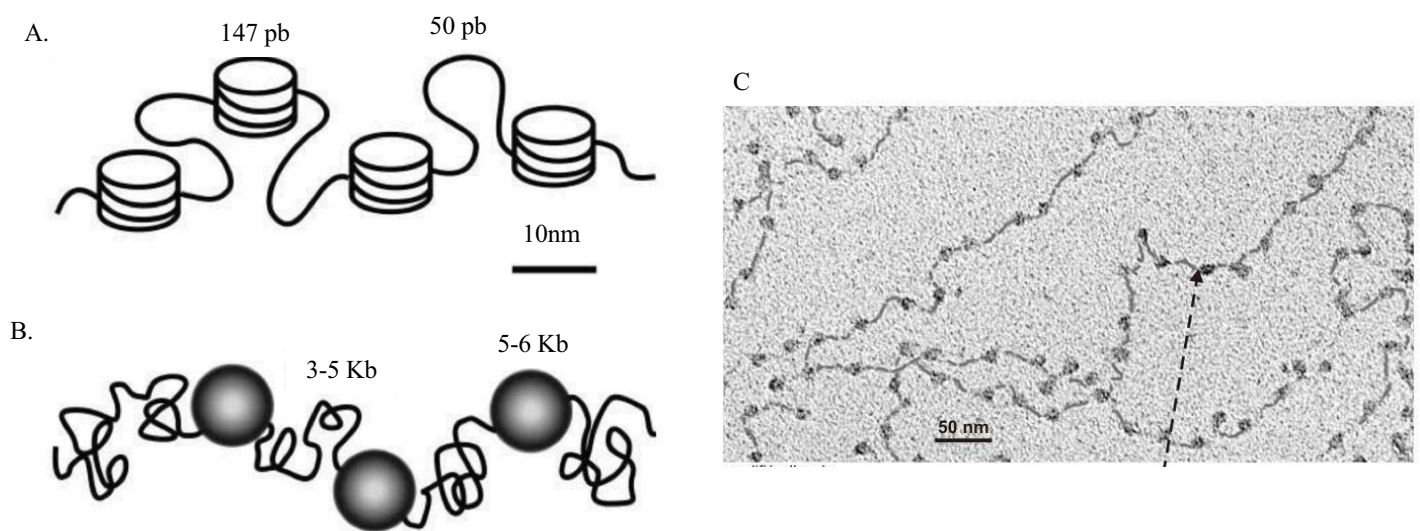


Figure 3 : Représentation de l'enchaînement des nucléosomes dans le noyau.

Représentation schématique de répétitions de nucléosomes dans une fibre de la chromatine (A) et structure dite en « collier de perles » (B). Observation au microscope électronique à transmission de la structure en « collier de perles » dans un noyau (C).

(Modifiée d'après Woodcock *et al.*, 2006).

diamètre et de 5,6 nm de hauteur, autour duquel s'enroule l'ADN, sans qu'il y ait de contact entre les bases de l'ADN et les histones (Luger et al., 1997). En effet, les histones interagissent uniquement avec le squelette sucré et les phosphates de l'ADN.

L'assemblage de l'ADN autour des octamères d'histones entraîne la formation d'une fibre de 11 nm de diamètre que l'on appelle « **collier de perles** » observable au microscope électronique (figure 3 ; Kornberg, 1974). Ce premier niveau d'organisation assure un raccourcissement de l'ADN à $1/6^{\text{ème}}$ de sa taille. Lorsque la chromatine est digérée avec une endonucléase telle que la nucléase micrococcalle (MNase), des fragments d'ADN dont la taille est un multiple de 200 paires de bases (pb) sont générés. Cette taille minimale correspond à environ 2 tours d'ADN autour d'une particule de cœur. L'étude par cristallographie aux rayons X des nucléosomes a montré que l'ADN fait environ 1,7 tours de l'octamère d'histones, soit 147 pb (pour revue voir Corless and Gilbert, 2016). Entre deux nucléosomes, l'ADN dit « de liaison » mesure environ 50 pb bien que cette longueur soit très variable (Öberg et al., 2012). L'ADN de liaison est lié à une cinquième histone (histone H1), différente des autres, qui induit des variations dans la structure de la fibre de 11 nm. Cette histone H1 de 23 kDa, possède des extrémités carboxy- et amino-terminales positivement chargées entourant un domaine « *winged helix* » de type globulaire. Sa présence n'est pas constante dans tout le génome, par exemple elle est présente de façon plus importante dans les régions péri-centromériques, ce qui contribue à l'hétérogénéité structurale de la chromatine (Dorigo et al., 2004). En l'absence de l'histone H1, les nucléosomes s'organisent en enfilade tandis qu'en présence de l'histone H1, ils sont en zigzag. Les régions riches en histone H1 sont globalement plus fortement compactées (Woodcock et al., 2006).

C. Les différents niveaux de repliement de la chromatine

Il existe une organisation de la chromatine en fibres de tailles plus grandes que celle de 11 nm de diamètre, la fibre de 30 nm observée en interphase et la fibre de 300 nm qui est le repliement de la fibre de 30 nm. Pour la fibre de 30 nm de diamètre, nous ne connaissons que peu de choses sur elle et elle reste très controversée. Selon certains auteurs, elle pourrait ne pas exister *in vivo* et serait un artefact de manipulation (Eltsov et al., 2008 ; Fussner et al., 2011 ; Maeshima et al., 2010). Néanmoins, elle est décrite comme un repliement sur elle-même de la fibre de 11 nm par l'interaction des portions amino-terminales des histones de cœur qui sortent de l'octamère, induisant un raccourcissement de la fibre de 6 fois.

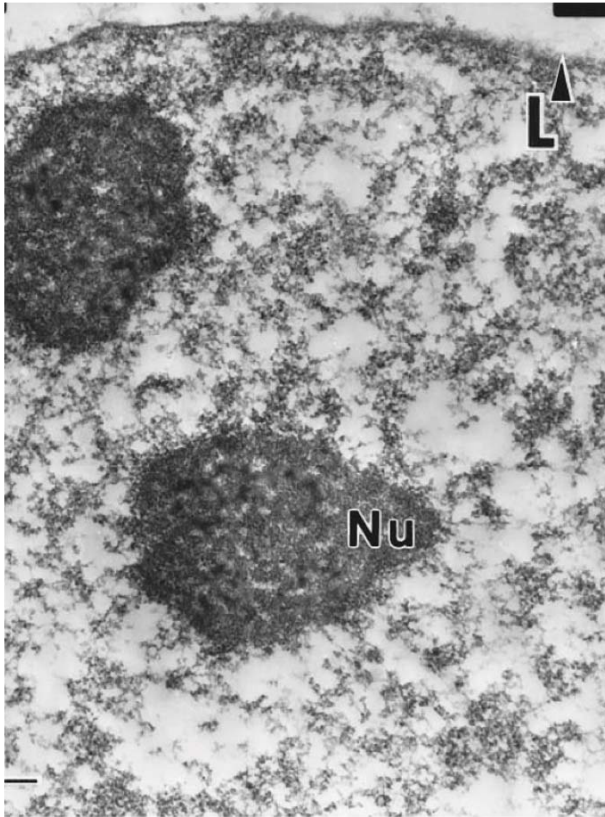


Figure 4 : La matrice nucléaire somatique.

La matrice nucléaire est composée de la lamina (L) et d'un réseau de protéines et d'ARN sous forme de fibres d'environ 10 nm de diamètre. Elle est ici observée par microscopie électronique dans des cellules somatiques.

Nu : nucléole. Echelle (barre noire) : 1 μm (D'après Nickerson *et al.*, 1997).

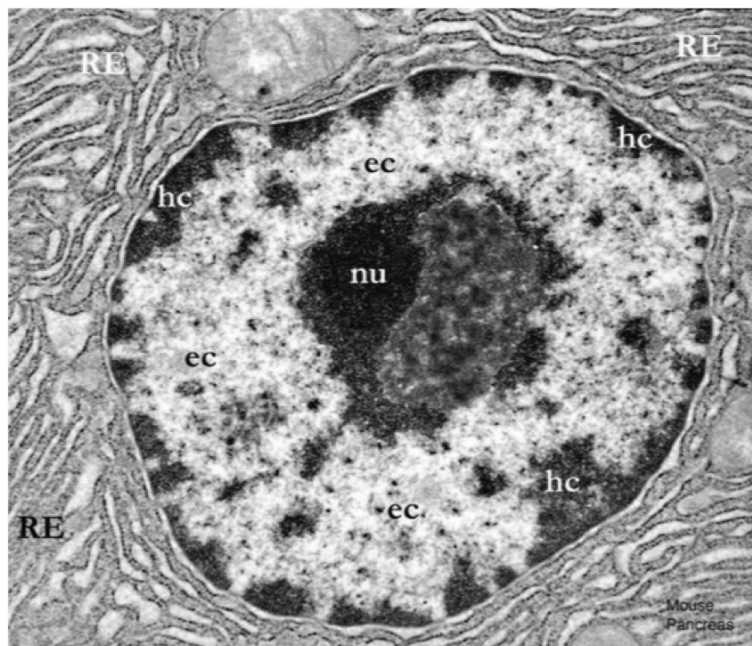


Figure 5 : Noyau d'une cellule somatique.

Observée au microscope électronique à transmission, la chromatine du noyau d'une cellule somatique présente des zones de densité différente. **L'hétérochromatine** (hc) qui apparaît plus dense correspond à la chromatine compactée, située plutôt en périphérie du noyau. **L'euchromatine** (ec) qui est moins compactée et apparaît donc plus claire. Elle correspond aux régions transcriptionnellement actives et est située au centre du noyau. Nu : nucléole, RE : Réticulum endoplasmique.

(D'après *Microscopy & Imaging Facility, Hamilton College, Clinton, NY, Etats-Unis*)

La fibre de 30nm de diamètre pourrait adopter différentes organisations. Une conformation en solénoïde avec 5 à 6 nucléosomes par tour (McGhee et al., 1983) où les nucléosomes sont disposés de façon linéaire. Ou une conformation dite « *two-start cross linker* » où les nucléosomes sont empilés non pas avec le nucléosome le plus proche mais avec le suivant en formant ainsi un zig-zag, sur deux rangs parallèles (Dorigo et al., 2004).

La fibre de 300 nm serait formée par le repliement de la fibre de 30 nm en larges boucles de 50 à 200 kilobases (kb) dont la base serait fixée à une matrice protéique ou matrice nucléaire. Sa structure tridimensionnelle exacte n'est pas connue car elle est peu accessible avec les moyens techniques actuels. A l'intérieur du noyau, la matrice nucléaire, liée à l'enveloppe nucléaire est un ensemble ribonucléoprotéique (lamine B, facteurs de transcription, topoisomérases II, ARN ...) formant un réseau fibreux (figure 4). La matrice nucléaire est impliquée dans la réplication, la régulation de la transcription et la maturation des ARN (Blencowe et al., 1994 ; Chattopadhyay and Pavithra, 2007 ; Gluch et al., 2008). La fixation de la chromatine sur la matrice nucléaire se fait par l'intermédiaire de séquences d'ADN spécifiques, d'environ 200 pb, appelées « *scaffold* ou *matrix attachment regions* » (S/MAR ; Chattopadhyay and Pavithra, 2007).

L'organisation des fibres de chromatine avec la matrice nucléaire permet la mise en place de zones de densité variable (figure 5) observées en microscopie électronique à transmission (MET) dans un noyau en interphase d'une cellule somatique. D'une part, des régions claires en MET qui correspondent à des régions d'ADN peu condensé. Elles sont situées généralement vers le centre du noyau et appelées **l'euchromatine**. Cette faible compaction permet une meilleure accessibilité des complexes protéiques à l'ADN. Ces régions génomiques sont caractérisées par une hyperacétylation des histones (*cf.* § II.A.b.1 acétylation) et une faible méthylation de l'ADN (*cf.* § III. A. méthylation de l'ADN) et sont donc généralement transcriptionnellement actives.

D'autre part, des régions qui apparaissent très sombres à proximité de la membrane nucléaire. Elles correspondent à des régions très condensées ou **hétérochromatine**. La transcription des gènes y est réprimée à cause de l'inaccessibilité de l'ADN, liée à une hypoacétylation et à une hyperméthylation des histones et à la méthylation de l'ADN. L'hétérochromatine est elle-même subdivisée en deux parties qui se distinguent notamment par leur différence de méthylation sur l'histone canonique H3 (pour revue voir Trojer and Reinberg, 2007) :

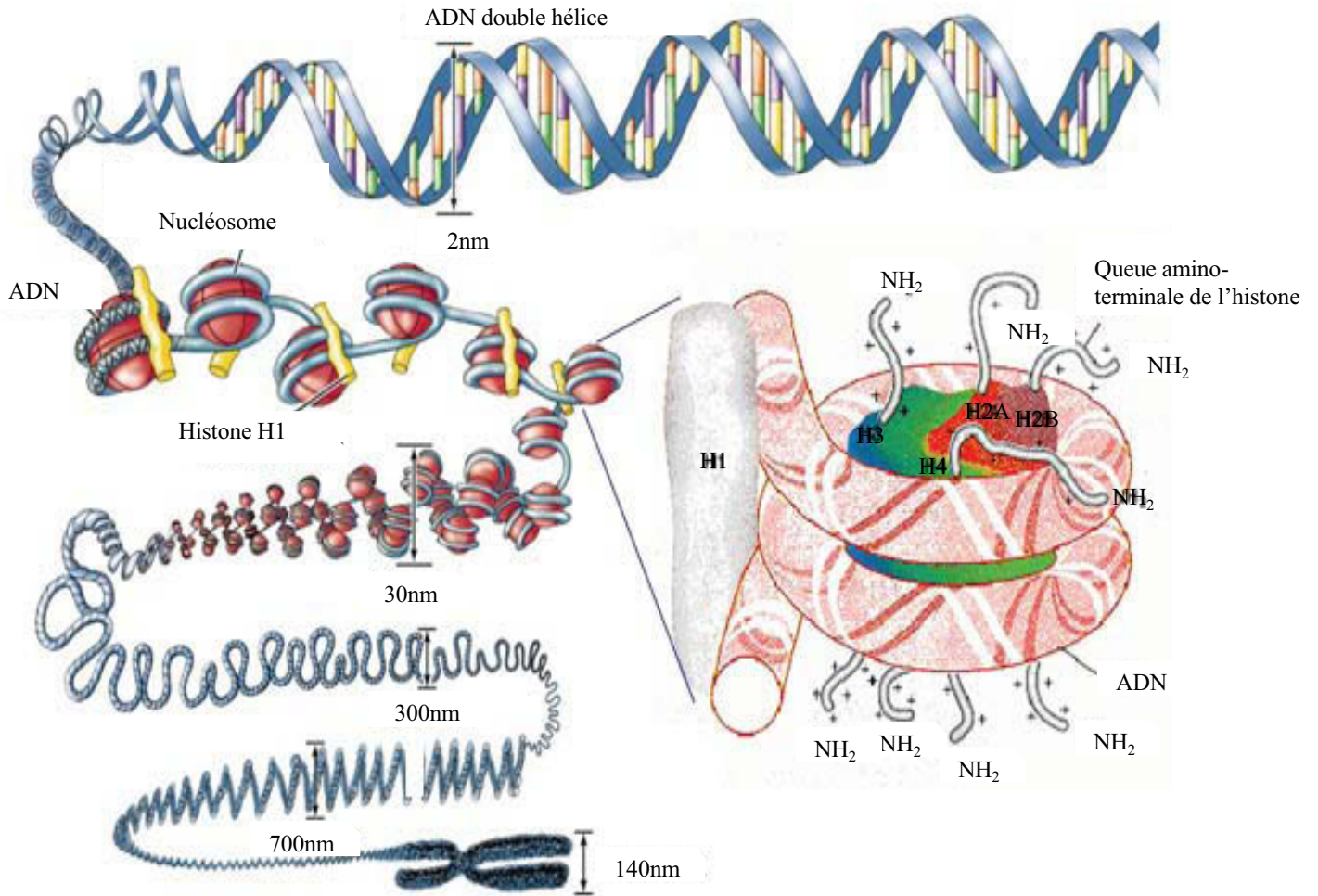


Figure 6 : De la double hélice d'ADN au chromosome.

Ce schéma représente les différents niveaux d'organisation de la chromatine permettant sa compaction, de la fibre de 11 nm au chromosome métaphasique de la mitose. (Modifiée d'après Pray, 2008).

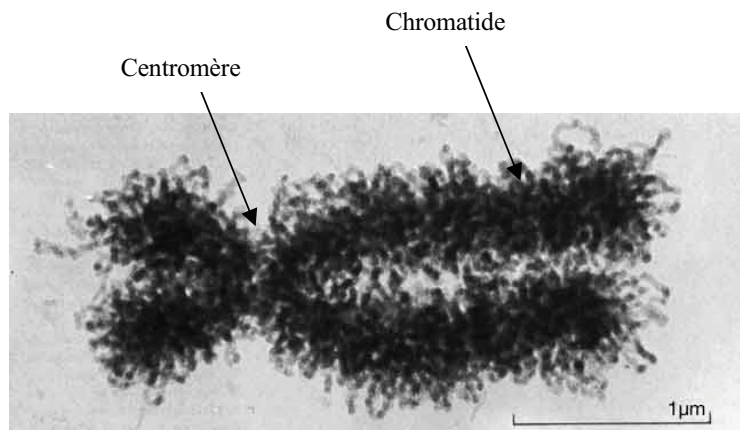


Figure 7 : Représentation en microscopie électronique à transmission d'un chromosome métaphasique.

Un chromosome métaphasique observé au microscope électronique à transmission. On observe une chromatine extrêmement compactée ($\times 10\ 000$ par rapport à l'ADN linéaire) avec les deux chromatides sœurs reliés au centre par le centromère. Epaisseur $\times 1400$ nm. (Modifiée d'après Sadava *et al.*, 2008).

- L'hétérochromatine facultative qui est dite dynamique car elle varie selon le stade de différenciation et le type cellulaire.
- L'hétérochromatine constitutive qui est permanente et identique dans tous les types cellulaires. Cette dernière permet de maintenir la stabilité du génome en gardant inactifs par exemple les éléments transposables.

Le dernier niveau d'organisation de la chromatine est celui des chromosomes mis en place lors de la métaphase (processus de mitose ou méiose) où nous pouvons observer ces derniers plus facilement car les fibres de 300 nm s'enroulent sur elles-mêmes et l'ADN linéaire est compacté environ 10 000 fois, formant une structure dont l'épaisseur est de l'ordre de 1 400 nm (figures 6 et 7).

II. La structure particulière de la chromatine spermatique

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée qui est produite dans la gonade mâle, ou testicule (figure 8), par le processus de spermatogenèse.

Le testicule adulte est une glande paire et symétrique de l'appareil reproducteur mâle, possédant deux activités : une activité exocrine, la production des spermatozoïdes, et une activité endocrine qui est la synthèse d'hormones, en particulier les androgènes. Il est suspendu par les cordons spermatiques, à l'extérieur de la cavité abdominale, dans une poche cutanée protectrice appelée scrotum. Cette localisation anatomique permet de maintenir les testicules à une température légèrement inférieure à celle du corps, condition indispensable pour le développement de spermatozoïdes viables (Zorgniotti and Sealfon, 1988).

A. La spermatogenèse

La spermatogenèse (figure 9) est divisée en plusieurs étapes permettant de passer d'une cellule souche diploïde, la spermatogonie, à une cellule haploïde, la spermatide, grâce au processus de la méiose. Dans une dernière étape, la spermiogenèse, nous assistons à une cyto-différenciation profonde de la spermatide (cellule haploïde ronde) pour donner un spermatozoïde « fusiforme », caractérisé par une absence quasi totale de cytoplasme, une chromatine hautement compactée et un appareil locomoteur, le flagelle. Cette cyto-différenciation ultime confère aux spermatozoïdes la capacité de se mouvoir par l'intermédiaire du flagelle afin d'atteindre l'ovocyte dans le tractus génital femelle. Par ailleurs, l'extrême

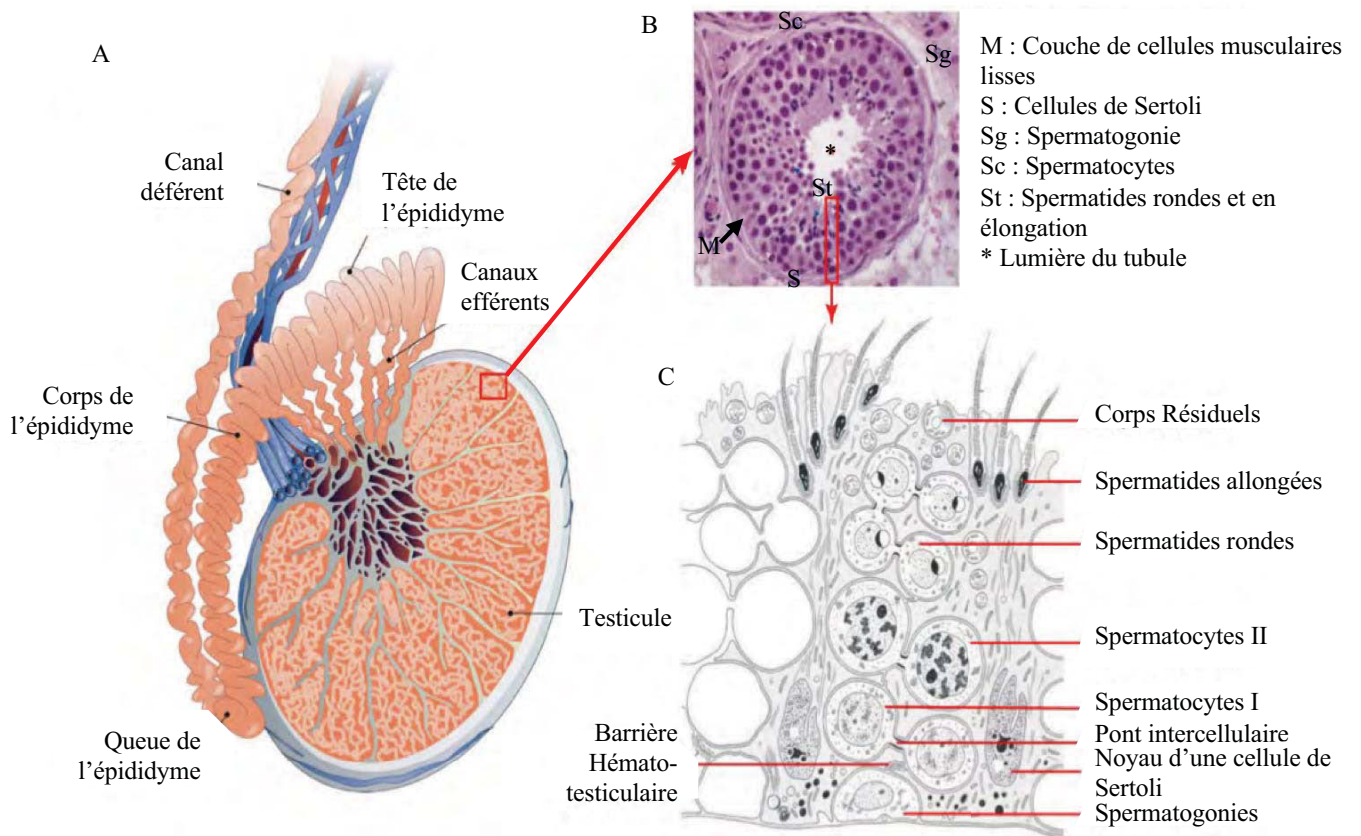


Figure 8 : Le testicule et les tubules séminifères, lieux de la spermatogenèse.

A. Schéma d'un testicule relié au canal déférent par l'intermédiaire de l'épididyme (modifiée d'après Belleannée *et al.*, 2012). Le testicule est composé de plusieurs lobules ou tubes séminifères séparés par l'espace interstitiel.

B. Coupe histologique transversale de testicule humain montrant un tubule séminifère composé des cellules de Sertoli et de la lignée germinale (modifiée d'après Clermont *et al.*, 2009).

C. Schéma de la paroi d'un tubule séminifère présentant deux cellules de Sertoli en contact avec des cellules germinales aux principaux stades de différenciation de la spermatogenèse, (modifiée d'après Holstein, 1994). Les cellules de Sertoli sont liées entre-elles par des jonctions serrées qui vont former la barrière hémato-testiculaire et délimiter deux compartiments — basal et *ad luminal*. Elles éliminent également au fur et à mesure les cellules germinales apoptotiques et les corps résiduels, ce sont des vésicules membranaires contenant les organites et le cytosol excédentaires des spermatides, produits lors de la spermatogenèse et qui pourraient se révéler nuisibles pour la production des gamètes.

compaction du noyau spermatique a également pour but de protéger le génome paternel qui doit être délivré dans l'ovocyte lors de la fécondation.

Les futurs gamètes doivent subir les trois grandes étapes qui composent la spermatogenèse : une phase pré-méiotique de prolifération des cellules souches germinales, une phase méiotique de production de cellules haploïdes et une phase post-méiotique de différenciation de celles-ci en spermatozoïdes, la spermiogenèse. Afin d'obtenir, les cellules haploïdes ou spermatides, les cellules germinales (spermatocytes primaires ou de type I) subissent deux méioses. La première est dite réductionnelle car elle réduit de moitié le nombre de chromosomes entre les cellules-filles. La seconde méiose est dite équationnelle car il n'y a eu aucune réplication de l'ADN entre les deux divisions. Ce sont les chromatides sœurs qui vont être séparées entre deux cellules-filles possédant le même nombre de chromosomes (figure 10).

Avant de subir la spermiogenèse, le noyau des cellules germinales, des spermatogonies aux spermatocytes de type II, possèdent une chromatine qui est identique à celle d'une cellule somatique, c'est-à-dire que l'ADN est enroulé autour d'histones. Au cours de la spermatogenèse, certaines histones canoniques vont être remplacées par des variants dont certains sont spécifiques de la lignée germinale, induisant des variations dans la structuration de la chromatine.

a. L'incorporation de variants d'histones

De façon générale, l'incorporation de variants d'histones et/ou les modifications post-traductionnelles sur les régions amino-terminales des histones induisent des variations dans la conformation de la chromatine et jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique en fonction du type cellulaire et du stade de développement (pour revue voir Talbert and Henikoff, 2017). Parmi les variants d'histones contenus dans les cellules germinales, nous retrouvons :

1. *Les variants de l'histone H1*

Le variant H1t, qui est le variant de l'histone H1 spécifique du testicule, est détecté uniquement à partir du stade pachytène dans les spermatocytes de type I (Drabent et al., 2003) et permet de maintenir un haut niveau d'expression jusqu'au stade spermatide allongée. Des études *in vitro* ont montré que H1t lie de façon moins covalente les nucléosomes que l'histone

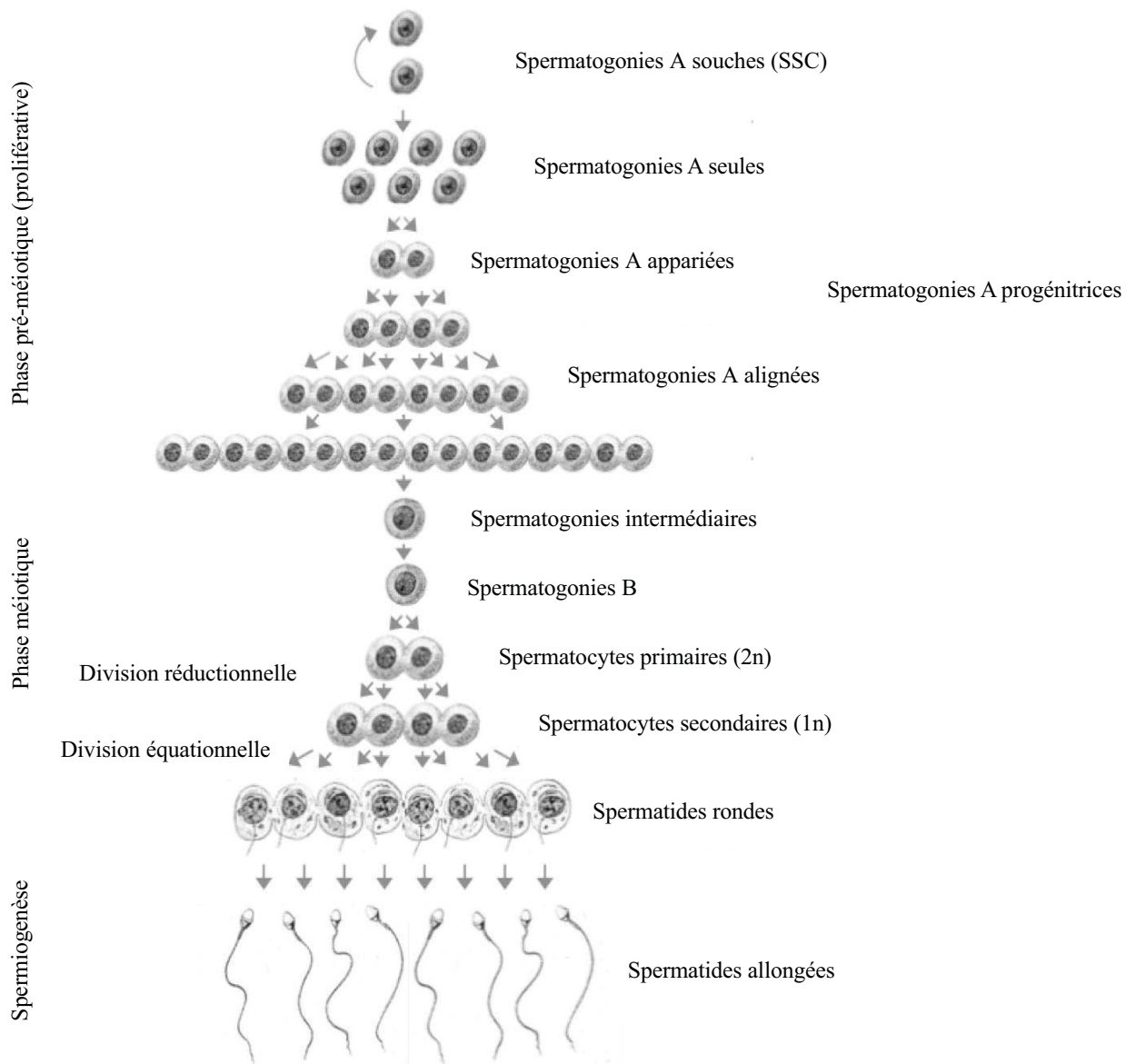


Figure 9 : Représentation schématique de la spermatogenèse.

La spermatogenèse se déroule schématiquement en trois phases : proliférative, méiotique et spermio-genèse. Chacune d'elles est associée à des types cellulaires particuliers de la lignée germinale. Les spermatogonies A souches (SSC) renouvellent la population de cellules germinales indifférenciées. Les spermatogonies A progénitrices s'amplifient par mitoses successives (As, Aap, AaI) puis engagent leur différenciation en spermatogonies de type intermédiaire et spermatogonies B. Les spermatogonies subissent ensuite une première division méiotique et deviennent des spermatocytes primaires (2n) puis secondaires (1n). Enfin, les spermatocytes évoluent en spermatides ronds puis allongés. Ces dernières donneront naissance aux spermatozoïdes testiculaires. SSC : *spermatogonial stem cells*, As : spermatogonie A single, Aap spermatogonies A appariées, AaI : spermatogonies A alignées. (modifiée d'après Physiologie Humaine Sherwood, 2006 De Boeck).

H1 et permet ainsi de maintenir une chromatine dans une configuration dite ouverte, requise pour la recombinaison méiotique, le remplacement des histones et la transcription.

Le variant H1t2 (ou H1 *histone family, member N, testis-specific* (H1fnt)) quant à lui est exclusivement exprimé dans les spermatides. Contrairement à l'histone H1t, l'inactivation constitutive de *H1t2* conduit à une infertilité avec des spermatozoïdes de la queue d'épididyme morphologiquement anormaux. Des défauts d'élongation et de condensation de l'ADN des spermatides (Martianov et al., 2005 ; Tanaka et al., 2005) ont été rapportés, suggérant un rôle critique de H1t2 dans le remplacement des histones par les protamines. De plus, dans les spermatides rondes, H1t2 colocalise et interagit avec le complexe *polycomb* PRC2 dont fait partie l'histone méthyltransférase EZH2 (*histone-lysine N-methyltransferase enzyme, Enhancer of zeste 2*) suggérant un rôle de H1t2 dans le remodelage de la chromatine dans les spermatides allongées (Lambrot et al., 2012). En effet, EZH2, au sein du complexe PRC2, intervient dans la mise en place de modifications post-traductionnelles sur les queues amino-terminales des histones et notamment la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), induisant une compaction de la chromatine (Cao et al., 2002).

HILS1 (*spermatid-specific linker histone H1-like protein*) est uniquement exprimée dans les spermatides entre les stades 9 et 15 (*cf.* § II.A.b. la spermiogenèse) qui est la fenêtre de temps cruciale où les spermatides subissent la transition histones/protamines (Yan et al., 2003).

Comme pour l'histone H1, il existe des variants des histones canoniques (H2A, H2B, H3).

2. Les variants des histones H2A et H2B

Concernant H2A, le variant γ H2A.X est impliqué dans les cassures doubles brins et H2A.Z qui est souvent enrichi dans les sites d'initiation de la transcription de gènes actifs (TSS, *Transcription start sites*), mais ces variants sont aussi présents dans les cellules somatiques (pour revue voir Turinetto and Giachino, 2015). H2A.Z est similaire à seulement 60% de l'histone H2A et ce variant est moins stable dans le dimère H2A/H2B (Jin and Felsenfeld, 2007 ; Placek et al., 2005). L'inactivation de *H2A.Z* est létale chez la souris (Faast et al., 2001). Dans les cellules testiculaires, H2A.Z est détecté dans les cellules germinales jusqu'à la spermiogenèse et disparaît en partie au moment de la réorganisation de la chromatine (Greaves et al., 2006).

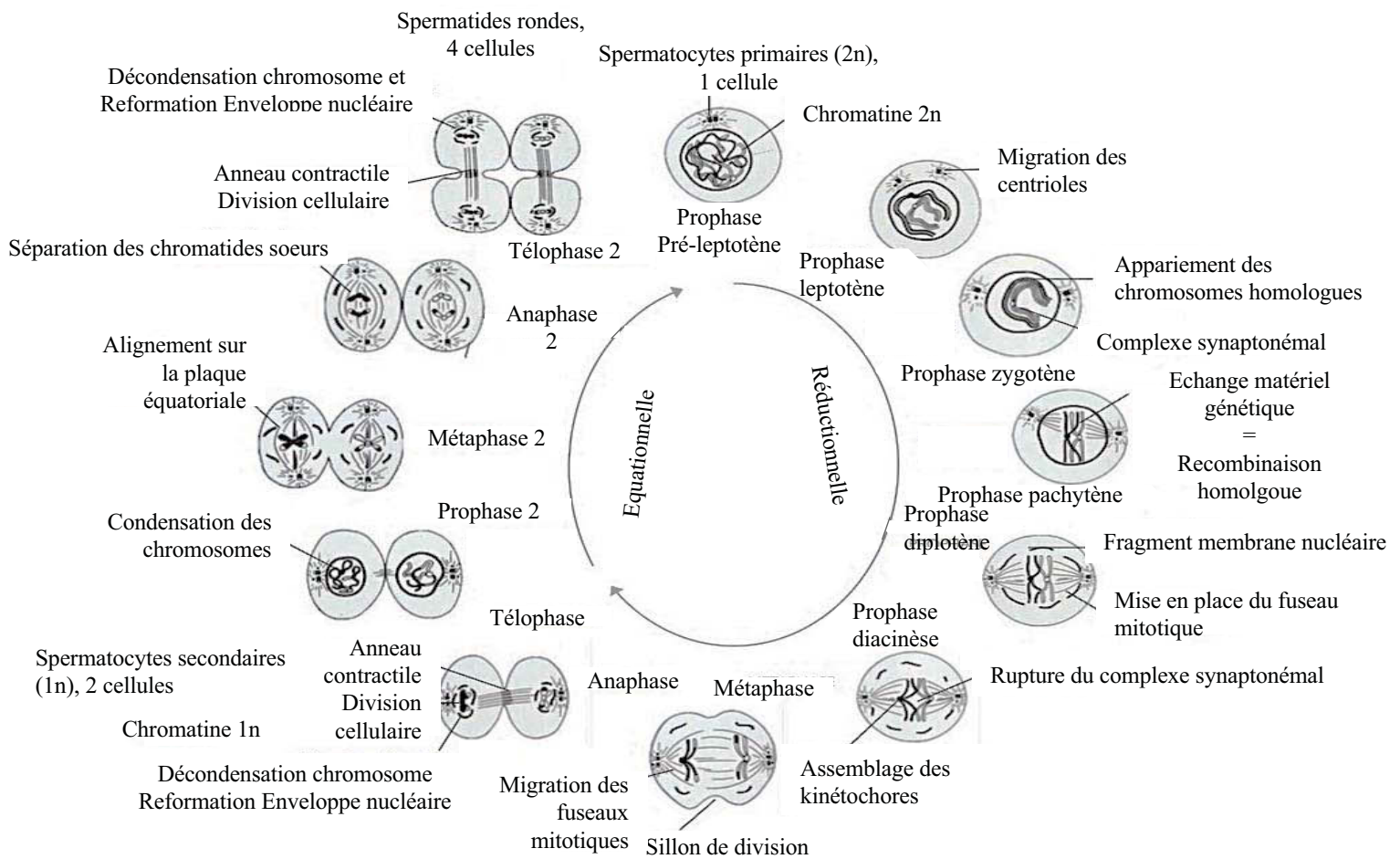


Figure 10 : La méiose.

La méiose est une série de deux divisions mitotiques successives. Elle permet à partir d'un spermatocyte primaire I (diploïde, $2n$) de donner naissance à quatre cellules haploïdes ($1n$), les spermatides. La prophase de la première division de méiose est une étape longue comprenant 5 étapes : leptotène, zygotène, pachytène (recombinaison homologue), diplotène et diacinèse. Au terme de la première division, dite réductionnelle, la séparation des chromosomes paternels et maternels appariés conduit à la formation d'un spermatocyte de type II. Chaque chromosome est alors composé de deux chromatides. La deuxième division est dite équationnelle et aboutit à la répartition de chacune des chromatides dans les deux cellules filles appelées spermatides. (modifiée d'après Physiologie Humaine Sherwood, 2006 De Boeck).

Un autre variant, macroH2A est caractérisé par la présence d'un large domaine carboxy-terminal (30 kDa) connecté à l'*histone fold* (Chakravarthy et al., 2005). Le variant macroH2A est associé à l'hétérochromatine qui est transcriptionnellement inactive. De plus, ce variant interagit avec des histones déacétylases, signe d'une conformation fermée de la chromatine (Chakravarthy et al., 2005). Ce variant intervient dans l'inactivation des chromosomes sexuels et est localisé dans le *XY-body* à partir du stade pachytène pendant la spermatogenèse (Hoyer-Fender et al., 2000). Néanmoins, l'inactivation du variant *MacroH2A* n'est pas létale malgré des défauts dans la croissance pré- et post-natale et une déficience dans la reproduction mâle (Pehrson et al., 2014).

Le variant de l'histone H2A spécifique du testicule, TH2A, est incorporé dès le stade spermatogonie (Trostle-Weige et al., 1982). H2ALap1 est un autre variant de l'histone H2A qui est retrouvé entre le stade pachytène et le stade spermatide ronde. H2ALap1 est localisé sur les TSS et sélectivement enrichi sur les gènes du chromosome X qui sont actifs seulement dans les spermatides rondes (Nekrasov et al., 2013 ; Soboleva et al., 2012).

D'autres variants de l'histone H2A, H2AL1 et 2, se positionnent sur les régions péri-centromériques dans les spermatides condensées (Govin et al., 2007) chez la souris mais ne sont pas retrouvés chez l'homme. Le variant H2AL2 est synthétisé en même temps que les protéines de transition et sa fonction primaire est de permettre aux protéines de transition d'être incorporées dans la chromatine (Barral et al., 2017).

Pour l'histone H2B, nous ne trouvons qu'un seul variant qui est spécifique du testicule TH2B, découvert en 1975 (Shires et al., 1975). Ce variant s'accumule dans les spermatocytes du stade leptotène. Il permet de maintenir un haut niveau d'expression dans les cellules. Pendant que le niveau d'expression de TH2B augmente, nous observons une chute de l'expression de l'histone canonique H2B (Rao and Rao, 1987).

Il est intéressant de noter que le gène codant pour TH2A et celui codant pour TH2B sont juxtaposés sur le chromosome 17 dans le génome de la souris et partagent un promoteur commun (Huh et al., 1991 ; Trostle-Weige et al., 1982).

3. Variants de l'histone H3

Les histones H3.1 et H3.2 sont dites canoniques car elles ne diffèrent que d'un acide aminé. Il existe deux variants de l'histone H3 au niveau germinale : H3t et H3.3.

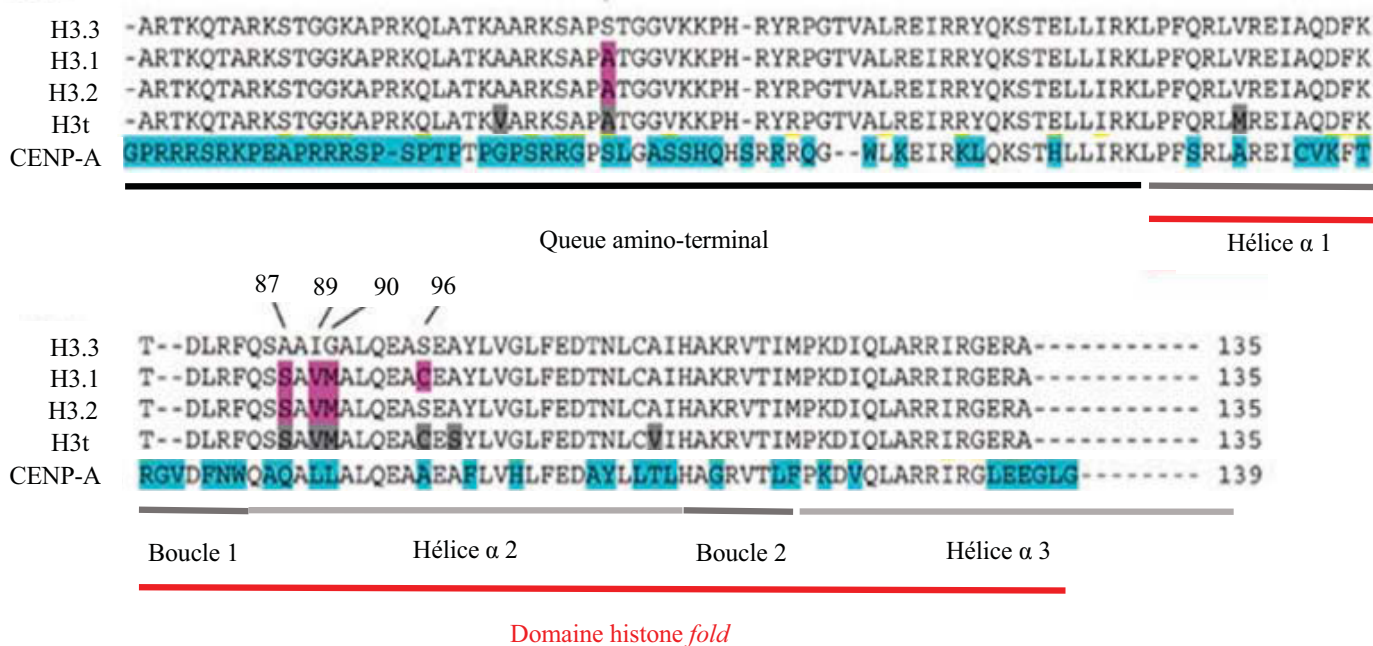


Figure 11 : Séquence en acides aminés de l’histone H3 et ses variants.

Représentation de la séquence en acides aminés de l’histone H3 et de ses variants H3.3, H3t et CENP-A. En violet, les 5 acides aminés qui diffèrent entre l’histone H3.3 et les histones canoniques H3.1 et H3.2, ces dernières ne diffèrent que d’un acide aminé entre elles. (Modifiée d’après Szenker *et al.*, 2011).

L'histone H3.3 ne diffère de H3.1 que par 5 acides aminés et est générée à partir de deux gènes paralogues, *H3F3A* et *H3F3B*, qui produisent la même protéine H3.3 mais avec des régions régulatrices différentes (Szenker et al., 2011).

Au niveau des cellules germinales, le transcrite *H3F3A* est détecté à de faibles niveaux tandis que celui de *H3F3B* est hautement présent dans les spermatocytes au stade prophase (Bramlage et al., 1997). L'incorporation de l'histone H3.3 donne une configuration plus ouverte à la chromatine et facilite la transcription (Jin and Felsenfeld, 2007). Des analyses d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*), montrent que l'histone H3.3 est liée à des régions transcriptionnellement actives, tandis que H3.1 est typiquement associée avec des régions réprimées (Chen et al., 2013 ; Thakar et al., 2009).

Le variant H3t (également connu sous le nom de H3.4) est spécifique du testicule même s'il est retrouvé à de très faibles niveaux dans les cellules somatiques (Govin et al., 2004 ; Trostle-Weige et al., 1984). Il diffère, comme H3.3, de 5 acides aminés de H3.1, cependant, les nucléosomes qui incorporent H3t sont instables comparés à ceux ayant H3.1 (figure 11). Chez l'homme, il a été trouvé un autre variant de l'histone H3, H3.5, qui est issu d'une duplication du gène *H3F3B* et qui est fortement exprimé dans le testicule (Schenk et al., 2011). H3.5 confère une stabilité moins importante au nucléosome que H3. Il colocalise avec les régions euchromatiniennes et est donc associé avec des régions transcriptionnellement actives (Urahama et al., 2016).

Le variant de l'histone H3 spécifique des régions centromériques, CENP-A pour « *centromere protein A* » est une protéine très conservée de la levure à l'homme (Basrai and Hieter, 1995 ; Kalitsis et al., 1998 ; Palmer et al., 1991). La région carboxy-terminale (les résidus 48 à 135) qui correspond au domaine *histone fold*, est identique à 62% de celle de l'histone H3 (figure 11). Comme son nom l'indique, ce variant est spécifique des régions centromériques et il est impliqué dans le remodelage de la chromatine centromériques durant la formation des centromères (Dunleavy et al., 2009 ; Foltz et al., 2009 ; Mattioli et al., 2015). Un nucléosome à variant CENP-A contient seulement 121 pb d'ADN, contrairement aux nucléosomes canoniques où nous sommes autour de 147 pb (Tachiwana et al., 2011) permettant ainsi une configuration ouverte et facilitant la liaison des protéines du kinétochore pour la migration des chromosomes durant la mitose (Roulland et al., 2016). De plus, il est montré que CENP-A peut être recruté sur les cassures ADN doubles brins pour faciliter sa réparation (Zeitlin et al., 2009).

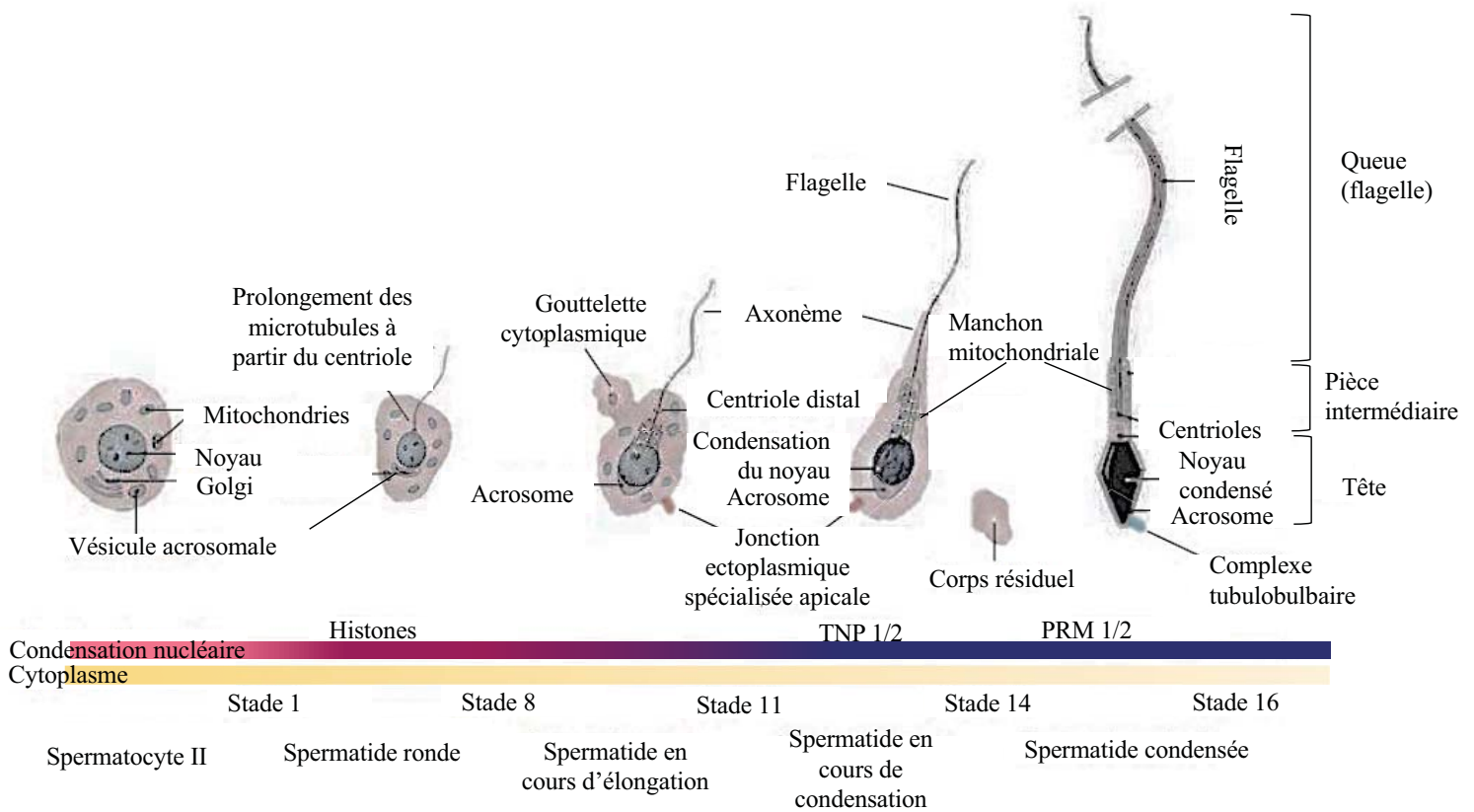


Figure 12 : Modifications structurales lors de la spermiogénèse.

La spermiogénèse est décomposée en 16 stades à l'issue desquelles un spermatocyte II se différencie en un spermatozoïde testiculaire. Cette phase de différenciation est marquée par des changements morphologiques majeurs de la cellule germinale. L'appareil de Golgi fusionne pour donner une vésicule unique, l'acrosome. Le centriole distal s'allonge progressivement pour former l'axonème, squelette du futur flagelle. Les spermatides prennent peu à peu une apparence allongée. Les mitochondries se regroupent autour de la partie proximale de l'axonème dans la pièce intermédiaire du flagelle. La majeure partie du cytoplasme est éliminée sous la forme de corps résiduels. Le noyau se condense sous l'effet du remplacement séquentiel des histones par les protéines de transition (TNP) puis par les protamines (PRM).

(Modifiée d'après Physiologie Humaine Sherwood, 2006 De Boeck).

La délétion de CENP-A entraîne de nombreux défauts dans la mitose et conduit également à des aneuploïdies (cellule possédant un nombre anormal de chromosomes ; Goutte-Gattat et al., 2013 ; Régnier et al., 2005).

Il n'existe à ce jour aucun variant connu pour l'histone H4.

L'incorporation des différents variants est nécessaire lors de la spermatogenèse pour permettre la transcription de nombreux gènes indispensables pour la suite des événements (spermiogenèse), comme ceux codant pour les protéines de transition (TNP) et les protamines (PRM), mais aussi pour faciliter le relâchement de la chromatine afin d'incorporer les TNP puis les PRM lors de la spermiogenèse. Néanmoins, dans certaines espèces telles que les mollusques, la transition entre les histones et les PRM est directe et sans passage par les TNP (Chiva et al., 2011) tandis que chez certains poissons (carpe, truite ...), il n'y a pas de remplacement des histones lors de la spermatogenèse (Kennedy and Davies, 1980).

b. La spermiogenèse : remodelage de la chromatine

La dernière phase de la spermatogenèse, la cyto-différenciation ou spermiogenèse, débute immédiatement après la 2^{ème} division méiotique. Chez la souris, la spermiogenèse est décomposée en 16 étapes marquées par des changements morphologiques majeurs de la cellule germinale (formation de l'acrosome et du flagelle, disparition du cytoplasme et compaction de la chromatine), indispensables à la formation d'un spermatozoïde fonctionnel (Hess and Renato de Franca, 2008). Nous pouvons initialement distinguer les spermatides au noyau arrondi (stades 1 à 8) dont la chromatine homogène permet à ce stade une activité transcriptionnelle réduite consacrée uniquement aux transcrits codant les protéines utiles à la poursuite de la différenciation (essentiellement variants d'histones, protéines de transition TNP1/TNP2 et protamines PRM1/PRM2 ; Hecht, 1990). Par la suite, les spermatides s'allongent progressivement (stades 8 à 11). Les spermatides matures présentent une chromatine dès lors inactive, structurée sous sa forme la plus compacte (stades 11 à 14). La majeure partie du cytoplasme est éliminée et nous assistons au développement du flagelle (stades 14 à 16 ; figure 12).

Au cours de ce processus de spermiogenèse, en plus des changements de forme de la cellule, la chromatine subie des changements importants et devenir plus condensée. De nombreuses histones canoniques ou variants, après la mise en place de modifications post-

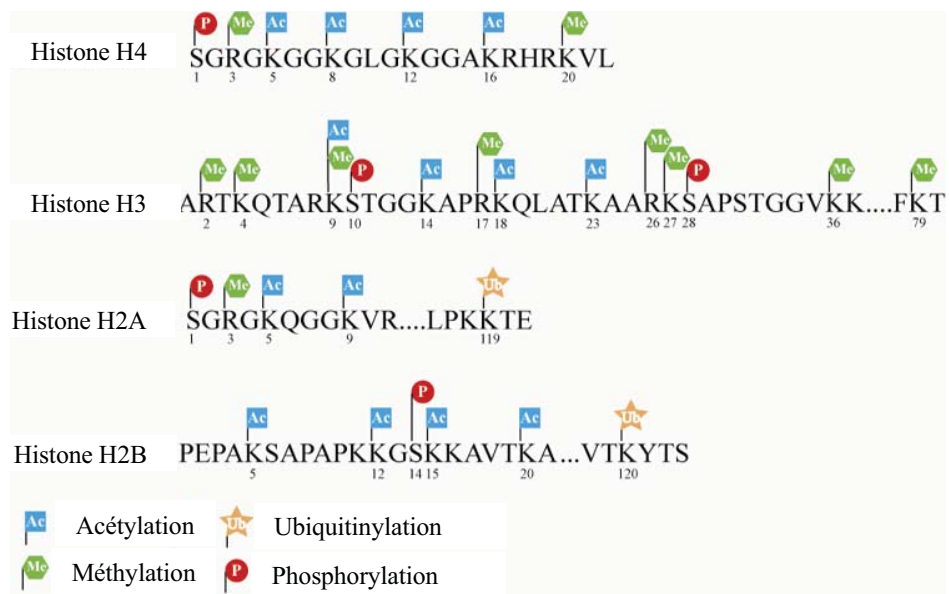


Figure 13 : Liste des modifications post-traductionnelles sur les quatre histones canoniques.

Résumé des sites de modifications post-traductionnelles : phosphorylation (rouge), acétylation (bleu), méthylation (vert) et ubiquitinylation (orange) possibles sur les histones canoniques (H3, H4, H2A et H2B). (Modifiée d'après *Portela and Esteller, 2010*).

traductionnelles telles que l'acétylation sur les régions amino-terminales, sont remplacées par les TNP et par la suite, par des protéines encore plus basiques, les PRM.

Chez les Mammifères, toutes ces modifications successives provoquent une réorganisation complète de la structure de la chromatine spermatique, permettant une condensation plus importante que celle observée dans les cellules somatiques (*cf.* chapitre suivant).

1. Les modifications post-traductionnelles des histones.

Il existe des centaines de modifications post-traductionnelles sur les protéines mais dans cette partie du manuscrit, je n'évoquerai que certaines modifications décrites dans la littérature au niveau des histones dans la lignée germinale : la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation, la crotonylation et la méthylation (figure 13).

La phosphorylation

La phosphorylation des histones exerce un changement sur l'expression de gènes dans les cellules somatiques, soit en agissant comme un site d'accueil pour des protéines régulatrices de l'expression soit en interagissant avec d'autres modifications post-traductionnelles telles que la méthylation ou l'ubiquitinylation.

Au cours du processus de spermiogenèse, il a été montré que les histones affichaient de nombreuses phosphorylations (Govin et al., 2010 ; Song et al., 2011). Parmi elles, la phosphorylation de l'histone H4 sur la sérine 1 (H4S1ph) est une marque très conservée de la drosophile à l'homme. Chez la drosophile, la marque H4S1ph est détectée dans les spermatocytes et est très abondante dans les spermatides en condensation, permettant soit une compaction directe de la chromatine soit le remplacement des histones par les TNP (Krishnamoorthy et al., 2006 ; Wendt and Shilatifard, 2006).

En utilisant des approches de spectrométrie de masse type LC/MS, il a été identifié neuf sérines et une thréonine phosphorylées sur le variant de l'histone H1, H1S, présent dans les spermatides allongées (Mishra et al., 2015). Le même groupe a identifié un résidu sérine phosphorylé sur l'histone TH2B (Pentakota et al., 2014). Récemment, la phosphorylation d'une thréonine sur le variant d'histone TH2A a été mise en évidence au cours de la spermatogenèse (Hada et al., 2017). Cependant, le rôle physiologique de ces phosphorylations reste encore à être élucidé.

L'acétylation

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupement acétyle ($-\text{COCH}_3$) sur les lysines. Au niveau des cellules somatiques, l'acétylation joue un rôle dans l'activation de la transcription en permettant l'ouverture de la chromatine, car l'ajout d'un groupement acétyle entraîne la perte d'une charge négative sur la région amino-terminale de l'histone. Au niveau germinale, l'augmentation de l'acétylation de l'histone H4 est un événement physiologique connu depuis longtemps, qui précède la transition des histones en protamines et qui est conservé de la drosophile à l'homme (Awe and Renkawitz-Pohl, 2010 ; Grimes and Henderson, 1984 ; Meistrich et al., 1992 ; Oliva and Mezquita, 1982 ; Sonnack et al., 2002 ; Zarnescu, 2007).

Dans les spermatides allongées, trois résidus lysines sur la partie amino-terminale de l'histone H4 sont hyperacétylés (H4K5, H4K8 et H4K16) et associés à une dégradation des enzymes responsables de l'hyppoacétylation, les HDAC (pour *Histone deacetylases* ; Caron et al., 2003). Dans les spermatides, lors de la condensation de la chromatine, l'hyperacétylation de l'histone H4 disparaît progressivement dans la partie antérieure, corrélant avec une compaction du génome de la partie antérieure en direction postérieure (Hazzouri et al., 2000).

Deux mécanismes d'action, non exclusifs, ont été proposés pour expliquer l'importance de l'hyperacétylation dans la transition histones/protamines : soit l'hyperacétylation déstabilise l'interaction histones-ADN et permet donc une ouverture de la chromatine facilitant la fixation de facteurs d'échange de protéines, soit l'hyperacétylation permet le recrutement et la fixation de facteurs à bromodomaine, capables de reconnaître les lysines acétylées et ainsi permettre l'action de facteurs de remodelage. Les complexes de remodelage sont des complexes protéiques qui reconnaissent spécifiquement les différentes modifications des histones et de l'ADN, permettant ainsi de nombreux changements au sein de la chromatine (déplacement des nucléosomes, déroulement de l'ADN, remplacement des histones par des variants ou d'autres protéines ; pour revue voir Clapier et al., 2017).

Il existe de nombreuses protéines à bromodomaine dont l'expression est restreinte aux cellules germinales chez l'homme et les rongeurs (Dhar et al., 2012). Parmi les protéines à bromodomaine, BRDT (*bromodomain testis-specific protein*) est exprimée dans les cellules germinales durant les phases pachytène et diplotène des spermatocytes et dans les spermatides (Dhar et al., 2012 ; Shang et al., 2007). BRDT, en liant l'histone H4 hyperacétylée, induit à la fois une condensation de la chromatine et le recrutement d'une protéine appartenant à un

complexe de remodelage SWI/SNF (*Switching and sucrose non-fermenting*) dépendant de l'ATP : Smarcel1 (*SWI/SNF-related matrix associated actin-dependent regulator of chromatin 1* ; Dhar et al., 2012 ; Pivot-Pajot et al., 2003).

Une autre protéine à bromodomaine a été étudiée, BRD4. Elle est exprimée dès le stade spermatogonie (Shang et al., 2004) et durant la spermatogenèse (Bryant et al., 2015). BRD4 induit l'ouverture de la chromatine et la fixation de facteurs de remodelage. Les auteurs montrent que l'association de BRD4 avec l'histone H4 acétylée décroît dans les spermatides allongées, au moment où les histones sont remplacées par les protéines de transition.

Par ailleurs, il a été montré que deux enzymes du complexe histone acétyltransférase NuA4 (EPC1 et TIP60), sont co-exprimées dans les cellules germinales mâles (Shima et al., 2004) et jouent un rôle dans l'hyperacétylation au cours de la spermatogenèse. En effet, l'inactivation de EPC1 ou TIP60 conduit à une hypoacétylation des histones dans les spermatides allongées et un arrêt de la spermiogenèse (Dong et al., 2017). Les auteurs notent également une augmentation de l'expression de gènes au sein des spermatides rondes tels que ceux codant pour les protamines et les protéines de transition ou des protéines chaperonnes HSPAI (Dong et al., 2017).

L'ubiquitinylation

L'ubiquitinylation est un processus catalytique faisant intervenir 3 enzymes. *L'ubiquitin-activating enzyme 1* active le groupement ubiquitine qui est ensuite transféré à *l'ubiquitin-conjugating enzyme 2* (E2). L'enzyme E2 et son substrat sont reconnus par *l'ubiquitin-protein ligase* E3 qui catalyse le transfert du fragment ubiquitine sur la protéine. Dans certains cas, il existe de multiples tours d'ubiquitinylation sur la protéine (Jason et al., 2002 ; Welchman et al., 2005). Généralement, le marquage de la protéine par l'ubiquitine conduit à sa dégradation par le protéasome 26S ou système ubiquitine-protéasome. Il peut aussi intervenir dans diverses voies de signalisation impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et le métabolisme (Weake and Workman, 2008).

Dans les cellules germinales, les histones H2A et H2B sont ubiquitinylées par une protéine appelée RNF8 qui est une *ubiquitin-protein ligase* E3 contenant un domaine RING en carboxy-terminal, conduisant à une relaxation de la chromatine et au recrutement d'une acétyltransférase permettant l'acétylation de l'histone H4 (Lu et al., 2010).

La crotonylation

La crotonylation est la dépot d'un groupement crotonyl ($\text{CH}_3\text{-CH}=\text{CH-CO-}$) sur la lysine des histones localisées sur des gènes actifs dans les spermatides post-méiotiques. Une vague importante d'hypercrotonylation apparaît lors de la formation des spermatides allongées et interviendrait supposément dans le remplacement des histones par les TNP (Montellier et al., 2012 ; Tan et al., 2011).

La méthylation

La méthylation est l'ajout d'un groupement méthyle ($-\text{CH}_3$) sur des résidus arginines et lysines, catalysé par une méthyltransférase (Bedford and Richard, 2005 ; Rivera et al., 2014). La méthylation des histones représente l'une des plus importantes modifications post-traductionnelles qui induit de nombreux changements sur la chromatine somatique durant la prolifération cellulaire, la différenciation... Par exemple, la marque H3K27me3 déposée par EZH2, conduit à une compaction de la chromatine et donc à une inhibition de la transcription. Cette marque est notamment retrouvée dans l'hétérochromatine constitutive. Au niveau de la méthylation des histones, selon les marques déposées, nous pouvons retrouver une conformation dite active (H3K4me3) ou répressive de la chromatine en lien avec l'activation ou l'inhibition de la transcription (Barski et al., 2007 ; Bernstein et al., 2007).

Une étude récente montre que la méthylation de l'histone H3K79 est exclusivement détectée dans les spermatides allongées, précédant le remplacement des histones et corrèle avec l'hyperacétylation de l'histone H4. De plus, cette marque est conservée dans les testicules de la drosophile à l'homme (Dottermusch-Heidel et al., 2014a, 2014b). Des avancées dans la technologie de spectrométrie de masse ont montré qu'une proportion d'histones canoniques (H3, H4, H2A et H2B) est hyperméthylée (résidus lysines et arginines confondus) quand elles sont purifiées de spermatozoïdes humains comme par exemple H3R83me1, H3K117me3 et H2BK121me3 (Brunner et al., 2014).

Les études sur les différentes modifications post-traductionnelles au cours de la spermiogenèse restent encore à être poursuivies pour connaître leur rôle précis dans la transition des histones vers les protamines. Il est bien évident que d'autres acteurs et d'autres modifications post-traductionnelles des histones interviennent dans cette transition. Par exemple, il a été montré récemment qu'une protéine liant l'ADN et possédant un chromodomaine, CHD5 (pour *Chromodomain helicase DNA binding protein 5*), est exprimée

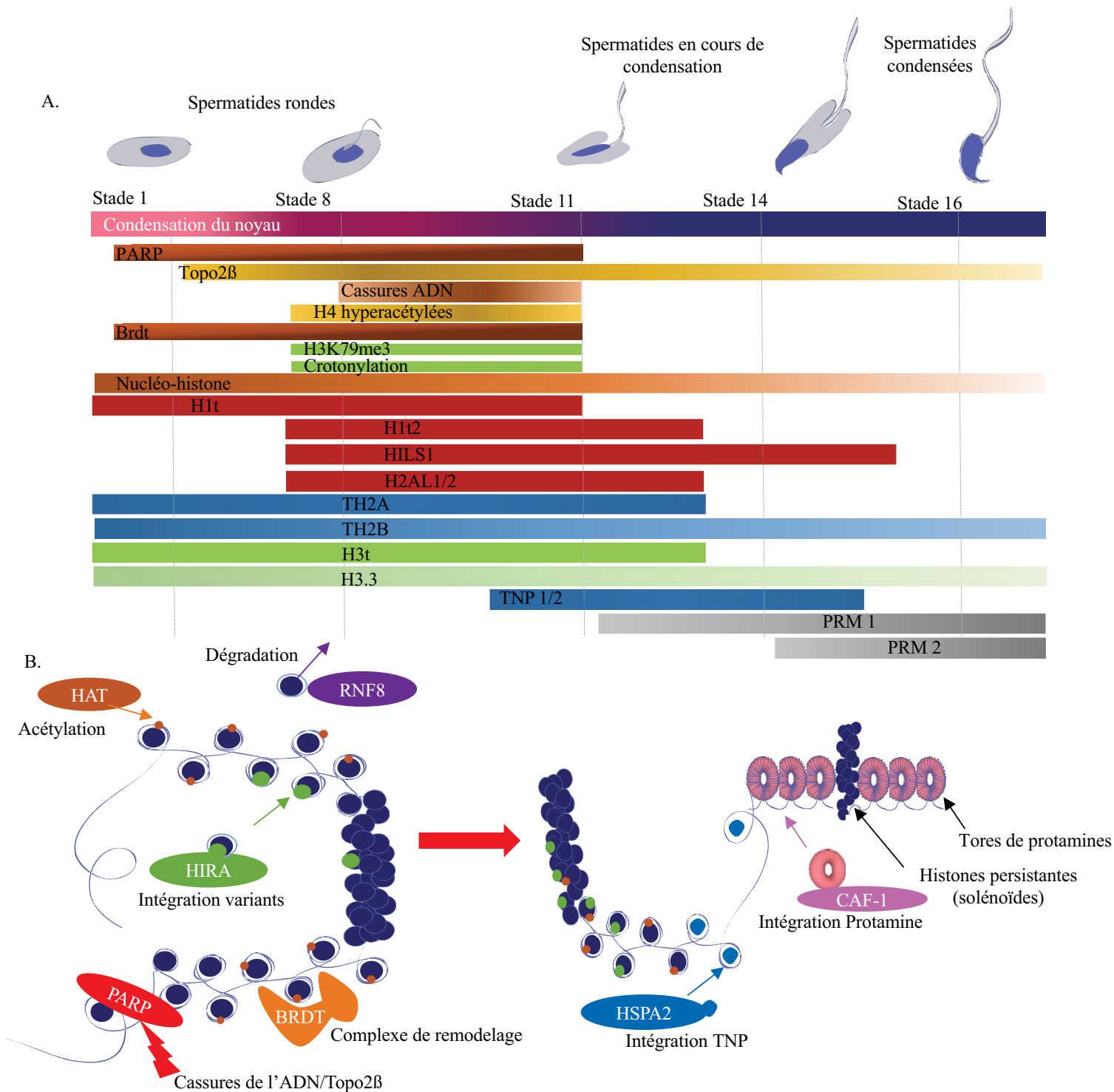


Figure 14 : Résumé des mécanismes de régulation de la transition histone-protamine.

A. Représentation schématique de la cinétique d'intervention des acteurs moléculaires participant à la transition histone-protamine.

B. Les HAT conduisent à l'hyperacétylation des histones H4 et est couplée à l'incorporation de variants d'histones par les chaperonnes HIRA. Les histones hyperacétylées sont reconnues par les protéines BRDT facilitant le recrutement des complexes de remodelage (*Swi/Snf*) nécessaires à la relaxation de la chromatine. L'ubiquitine E3 ligase RNF8 permet quant à elle l'ubiquitinylation et la protéolyse des histones H2A et H2B. L'intégration des TNP est facilitée par l'intervention des chaperonnes d'histones HSPA2. La topoïsomèrese 2 (TopoIIβ) induit des cassures doubles brins d'ADN ce qui contribue à diminuer la tension de la double hélice. Cet événement conduit au recrutement de PARP sur les sites de cassures. Par l'ajout de résidus *Par*, il favorise la déstabilisation des nucléosomes et l'intégration des protamines acheminées à la chromatine par les chaperonnes Caf-1.

(HAT : *Histone acetyltransferase*, PARP : *Poly ADP ribose polymerase*, PAR : *poly ADP ribosyl*, RNF8 : *Ring finger protein 8*, CAF-1 : *chromatine assembly factor*, Topo2b : *Topoisomerase 2b*, PRM : *protamine*, TNP : *protéine de transition*.)

(Modifiée d'après Rathke *et al.*, 2014).

dans les testicules humains durant la spermatogenèse (Li et al., 2014). CHD5 est capable de reconnaître les marques acétylées de l'histone H4 et réalise une fonction similaire à celle de BRDT dans le remplacement des histones (Li et al., 2014).

Les cassures ADN au cours de la spermiogenèse

Durant cette réorganisation de la chromatine spermatique, l'ADN subi des cassures qui sont mises en place par l'activité de la topoisomérase II β (TopoII β). Ces cassures d'ADN sont reconnues par les poly(ADP)ribose polymérasés (ou PARP). PARP1 et 2 coordonnent la décondensation de l'ADN de façon dépendante de TopoII β et facilitent le remplacement des histones (Laberge and Boissonneault, 2005 ; Marcon and Boissonneault, 2004 ; Meyer-Ficca et al., 2009, 2011). Les topoisomérasés sont des protéines appartenant à la matrice nucléaire, qui interviennent notamment dans la réplication, la transcription, la condensation ou la décondensation de la chromatine. Elles sont capables d'induire des cassures de l'ADN, de manière contrôlée (Wang, 2002). En plus de l'intervention de la TopoII β et des PARP, nous observons l'arrivée d'un variant de l'histone H2A spécifique des cassures de l'ADN, γ H2A.X (Redon et al., 2002). En effet, dans les spermatozytes, γ H2A.X est mis en place en réponse aux cassures doubles brins d'ADN (Blanco-Rodríguez, 2009 ; Celeste et al., 2002), afin de permettre leur réparation après le remplacement des histones.

A la suite de ces différents événements de modifications des histones (figure 14), la majorité des histones canoniques ou variants est remplacée par des protéines dites de transition.

2. Les protéines de transition (TNP)

Elles vont remplacer la quasi-totalité des histones (canoniques et variants) chez les Mammifères. Nous dénombrons quatre TNPs mais seules deux font l'objet d'études approfondies, TNPs 1 et 2 (Akama et al., 1994, 1995 ; Unni et al., 1994). Ce sont des petites protéines (entre 50 et 140 résidus) plus riches en résidus arginines et lysines que les histones et donc plus basiques (cependant moins que les protamines).

TNP1 est une protéine de 54 acides aminés (6,2 kDa), composée de 20% de lysines, 20% d'arginines, mais d'aucune cystéine (excepté chez le verrat, le taureau et le bélier) et elle est hautement conservée dans sa séquence entre espèces (figure 15). TNP1 est fortement exprimée et distribuée de façon homogène dans le noyau des spermatides. *In vitro*, TNP1

TNP1 :
MSTSRKCLKTHGMRRGKNRAPHKGVKRGGSKRKYRKSVLKSRKRGDDASRNYRSHL

TNP2 :
MDTKMQLPTTHPHPHSSSRPQSHTSNQCNQCTCSHHCRSCSQAGHAGSSSSPSPGPPMKH
PKPSVHSRHSPARPSHRGSCPKNRKTLEGKVSKRKAVRRRKRTHRAKRRSSGRRYK

Figure 15 : Séquence en acides aminés des protéines de transition 1 et 2.

Représentation de la séquence en acides aminés des protéines de transition murines TNP1 et TNP2.

(Modifiée d’après Lévesque *et al.*, 1998).

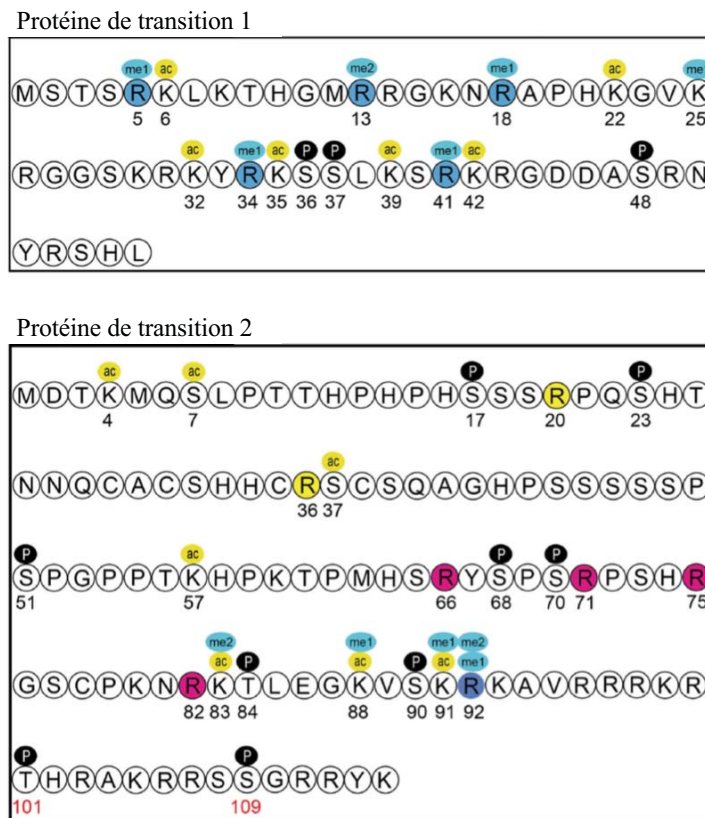


Figure 16 : Modifications post-traductionnelles des protéines de transition.

Les protéines de transition au cours de la spermiogenèse, vont subir des modifications post-traductionnelles : méthylation sur les lysines et arginines (bleu), phosphorylations sur les sérines (noir), acétylations sur les lysines et sérines (jaune).

(Modifiée d’après Bao and Bedford, 2016).

décroît la température de fusion de l'ADN (Singh and Rao, 1987), elle déstabilise l'interaction entre l'ADN et le nucléosome et relâche la chromatine quand elle est ajoutée à un complexe nucléosome-ADN (Singh and Rao, 1988). La protéine TNP1 augmente également l'activité de la topoisomérase I (Akama et al., 1999) et stimule la réparation des cassures simples brins d'ADN (Caron et al., 2001).

TNP2 est deux fois plus grande que TNP1, avec 117 à 138 résidus selon les espèces (\approx 13 kDa), et sa séquence est moins bien conservée. Elle est composée de 10% de lysines, 10% d'arginines, 5% de cystéines, ainsi que de sérines et de prolines (figure 15). Elle comporte deux domaines en doigts de zinc dans sa partie amino-terminale et sa région carboxy-terminale est très basique. Son expression varie beaucoup entre espèces. *In vitro*, TNP2 augmente la température de fusion de l'ADN et son ajout cause une condensation de l'ADN. Tout comme TNP1, elle permet un rapprochement des brins d'ADN et contribue ainsi à sa condensation par oligomérisation de brins d'ADN adjacents (Lévesque et al., 1998).

Récemment, il a été montré que les TNP pouvaient subir, elles aussi, des modifications post-traductionnelles. Les TNP 1 et 2 possèdent de nombreuses sérines, lysines et arginines qui sont phosphorylées, acétylées ou méthylées, notamment au stade de spermatides allongées (Gupta et al., 2015) lors de la période de remplacement des histones par les PRM (figure 16).

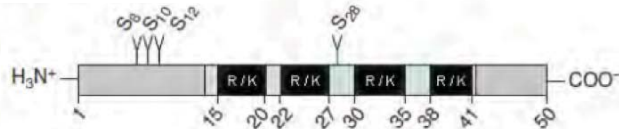
3. *Les protamines (PRM)*

Les protéines de transition sont ensuite à leur tour, remplacées par les protamines. Ces petites protéines (environ 50 résidus) hautement basiques sont produites par des gènes dérivés d'un gène ancestral qui est également à l'origine des gènes des histones (Eirín-López and Ausió, 2009). Au cours du temps, la séquence et la structure des protamines ont divergé entre les espèces (Rooney et al., 2000). Deux types différents de protamines ont été caractérisés chez les Mammifères : PRM 1 et PRM 2.

La protéine PRM 1 est produite sous sa forme mature (50 acides aminés) et est composée d'un domaine central très conservé riche en arginine, qui se lie à l'ADN entouré de courts segments riches en cystéines (figure 17). La queue amino-terminale possède plusieurs résidus sérines qui sont les sites de phosphorylation impliqués dans l'incorporation de PRM 1 dans la chromatine des spermatides (Dadoune, 2003).

PRM 2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur d'environ 100 acides aminés. Les domaines arginines sont espacés à travers la PRM 2 mature et le nombre d'histidines est plus haut que chez PRM 1 (20% et 5%, respectivement ; Yelick et al., 1987). Cette pré-PRM 2 est

A. Protamine 1



B. Protamine 2

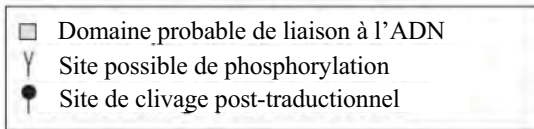
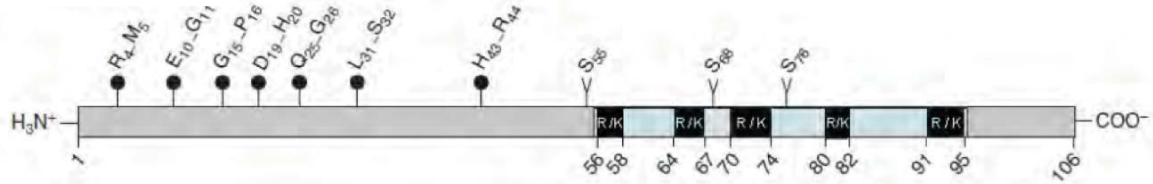


Figure 17 : Modifications structurales lors de la spermiogenèse.

Représentation schématique des domaines des protamines 1 (A) et 2 (B) de souris.

Les sites riches en arginines et lysines (R/K) sont en noir.

(Modifiée d'après Balhorn *et al.*, 2007).

maturée par des clivages successifs, retirant près de 40 % de la partie amino-terminale. Chez l'homme et la souris, la pré-PRM 2 subit six étapes de clivage pour former la PRM 2 mature. Selon les espèces, des proportions variables de certaines formes intermédiaires de PRM 2 peuvent être retrouvées dans les spermatozoïdes épидидymaires (Debarle et al., 1995 ; Yoshii et al., 2005). Par ailleurs, chez l'homme, la souris et le hamster, PRM 2 peut se lier à du zinc par sa partie carboxy-terminale. Il est supposé que le zinc participe à la condensation finale du noyau spermatique, protégeant un nombre important de groupements thiols portés par les cystéines des protamines, de l'oxydation et ainsi limitant la formation de ponts disulfures intra- et inter- protamines (Björndahl and Kvist, 2010). De façon similaire à PRM 1, la forme mature de PRM 2 est phosphorylée afin de permettre sa liaison à l'ADN et déphosphorylée pour accroître la stabilité du complexe ADN-protamines (Dadoune, 2003). Comme pour les TNP, il a été récemment découvert 11 modifications post-traductionnelles sur les protamines murines incluant l'acétylation, la phosphorylation et la méthylation (Brunner et al., 2014). La sérine 55 de la PRM 2 est suggérée, comme chez l'homme (Chirat et al., 1993) pour être phosphorylée par une protéine sérine/thréonine kinase, CAMK4, qui est spécifiquement détectée dans les stades tardifs des spermatides lors de l'incorporation des protamines (Wu et al., 2000). Les modifications post-traductionnelles sur les protamines pourraient être impliquées dans le processus de mise en place des protamines et leur éviction après la fécondation. En effet, la phosphorylation des PRM est nécessaire pour qu'elles soient déposées sur l'ADN pendant la spermatogenèse (Dadoune, 2003).

A la fin de la spermatogenèse, le spermatozoïde possède une chromatine totalement différente de celle de la spermatogonie initiale. Nous n'observons plus les différentes organisations de la chromatine (euchromatine et hétérochromatine) dues à l'extrême compaction du noyau spermatique. En effet, les spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubules séminifères possèdent une chromatine sept fois plus condensée que celle d'une cellule somatique en interphase (Ward and Coffey, 1991). Cette compaction nucléaire extrême, organisée en nucléo-protamines, a pour but de protéger le génome paternel des atteintes extérieures lors du transit dans les voies génitales mâles, jusqu'à l'ovocyte dans les voies génitales femelles.

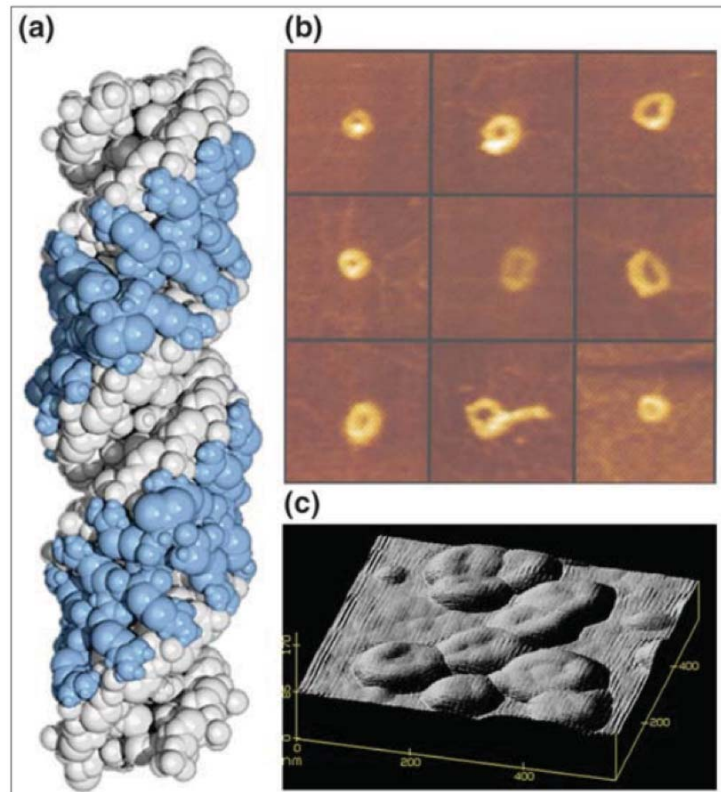


Figure 18 : Observation de l'organisation en tores des protamines au sein du noyau spermatique.

Modèle montrant comment les deux protamines adjacentes (bleues) s'enroule autour de la double hélice de l'ADN (blanc) dans le noyau spermatique de saumon (a)

Image montrant le complexe ADN protamine organisé en tore *in vitro* sur une surface de graphite en ajoutant des protamines à de l'ADN attaché au graphite. Les tores formés *in vitro* sont similaires en taille et en forme à ceux isolés de la chromatine de spermatozoïde humain (b).

Image montrant le tore d'ADN-protamine obtenu de la chromatine de spermatozoïde humain. Ces tores contient approximativement 50 000 pb d'ADN dans chaque structure toroïdale dite en « donut » (c).

(Modifiée d'après Balhorn *et al.*, 2007).

4. L'organisation de la chromatine du spermatozoïde

✦ L'organisation en nucléo-protamines

Par une approche de microscopie électronique à balayage (MEB) sur des extraits de chromatine spermatique native humaine (figure 18), il a été observé une organisation particulière de la chromatine spermatique (Balhorn, 2007). En effet, la mise en place des PRM sur l'ADN confère à la chromatine une structure différente, étant donné leur petite taille et leur forte charge positive qui neutralise la charge négative du squelette d'ADN. Ainsi, l'ADN qui est lié aux PRM a une structure dite en tores (ou toroïdes) qui ressemble à un anneau sous forme d'un « donut » (Allen et al., 1997 ; Hud et al., 1993). Chaque tore contiendrait environ 50 à 100 kb d'ADN (Brewer et al., 2003 ; Hud et al., 1995).

Les PRM des Mammifères possèdent plusieurs cystéines, conduisant à l'établissement de ponts disulfures intra- et inter-protamines, conférant ainsi une compaction et une stabilité plus grandes à la chromatine. Néanmoins, certains modèles d'organisation proposés pour décrire la liaison des PRM et de l'ADN spermatique suggèrent que si les PRM 1 sont liées entre elles par des ponts disulfures pour assembler deux brins d'ADN, les PRM 2 seraient, elles, liées par des ponts salins de type « doigts de zinc » (Björndahl and Kvist, 2010). Cette structure de l'ADN spermatique existe dans un état semi-cristallin et elle est résistante à la digestion par des nucléases, contrairement à l'ADN lié aux histones (Sotolongo et al., 2003, 2005).

D'après le modèle proposé par Ward en 2010, la chromatine spermatique des rongeurs serait organisée à l'intérieur du noyau en tores de 50 kb, attachés à leur base à la matrice nucléaire dont fait partie *l'annulus* nucléaire, par des MAR (figure 19 ; *Matrix Attachment Region*). En effet, l'équipe de Ward a pu isoler une structure protéique interne au noyau spermatique, dans de nombreuses espèces dont l'homme et la souris, à laquelle est fixée la chromatine par des séquences spécifiques encore peu étudiées. Cette structure située à la base du noyau spermatique, au niveau du site de fixation du flagelle, a été nommée **annulus nucléaire** à cause de sa forme en anneau courbé (à ne pas confondre avec *l'annulus* du flagelle, figure 20), et les séquences d'ADN qui y sont liées sont des « **nuclear annulus-DNA sequences** » (*NA-DNA* ; Ward and Coffey, 1989). Des études de ces MAR ont démontré qu'elles étaient spécifiques des cellules spermatiques (Nadel et al., 1995 ; Ward, 2010). Les MAR spermatiques réguleraient la transcription des gènes dans les spermatides lors de la spermiogenèse, et permettraient la formation du *pronucleus* mâle (nom du noyau gamétique haploïde juste après la fécondation et la réplication de l'ADN du zygote après la fécondation (Linnemann et al., 2009). En effet, l'injection intracytoplasmique, dans un ovocyte, d'ADN

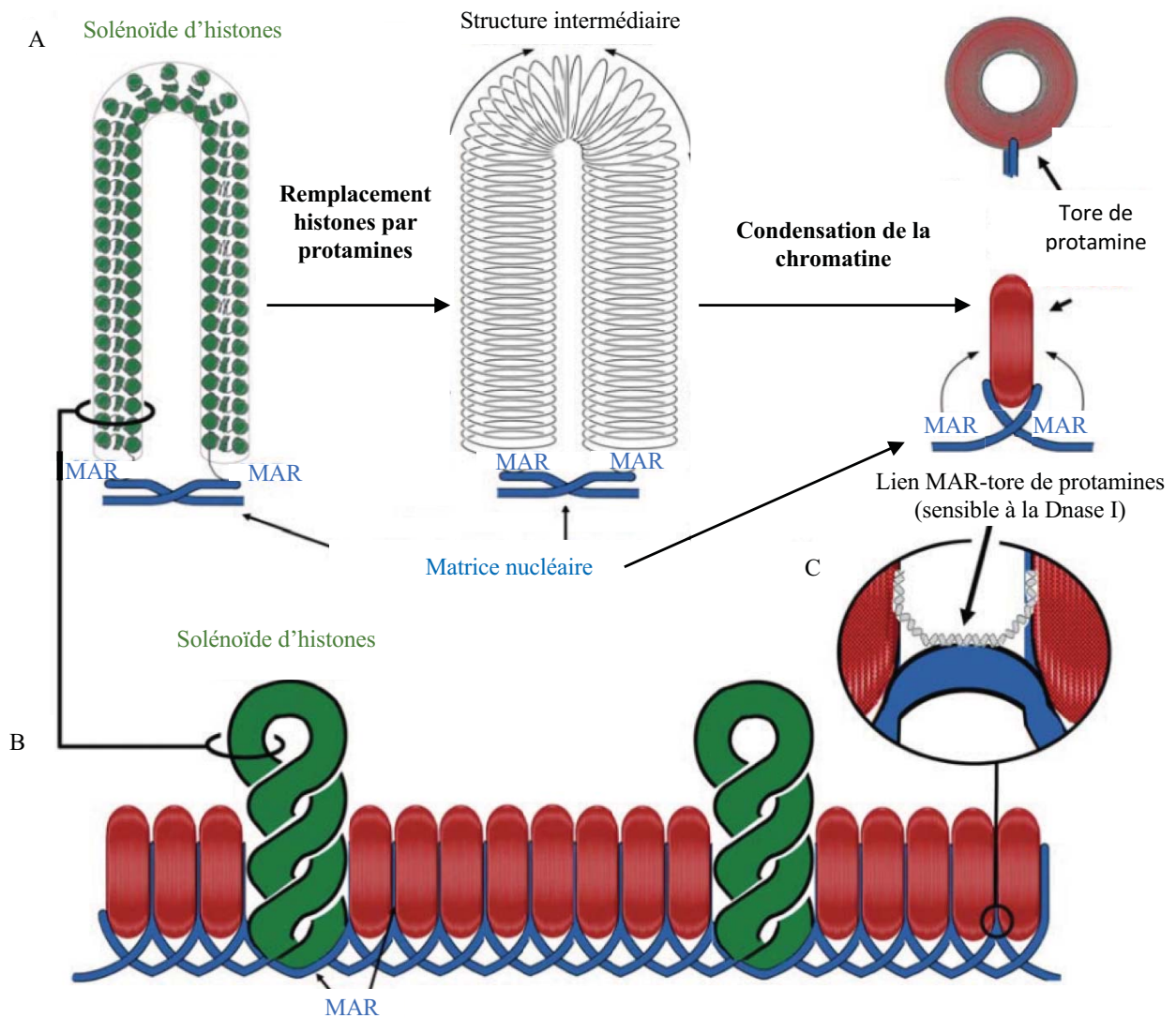


Figure 19 : Les trois éléments structuraux majeurs de la chromatine spermatique.

- A. Durant la spermiogénèse, les histones sont remplacées par les protamines, condensant l'ADN dans des toroïdes étroitement compactés. Chaque tore de protamines est un domaine en boucle.
- B. Les tores de protamines peuvent être organisés par un empilement côte à côte. Les histones persistantes sont retrouvés dans des solénoïdes (vert).
- C. Les brins d'ADN qui lient les tores de protamines sont sensibles aux nucléases et sont donc liés à des histones persistantes et attachés à la matrice nucléaire (bleu) par des MAR (*Matrix attachment region*).

(Modifiée d'après Ward *et al.*, 2010).

spermatique nu seul ou co-injecté avec une matrice nucléaire spermatique isolée, ne permet ni la formation du *pronucleus* mâle ni sa réplication. A l'inverse, l'injection de matrice nucléaire spermatique uniquement associée aux courts fragments d'ADN à la base des tores (donc des fragments d'ADN associés aux MAR spermatiques) autorise la formation du *pronucleus* mâle et sa réplication, malgré une dégradation de l'ADN spermatique allant de 20% à 50 % (figure 21 ; Shaman et al., 2007a, 2007b).

✦ Les histones persistantes

Une information importante acquise ces dernières années est que dans le noyau spermatique, tout l'ADN n'est pas associé à des protamines. En effet, il persiste des assemblages nucléosomiaux (donc contenant des histones canoniques et des variants d'histones) dans le noyau spermatique avec un pourcentage variable selon les espèces. Chez la souris, nous comptons environ 1% d'ADN associé aux histones, ainsi que chez le taureau, le cheval et le hamster (Balhorn et al., 1977 ; Bench et al., 1996 ; Tovich and Oko, 2003), tandis que chez l'homme nous sommes plutôt autour de 5 à 10% (Erkek et al., 2013 ; Gatewood et al., 1990 ; Hammoud et al., 2009).

A partir de ce constat de la persistance des histones dans le noyau spermatique, des équipes dont la nôtre, se sont posé la question de savoir si les histones persistantes étaient positionnées au hasard dans le génome ou bien positionnées dans des régions spécifiques. En utilisant des approches d'analyse globale du génome de type ChIP (immunoprécipitation de chromatine) et de séquençage à haut débit, immunolocalisation), il a été déterminé que les histones persistantes dans le noyau spermatique ne sont pas distribuées au hasard et ne sont donc pas le résultat d'un défaut de leur remplacement par les protamines (Arpanahi et al., 2009 ; Hammoud et al., 2009, 2011). Selon Ward (Ward, 2010), les histones persistantes se retrouvent dans deux structures :

- Entre deux tores, attachées à la matrice, car ce sont des régions qui sont sensibles à des nucléases (DnaseI ; Noblanc et al., 2013 ; Sotolongo et al., 2003).
- Dans des solénoïdes, structures retrouvées également dans les cellules somatiques, en forme d'hélice, à intervalles plus ou moins réguliers (figure 19).

Chez la souris, nous avons montré que les histones persistantes comme H3 et TH2B, étaient localisées à la périphérie et en partie basale du noyau spermatique (figure 22 ; Noblanc et al., 2013). En utilisant une approche similaire à l'équipe de Ward sur la décondensation du noyau spermatique, nous avons pu montrer qu'une partie des histones persistantes (H3) était

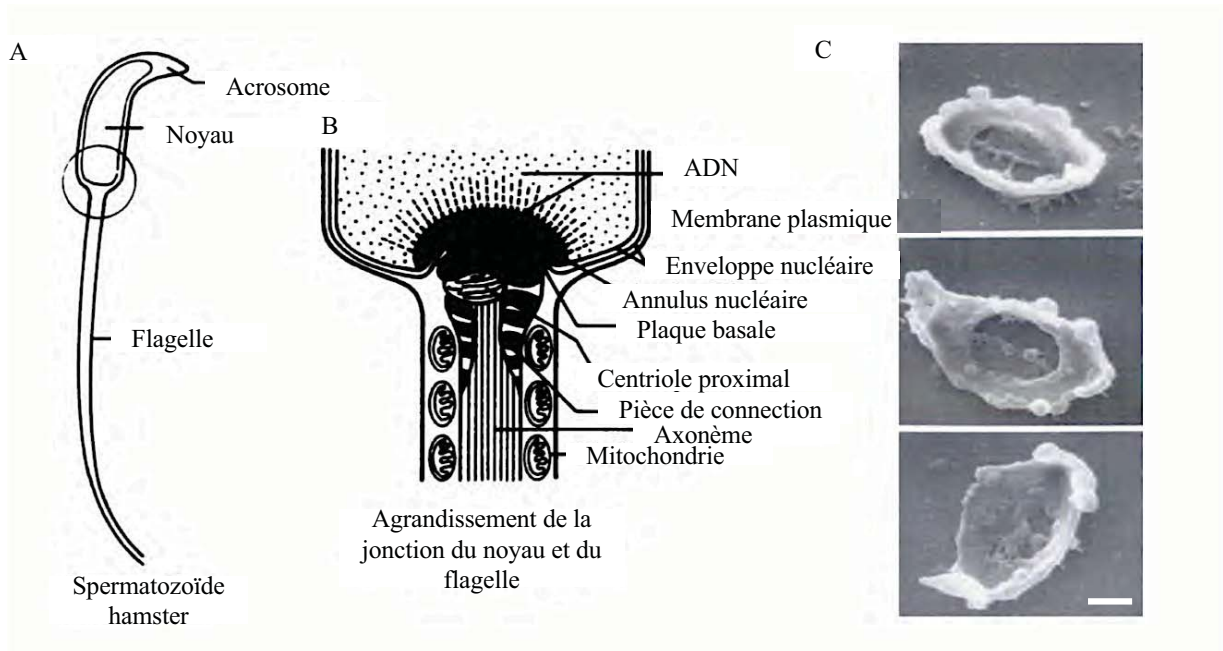


Figure 20 : Annulus nucléaire spermatique.

L'annulus nucléaire est une structure située à la base du noyau spermatique. Elle a été isolée à partir de spermatozoïdes de hamster (A). Sa localisation à la jonction de la tête et du flagelle est représentée schématiquement en B. Des annulis spermatiques, isolés de hamster ont ainsi pu être observés par microscopie électronique à balayage (C). Echelle (barre blanche) : 0,5 μm .

(Modifiée d'après *Ward and Coffey, 1989*).

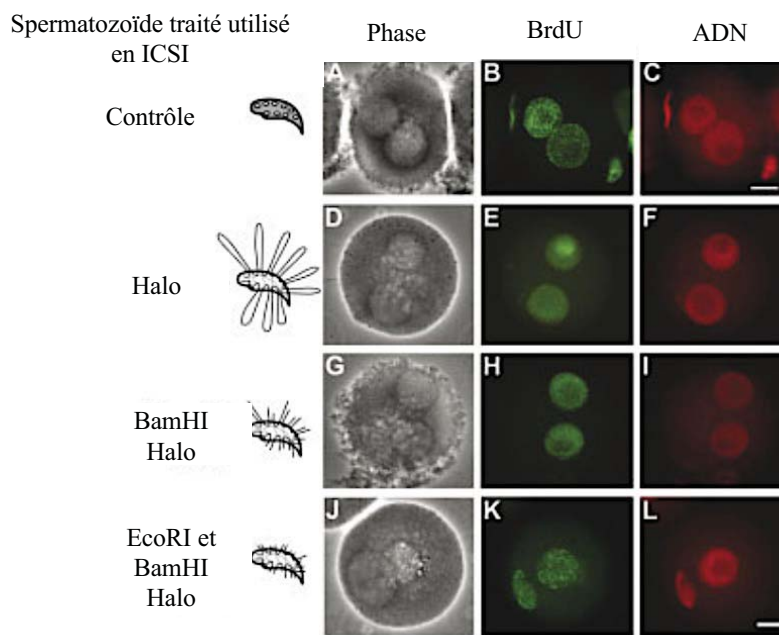


Figure 21 : Importance des MAR spermatiques dans le développement embryonnaire.

L'injection intracytoplasmique dans un ovocyte d'ADN spermatique nu seul (halo) ou co-injecté avec une matrice nucléaire spermatique isolée ne permet pas la formation du *pronucleus* mâle, ni sa réplication. Tandis que l'injection de matrice nucléaire spermatique uniquement associée aux courts fragments d'ADN à la base des tores (donc des fragments d'ADN associés aux MAR spermatiques, EcoRI et HindIII, halo) autorise la formation du *pronucleus* mâle et sa réplication, malgré une dégradation de l'ADN spermatique allant de 20 à 50 %. ICSI : Injection intracytoplasmique de spermatozoïde, Echelle (barre blanche) : 20 μm .

(Modifiée d'après *Shaman et al., 2007*).

localisée à la périphérie du noyau, attachée à la matrice nucléaire spermatique murine (figure 23).

Les études d'analyse globale du génome montrent que ces histones persistantes sont retrouvées au sein des promoteurs de gènes impliqués dans le développement précoce de l'embryon (facteurs de transcription, voies de signalisation, gènes HOX...), de gènes codant pour des microARN (miARN), de gènes à empreinte parentale et de gènes participant à la spermatogenèse (Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009), même si actuellement il existe une controverse à propos de ces données que nous développerons par la suite. De façon plus détaillée, ces équipes ont étudié différents types de variants d'histones et de modifications post-traductionnelles. Par exemple, le variant de l'histone H2B spécifique du testicule, TH2B, est principalement retrouvé dans le promoteur des gènes impliqués dans la maturation, le fonctionnement et la capacitation des spermatozoïdes et ceux importants dans la fécondation, mais jamais dans le promoteur des gènes intervenant dans le développement embryonnaire (Montellier et al., 2013). Le variant H2A.Z est principalement trouvé dans les domaines d'hétérochromatine péri-centromérique (Greaves et al., 2006). Néanmoins, ces deux dernières études ne s'intéressent pas directement aux spermatozoïdes matures mais au stade spermatide.

Dans le spermatozoïde, le variant de l'histone H3.3 est enrichi sur les îlots CpG et est souvent triméthylé sur la lysine 4 (H3K4me3) tandis que H3.1/H3.2 sont peu présents sur les îlots CpG et notamment ceux marqués par H3K27me3 (Erkek et al., 2013). Cependant, les données contradictoires de différents groupes ont montré que les histones persistantes étaient aussi associées à des séquences intergéniques à l'extérieur des régions régulatrices des gènes (Erkek et al., 2013 ; Kocer et al., 2015). A ce jour, il n'y a pas de véritable consensus quant à savoir quelles séquences spécifiques d'ADN sont associées aux nucléosomes dans le spermatozoïde. En effet, tout comme nous, l'équipe de Samans montrent l'enrichissement des nucléosomes dans les régions intergéniques distales et les introns associés aux séquences répétées centromériques et rétrotransposons (*LINE1* et *SINE*) chez l'homme et le bovin (Samans et al., 2014 ; Kocer et al., 2015)). Une étude de la même année rapporte que les nucléosomes sont principalement répartis dans les régions pauvres en gènes dans le spermatozoïde murin (Carone et al., 2014). Néanmoins, en utilisant une autre stratégie d'analyse bio-informatique adaptée à la similitude de séquences entre les éléments répétés, l'équipe de Peters AH. n'a pu reproduire ces résultats (Royo et al., 2016).

Parmi les études évoquées précédemment, certaines se sont aussi intéressées aux modifications post-traductionnelles portées par les histones persistantes. Par exemple la méthylation H3K4me2 de l'histone H3 a été retrouvée au niveau des promoteurs des gènes des

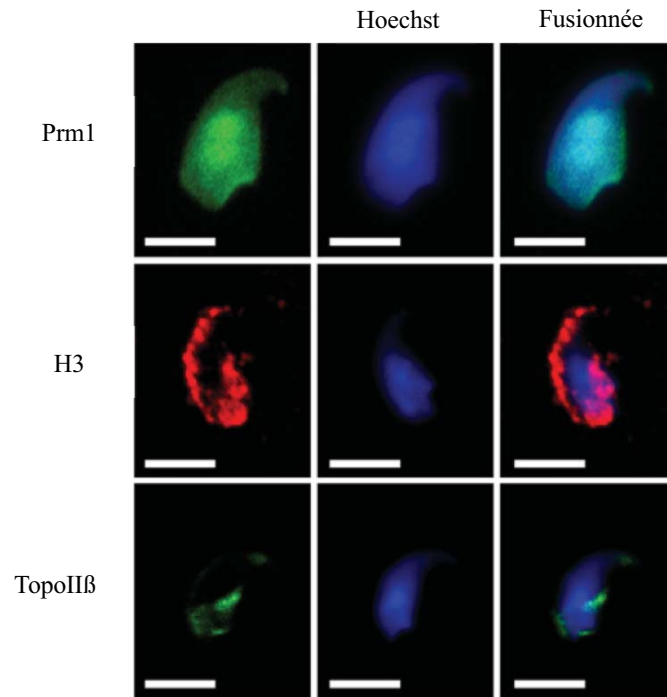


Figure 22 : Localisation des protéines de la chromatine spermatique murine.

Immunofluorescence sur des spermatozoïdes de souris afin de localiser la protamine (PRM1), l'histone canonique H3, la topoisomérase-IIβ (TopoIIβ) marqueur de la matrice nucléaire. Les résultats ont été analysés en microscopie confocale. Hoechst (bleu) : noyau. Echelle (ligne blanche) : 5 μm

(Modifiée d'après Noblanc *et al.*, 2013).

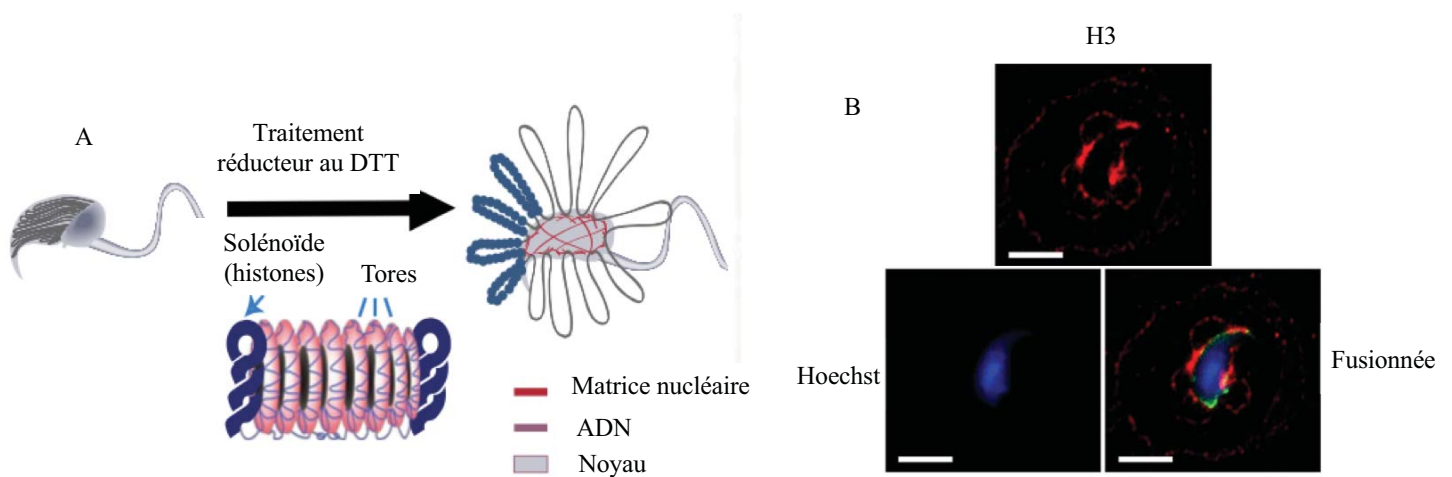


Figure 23 : Les histones liées à la matrice nucléaire.

A. Schéma représentant des spermatozoïdes traités avec un agent réducteur le dithiothréitol (DTT) qui permet de relâcher la chromatine conduisant à la formation de spermatozoïdes avec des halos.

B. L'immunofluorescence réalisée sur ces spermatozoïdes montre que dans les halos on retrouve le marquage de l'histone H3 (rouge). Néanmoins, une partie des histones persistantes restent localisée dans le noyau, attachée à la matrice nucléaire ; Hoechst (bleu) : noyau. Echelle (ligne blanche) : 5 μm

(Modifiée d'après Noblanc *et al.*, 2013).

facteurs de transcription impliqués dans le développement, tandis que H3K9me3 ne se situe pas près des gènes mais dans les régions péri-centromériques. De plus, H3K4me3 se localise sur des promoteurs de gènes du développement, les promoteurs des clusters de gènes HOX. Alors que H3K27me3 est enrichi sur les promoteurs de gènes du développement qui sont réprimés dans l'embryon au stade précoce incluant les promoteurs bivalents, H3K4me3/H3K27me3, dans les cellules souches embryonnaires (Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009).

Comme nous venons de le voir, la spermatogenèse permettant de produire les spermatozoïdes est un processus complexe étroitement régulé. Cependant, des erreurs ou des mutations des différents acteurs qui interviennent dans ce processus peuvent conduire à des défauts au niveau des spermatozoïdes voire à une infertilité masculine.

B. Les altérations de l'organisation de la chromatine spermatique et infertilité masculine

a. L'infertilité

L'infertilité d'un couple est définie comme une incapacité à procréer après un an de rapports sexuels sans contraception.

L'infertilité concerne environ 10 à 15 % des couples et l'homme est impliqué seul ou avec la femme dans 50 à 60 % des cas. Les causes de l'infertilité masculine sont variées et peuvent être multifactorielles. Elles peuvent être d'origine génétique (anomalies chromosomiques, mutations, microdélétions), environnementale (exposition à la chaleur, à des pesticides, à des médicaments anti-cancéreux, habitudes de vie...), hormonale, infectieuse et, dans 30% des cas elle reste d'origine inconnue (dénommée alors infertilité idiopathique ; Jungwirth et al., 2012). L'infertilité masculine peut se traduire ou non par des variations des paramètres spermatiques comme le nombre de spermatozoïdes et la proportion de gamètes mobiles, vivants ou de morphologie normale. Lorsque ces paramètres respectent les normes établies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), nous parlons de normozoospermie. Les anomalies constatées lors d'un spermogramme sont :

- L'azoospermie : une absence de spermatozoïdes ;
- L'oligozoospermie : une concentration en spermatozoïdes < 15 millions/mL ;
- L'asthénozoospermie : une proportion de spermatozoïdes mobiles < 40 % ;
- La tératozoospermie : pourcentage de spermatozoïdes de morphologie normale > 5 % (Critères stricts de Kruger ; Check et al., 1992) ;

Tests	Description	Echantillons frais ou congelés	Cassures ADN simple ou double brins	Compaction de l'ADN	Méthode de détection	Image	Référence	
TUNEL	Ajout nucléotides marqués à l'extrémité d'ADN libre	Les 2	Les 2		Microscopie à fluorescence Cytométrie en flux		(Gorczyca <i>et al.</i> , 1993).	
COMET assay	Electrophorèse de spermatozoïdes isolés. L'ADN fragmenté migre et forme un faisceau, l'ADN intact reste dans la tête	Frais seulement	COMET Neutre : ADN db COMET Alkaline : ADN sb		Microscopie à fluorescence		(Klaude <i>et al.</i> , 1996).	
SCSA®	Acridine orange lie l'ADN	Les 2	Les 2 fluorescence verte= ADN db fluorescence rouge = ADN sb		Cytométrie en flux		(Evenson <i>et al.</i> , 1999)	
SCD	Evaluation d'un halo d'ADN décondensé	Les 2	Simple brin		Microscopie à fluorescence Microscopie optique		(Fernández <i>et al.</i> , 2003).	
Acridine Orange	Mesure la compaction de l'ADN	Les 2			Bonne intégrité = vert Faible intégrité = rouge-orange	Microscopie à fluorescence		(Erenpreisa <i>et al.</i> , 1997).
Bleu de Toluidine	Mesure la compaction de l'ADN	Les 2			Bonne intégrité = bleu Faible intégrité = violet	Microscopie optique		(Kim <i>et al.</i> , 2013)
Bleu d'Aniline	Evaluation des résidus lysines des histones persistantes	Les 2			Bonne intégrité = transparent Faible intégrité = bleu	Microscopie optique		(Terquem and Dadoune, 1983).
CMA3	Compétition avec les protamines	Les 2		Bonne intégrité = jaune terne Faible intégrité = jaune brillant	Microscopie à fluorescence		(Bianchi <i>et al.</i> , 1996).	
Anticorps anti-8-OHdG	Détecte les résidus 8-OHdG	Les 2	Marque les adduits 8-OHdG		Microscopie à fluorescence Cytométrie en flux		(Noblanc <i>et al.</i> , 2013)	

Tableau 1 : Résumé des techniques évaluant les défauts à l'ADN spermatique.

Les différentes techniques utilisées pour évaluer les dommages au noyau spermatique (compaction, fragmentation, oxydation). SCSA : *Sperm chromatin structure assay*, SCD : *sperm chromatin dispersion*, CMA3 : *chromomycin A3*, sb : simple brin, db : double brin.

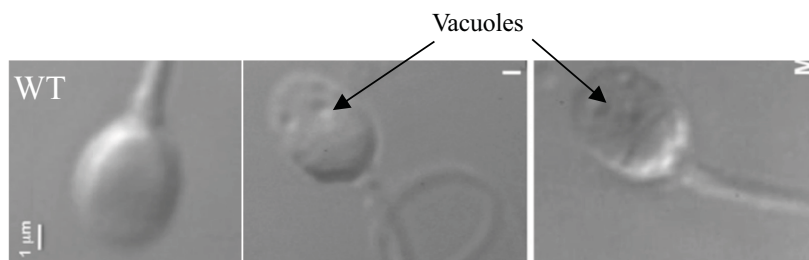


Figure 24 : Présence de vacuoles dans le noyau spermatique humain.

Dans le noyau spermatique humain, il est possible d'observer avec un microscope à fort grossissement (x6 500 à x10 000 ou MSOME : *motility sperm organelle morphology examination*) des vacuoles qui sont un indicateur de défauts de condensation de la chromatine spermatique. (Modifiée d'après Boitrelle *et al.*, 2013).

- La nécrozoospermie : une proportion de spermatozoïdes morts > 50 %.

En plus d'analyser les paramètres morphologiques et de mobilité des spermatozoïdes, de nombreuses techniques ont été mises en place pour étudier l'intégrité du noyau spermatique qui est, comme nous allons le voir, un paramètre clé de la qualité du spermatozoïde et par conséquent de la fertilité.

De nombreuses études montrent un lien entre fragmentation de l'ADN et infertilité masculine (Makker et al., 2009 ; Rex et al., 2017). L'origine de la fragmentation de l'ADN spermatique est diverse. En effet, elle peut être due à un défaut de réparation des cassures, nécessaires à la compaction, engendrées lors de la spermatogenèse (*cf.* § II.A.b.1. cassures ADN au cours de la spermiogenèse ; McPherson and Longo, 1993). La présence de cassures d'ADN dans le spermatozoïde humain est donc un indicateur de maturation incomplète de la chromatine au cours de la spermiogenèse et d'infertilité (McPherson and Longo, 1993). Elle peut aussi être due à des attaques radicalaires engendrées par un stress oxydant post-testiculaire (Aitken, 2016 ; Jena, 2012). Si l'homme présente une fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes, alors un temps de gestation prolongé (Evenson et al., 1999), un risque accru d'avortement (Dar et al., 2013 ; Kennedy et al., 2011 ; Lin et al., 2008 ; Virro et al., 2004 ; Zini et al., 2008) et un taux de succès significativement réduit dans la fécondation *in vivo* ont été observés (Bungum et al., 2004, 2007 ; Giwercman et al., 2010 ; Spanò et al., 2000 ; Zini and Al-Hathal, 2011). Un index de mesure de la fragmentation de l'ADN (ou DFI) a ainsi été proposé (Evenson et al., 1999 ; Speyer et al., 2010). Si le taux de fragmentation de l'ADN est supérieur à 30%, le taux de réussite dans les protocoles de procréation médicalement assistée (PMA) est très faible, notamment en injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI ; Speyer et al., 2010). Il existe des approches directes et indirectes pour évaluer le taux de fragmentation de l'ADN et de compaction du noyau spermatique (tableau 1 ; Evgeni et al., 2014). Parmi ces techniques, des approches de TUNEL ou de SCSA (*sperm chromatin structure assay*) pour mesurer le taux de fragmentation de l'ADN sont utilisées par quelques centres de PMA. Dans une étude récente, il a été constaté que les taux de fécondation pouvaient également être diminués après la fécondation *in vitro* (FIV), lorsque le SCSA dépassait 30% (Oleszczuk et al., 2016). Cependant, malgré des évidences scientifiques claires et nombreuses, aucune agence de santé dans le monde ne recommande la mesure systématique de la fragmentation de l'ADN spermatique dans l'évaluation standard de l'homme infertile.

Un autre indicateur de défaut de condensation de la chromatine du spermatozoïde

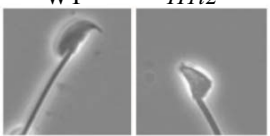
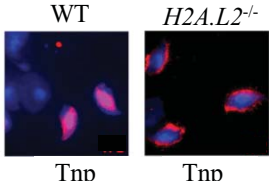
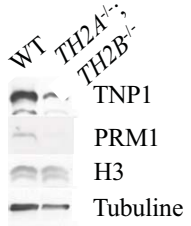
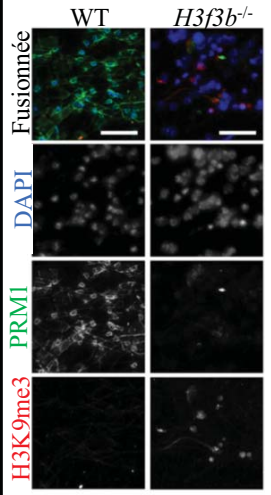
Variant	Description	Espèce	Noyau	Spermatozoïde	Image	Référence
HILS	Diminution de l'expression	Homme	Pas de caractérisation	Baisse de la mobilité (Asthénozoospermie)		Jedrzejczak <i>et al.</i> , 2007
H1T2	Diminution des Prm	Souris	Défaut de condensation	Défauts morphologique		Tanaka <i>et al.</i> , 2005 Martianov <i>et al.</i> , 2005
H2A.L2	Mauvaise localisation des TNP et des PRM	Souris	Défaut de condensation	Défaut morphologique et de mobilité		Barral <i>et al.</i> , 2017
TH2B	Compensation de l'absence par augmentation de l'histone H2B canonique	Souris	Souris fertiles mais l'expression d'un dominant négatif de TH2B conduit à une infertilité			Montellier <i>et al.</i> , 2013
TH2A/TH2B	Faible quantité de TNP1 et PRM1	Souris	Défauts de condensation	Pas de caractérisation		Shinagawa <i>et al.</i> , 2015
H3f3b	Déposition anormale de TNP1 et absence de PRM1 Augmentation de la marque H3k9me3 et perturbation de l'expression des gènes de la spermatogenèse	Souris	Défaut de condensation	Azoospermie		Yuen <i>et al.</i> , 2014
H3t	Perte des spermatides	Souris	Pas de caractérisation	Azoospermie		Ueda <i>et al.</i> , 2017

Tableau 2 : Caractérisations de l'inactivation des variants d'histones.

Différents variants d'histones invalidées chez la souris et l'impact sur le spermatozoïde.

PRM : Protamines ; TNP1 : Protéine de transition 1

humain est la présence de vacuoles d'origine nucléaire (figure 24 ; Boitrelle et al., 2013). Néanmoins, l'implication de ces vacuoles dans l'infertilité masculine reste controversée même s'il a été montré récemment un lien entre les échecs de reproduction lors de protocoles d'ICSI et la présence de vacuoles dans le noyau spermatique humain (Ghazali et al., 2015 ; Komiya et al., 2013).

b. Les défauts de remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse et infertilité

Afin d'étudier le rôle des variants d'histones au cours de la spermatogenèse, des invalidations de variants d'histones, globales ou ciblées à la lignée germinale mâle, ont été réalisées chez la souris (tableau 2). Dans les faits, l'invalidation de nombreux variants d'histones chez la souris conduit à des défauts de compaction lors de la mise en place des TNP et des PRM conduisant à une décompaction de la chromatine. Par exemple, chez l'homme, un haut niveau d'histones est associé avec des défauts de compaction de la chromatine et à des infertilités (Azpiazu et al., 2014 ; Zhang et al., 2006).

Chez l'homme, la présence accrue de certaines modifications post-traductionnelles, telles que H3K4me1 et 3, H3K9me2, H3K19me2 et H3K36me3 sur les histones persistantes, engendre des défauts de compaction de la chromatine spermatique et corrèle avec des spermatozoïdes non fonctionnels (perte de mobilité ; La Spina et al., 2014).

Au cours de la spermiogenèse, la chromatine spermatique subit un remodelage profond faisant intervenir de nombreux acteurs (*cf.* § II.A.b. spermiogenèse). L'importance de la compaction de la chromatine a été mise en évidence par l'utilisation de modèles de souris transgéniques. L'invalidation du gène codant pour la protéine à bromodomaine BRDT conduit à un phénotype de souris infertiles. Ces souris présentent une oligozoospermie et une asthénozoospermie associées à un pourcentage élevé d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes, incluant des têtes anormales et des défauts de condensation de la chromatine, observés au MET (figure 25 ; Shang et al., 2007).

L'invalidation de *Chd5* chez la souris entraîne un phénotype similaire à celui de l'invalidation du gène codant pour la protéine à bromodomaine BRDT (Li et al., 2014 ; Zhuang et al., 2014). Conduisant ainsi au maintien des histones au niveau de la chromatine. Les souris invalidées pour *Chd5* ont également une expression perturbée des *Tnp1* et *2* ainsi que des protamines. Un faible niveau d'expression de *CHD5* a été associé à des situations d'infertilité humaine (Li et al., 2014).

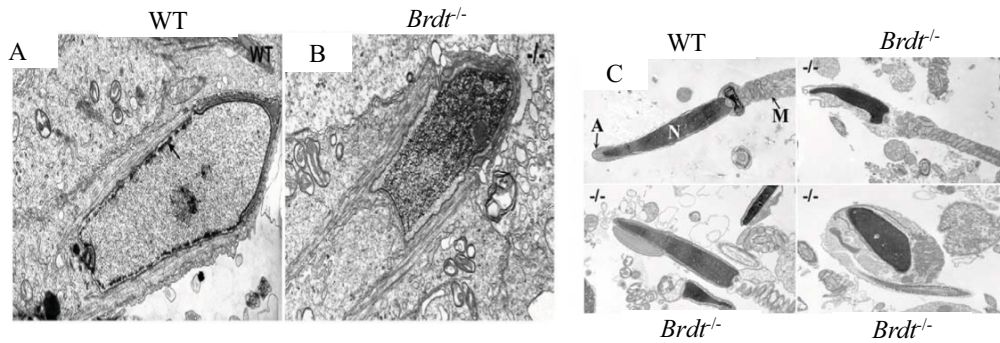


Figure 25 : Phénotype des souris invalidées pour *Brdt*

Observation de la chromatine dans les spermatoïdes allongées. La microscopie électronique révèle une chromatine normale dans les spermatozoïdes sauvages (WT) (A) et l'absence d'enveloppe nucléaire chez les souris invalidées pour *Brdt* (*Brdt*^{-/-}; B). Microscopie électronique de spermatozoïdes montrant une décondensation du noyau chez les souris invalidées pour *Brdt* (C). (D'après Shang *et al.*, 2007).

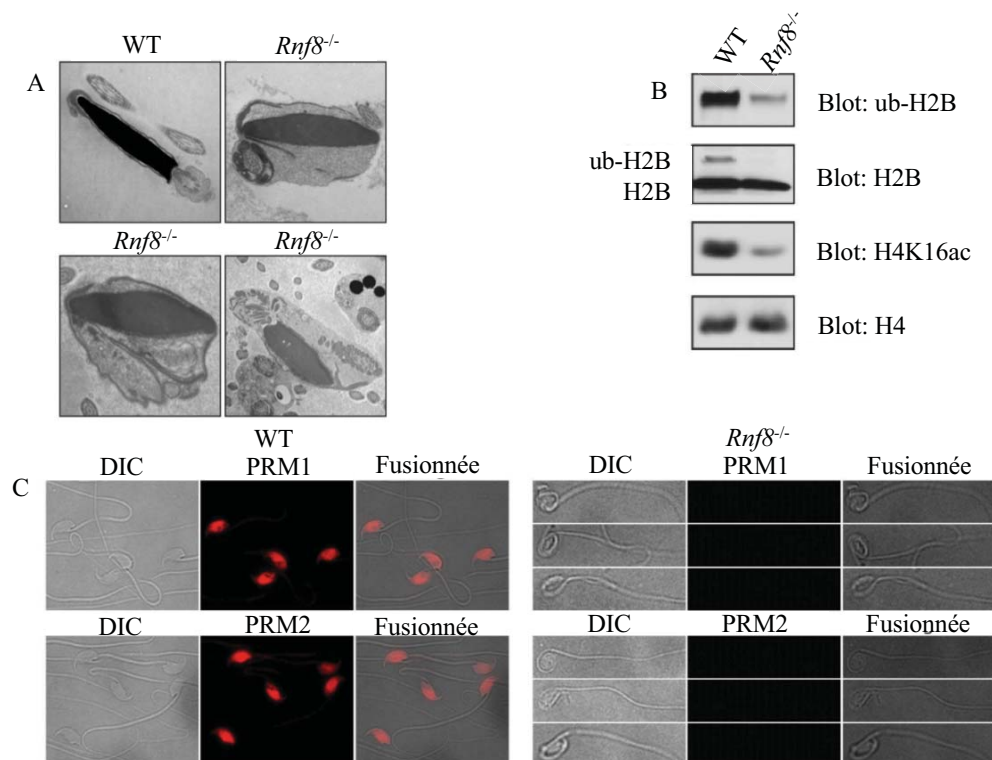


Figure 26 : Phénotype des souris invalidées pour *Rnf8*.

L'invalidation de l'ubiquitine E3 ligase Rnf8 (*Rnf8*^{-/-}) conduit à des spermatozoïdes ayant un noyau décondensé et un résidu de cytoplasme plus important que chez les spermatozoïdes des souris sauvages (WT), observés au microscope électronique (A). L'absence d'ubiquitinylation de l'histone H2B montrée par *Western-blot* conduit à une baisse de l'acétylation de l'histone H4 chez les souris *Rnf8*^{-/-} (B). L'invalidation de *Rnf8* induit un défaut dans le remplacement des histones dans le noyau spermatique et donc à l'absence de protamines (PRM1 et PRM2 ; C). (Modifiée d'après Lu *et al.*, 2010)

L'importance de RNF8 (*cf.* § II.A.b.1. ubiquitinylation), et donc de l'ubiquitinylation, dans les cellules germinales a été montrée par son invalidation. La perte de *Rnf8* cause de nombreux défauts de développement dans les spermatides où nous comptons alors peu de spermatides allongées (figure 26). La condensation de l'ADN est altérée notamment à cause d'un défaut lors du remplacement des histones par les protamines (rétention des histones ; Lu et al., 2010). De plus, nous observons une baisse de l'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 16 (H4K16), suggérant un rôle de l'ubiquitinylation dans l'acétylation de l'histone H4 (figure 26 ; Lu et al., 2010). Il avait été suggéré précédemment que l'ubiquitinylation des histones H2A et H2B servait de cible à une acétyltransférase responsable de l'acétylation de H4 dans les spermatides allongées chez la drosophile (Akhtar and Becker, 2000).

Par ailleurs, l'une des protéines intervenant dans la régulation des piARNs (*cf.* III.B.a.2. § piARNs), MIWI est dégradée après ubiquitinylation par l'*ubiquitin E3 ligase APC/C (Anaphase Promoting complex/cyclosome)* au cours de la spermatogenèse. La stabilisation de MIWI inhibe la translocation nucléaire de RNF8 et donc l'ubiquitinylation des histones par RNF8 dans les spermatides et ainsi le remplacement des histones (Gou et al., 2017).

Les souris invalidées pour les poly(ADP-ribose) polymérases, *Parp1* et *2*, intervenant dans le remplacement des histones, sont infertiles et la quantité d'histones dans les spermatocytes est augmentée conduisant à une réduction de la condensation de la chromatine. Les spermatozoïdes de ces souris présentent des noyaux mal formés avec une décondensation de la chromatine et une augmentation des cassures doubles brins d'ADN. Une rétention anormale des histones H3, TH2B, H1t et HILS est observée chez ces animaux transgéniques. Chez l'homme, des variations du niveau des protéines PARP sont associées à des infertilités (El-Domyati et al., 2009 ; Jha et al., 2009 ; Meyer-Ficca et al., 2009, 2015). De plus, les protéines PARP agiraient sur la mise en place des TNP en interagissant notamment avec la protéine chaperonne des TNP, HSPA2, cette dernière n'étant présente que dans les cellules germinales (Govin et al., 2006 ; Quénet et al., 2009).

In vivo, l'invalidation chez la souris de la protéine TNP 1 ou TNP 2 n'induit pas de phénotype marqué dans le noyau spermatique mais nous observons un phénotype d'infertilité (Yu et al., 2000 ; Zhao et al., 2001). Seulement 40% des souris mâles sont fertiles et la taille de la portée est réduite. De 7,7 petits chez les souris sauvages, nous descendons à 1,6 et 3,9 petits par portée chez les animaux *Tnp 1^{-/-}* et *Tnp 2^{-/-}*, respectivement, quand les mâles sont croisés avec des souris femelles sauvages de même fond génétique. Selon les auteurs, dans ces modèles,

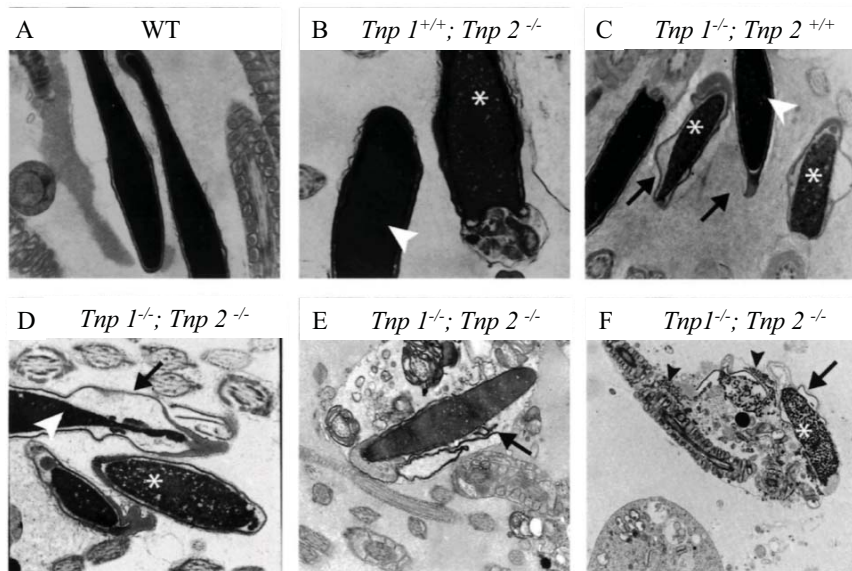


Figure 27 : Défauts de condensation de la chromatine spermatique chez les souris invalidées pour *Tnp 1* et *2*.

Spermatozoïde avec une chromatine condensée de façon homogène chez une souris sauvage (WT ; A). Spermatozoïde de souris invalidée pour *Tnp 2* (*Tnp 2*^{-/-}) présentant une chromatine peu hétérogène et une membrane acrosomale normale (B). Spermatozoïde de souris invalidée pour *Tnp 1* (*Tnp 1*^{-/-}) montrant une condensation hétérogène de la chromatine et une membrane acrosomale abimée (C). Spermatozoïdes de souris invalidées pour *Tnp 1* et *2* (*Tnp 1*^{-/-} ; *Tnp 2*^{-/-}) présentant des défauts de condensation du noyau et des excédants de cytoplasme (D à F). Grossissements A, x10 000 ; B, x18 000 ; C, x8 000 ; D, x7 400 et E, x4 400. (D'après Shirley *et al.*, 2004).

l'infertilité est principalement due à une baisse de la mobilité des spermatozoïdes. Les auteurs notent une structure anormale de la chromatine en condensation au niveau des spermatides et observent également une disparition normale des histones, mais une quantité plus importante de l'autre forme de TNP ainsi qu'une apparition prématurée de la pré-PRM 2. Le processus de maturation par clivage de la pré-PRM 2 (*cf.* II.A.b.3. § Les protamines) est retardé entraînant une persistance de formes intermédiaires dans les spermatozoïdes épидидymaires (*cf.* II.C. § maturation épидидymaire). De plus, chez les souris *Tnp 2^{-/-}*, les spermatozoïdes épидидymaires présentent des défauts du flagelle avec une pièce intermédiaire « en épingle à cheveux » ou avec des fibres séparées ainsi qu'une chromatine moins condensée et irrégulière.

En revanche, les souris chez lesquelles l'inactivation des deux gènes *Tnp* a été réalisée présentent un nombre de spermatozoïdes épидидymaires fortement diminué ayant des défauts de mobilité, de viabilité et de morphologie (Shirley et al., 2004). Comme chez les souris mutantes pour une seule des TNP, les formes de PRM 2 présentes sont majoritairement non clivées et intermédiaires (*cf.* II.A.b.3. § les protamines), entraînant la présence d'une chromatine peu condensée. L'utilisation de tels spermatozoïdes dans une procédure d'ICSI, conduit à des embryons présentant des défauts de développement associés à une faible viabilité. Par ailleurs, ces études ont souligné le fait que les fonctions des TNP 1 et TNP 2 ne sont pas complètement redondantes (figure 27 ; Shirley et al., 2004).

L'incorporation des protamines dans la chromatine est étroitement régulée, et selon les espèces le ratio PRM 1/PRM 2 est différent (Corzett et al., 2002). Chez l'homme, ce ratio est d'approximativement 1/1 chez des hommes fertiles mais il a été trouvé perturbé chez des patients présentant une infertilité (Nanassy et al., 2011 ; Oliva, 2006 ; de Yebra et al., 1993). En effet, des patients avec un ratio PRM 1/PRM 2 altéré, ont une concentration spermatique et une mobilité des spermatozoïdes diminuées. De plus, les spermatozoïdes présentent une morphologie anormale de la tête spermatique et des dommages à l'ADN (fragmentation ; de Mateo et al., 2009). Dans des modèles murins invalidés pour *Prm 1*, *Prm 2* ou pour les deux protamines, nous observons une infertilité caractérisée par une oligoasthénospermie et des spermatozoïdes présentant une morphologie anormale et une fragmentation de l'ADN (Aoki et al., 2005a, 2005b, Cho et al., 2001, 2003 ; Simon et al., 2011). Récemment, une souris femelle chimère déficiente pour la *Prm 1* a été générée. Après croisement avec des mâles sauvages, ces souris produisent des souriceaux mâles ayant un génotype hétérozygote pour *Prm 1* (*Prm 1^{+/-}*). Les souris mâles *Prm 1^{+/-}*, présentent une augmentation de la forme pré-Prm2 au détriment de

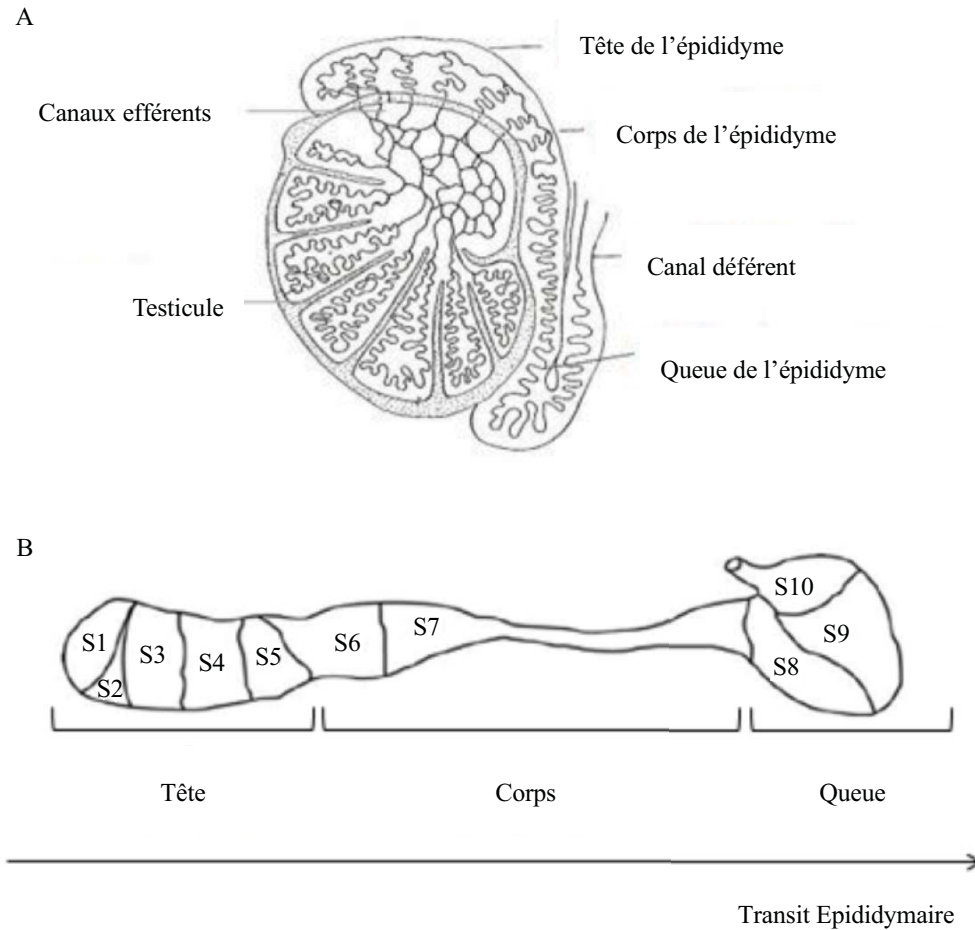


Figure 28 : Représentation schématique de l'épididyme de souris.

A. L'épididyme est situé sur la face postérieure du testicule et relie les canaux efférents au canal déférent.

B. L'épididyme est divisé en trois parties : la tête, le corps et la queue, elles-mêmes subdivisées en segments, au nombre de 10 chez la souris.

(D'après Johnston *et al.*, 2005).

la forme mature Prm2 et une décondensation de la chromatine spermatique. De plus, ils sont incapables d'engendrer une progéniture lors d'un accouplement naturel. Néanmoins, des souriceaux peuvent être générés par fécondation *in vitro* en utilisant des ovocytes ne présentant aucune zone pellucide (Takeda et al., 2016).

Au cours de la spermatogenèse, si la mise en place de la chromatine spermatique se fait de manière optimale, le spermatozoïde est presque morphologiquement mature à la sortie du testicule. Il possède un flagelle et une chromatine compactée contenant majoritairement des protamines. Mais il va devoir poursuivre sa maturation structurelle et acquérir sa maturité fonctionnelle (mobilité, reconnaissance de l'ovocyte ...) notamment au cours du transit dans l'épididyme, afin de pouvoir féconder l'ovocyte dans les voies génitales femelles.

C. La maturation Épididymaire

L'épididyme est un organe situé sur la face postérieure du testicule. Il est composé d'un unique tubule fortement replié sur lui-même, permettant de relier les canaux efférents, chargés de réabsorber une grande partie du fluide testiculaire, au canal déférent (figure 28). L'épididyme est composé de trois régions anatomiquement et fonctionnellement différentes : la tête, le corps et la queue, elles-mêmes divisées en segments, chez la souris nous comptons 10 segments (figure 28 ; Johnston et al., 2005 ; Turner, 2008 ; Robaire et al., 2008). Chez toutes les espèces de Mammifères, chaque région de l'épididyme est organisée en lobules séparés par des cloisons de tissu conjonctif. Ces *septas* servent non seulement de support interne à l'organe mais sont également censés fournir une séparation fonctionnelle entre les lobules, ce qui permet l'expression sélective des gènes et des protéines dans les lobules individuels (Cornwall, 2009 ; Kirchhoff, 1999).

a. Les fonctions de l'épididyme

L'épididyme possède quatre fonctions principales qui sont le transport des spermatozoïdes, la protection des spermatozoïdes, le développement de la mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Les activités absorbantes et sécrétrices de l'épithélium épididymaire favorisent le processus de maturation par la création d'un milieu luminal spécialisé. En effet, c'est durant le transit épididymaire que les spermatozoïdes acquièrent leur maturité et deviennent notamment capables de reconnaître et de féconder un ovocyte. Chaque segment, par ses activités de sécrétion et d'endocytose fait varier la composition du fluide

épididymaire et le spermatozoïde acquière une maturation morphologique, biochimique et fonctionnelle progressive. L'épididyme a également pour rôle de protéger les spermatozoïdes. En effet, ce sont des cellules quiescentes, transcriptionnellement et traductionnellement inactives qui ne peuvent donc pas réagir à leur milieu. De plus, leur cytoplasme et ses organites ont été éliminés lors de la spermiogenèse, limitant grandement les réserves d'enzymes de défense et de réponse au stress. Pour éviter donc toute atteinte des gamètes, l'épithélium épididymaire *via* la composition du fluide, est chargé de finement contrôler l'environnement des spermatozoïdes.

1. Le transport et le stockage des spermatozoïdes

✚ Le transport

Une fois libérés dans la lumière du tube séminifère, les spermatozoïdes sont transportés à travers les canaux efférents et commencent leur descente dans l'épididyme. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour mesurer la durée de ce transit. La méthode la plus directe consiste à incorporer un isotope marqué dans l'ADN des cellules germinales au stade de spermatogonie et à suivre la progression de la première vague de spermatozoïdes marqués le long de l'épididyme. Les spermatozoïdes transitent pendant 1 à 2 semaines, selon les espèces. Par exemple, la durée moyenne de transit a été évaluée à 8 jours chez le taureau (Orgebin-Crist et al., 1962) et à 12 jours chez l'homme (Rowley et al., 1970). Chez la souris, ce temps de transit est estimé à 10 jours (Meistrich et al., 1975).

Les spermatozoïdes pénètrent dans l'épididyme propulsés par le liquide testiculaire et éventuellement le battement des cellules ciliées des canaux efférents. Cependant, dans l'épididyme, l'épithélium est tapissé de stéréocils immobiles et l'absorption massive de liquide testiculaire se produit dans les canaux efférents et le segment initial de l'épididyme, ce qui conduit à une réduction drastique de l'écoulement de ce fluide (Crabo, 1965). Le transport s'effectue donc contre un gradient de pression hydrostatique croissant entre le testicule et la queue d'épididyme (Johnson and Howards, 1975). De ce fait, les tubules épididymaires sont entourés d'une couche de muscles lisses dont l'épaisseur et l'innervation adrénergique augmentent de la tête vers la queue d'épididyme, permettant ainsi de faire progresser les spermatozoïdes par des contractions péristaltiques (Baumgarten et al., 1971).

✦ Le stockage

Chez les Mammifères, les spermatozoïdes sont stockés dans la queue d'épididyme. Le temps de transit à travers la queue d'épididyme est de l'ordre de 3 à 15 jours et les spermatozoïdes peuvent être stockés dans ce tissu pour une durée n'excédant pas 30 jours (Orgebin-Crist et al., 1975). Le stockage des spermatozoïdes dans la queue d'épididyme est régulé afin de garantir que les cellules stockées restent quiescentes et inactives (Gatti et al., 2004). En effet, à ce stade, les spermatozoïdes sont matures et féconds, et la fonction de la queue d'épididyme est de conserver les spermatozoïdes dans cet état et d'empêcher tout déclenchement prématuré de la capacitation. Ainsi, l'épithélium épидидymaire de la queue maintient un pH luminal et des concentrations calciques faibles (Armstrong et al., 1994 ; Carr et al., 1985 ; Morton et al., 1978). De plus, il sécrète des facteurs décapacitants et des immobilines, glycoprotéines empêchant la mobilité des gamètes chez le rat et le hamster (Carr et al., 1985 ; Usselman et al., 1985).

Bien qu'il soit clair que la fonction principale de la queue d'épididyme soit de stocker les spermatozoïdes vivants, une hypothèse sur la reconnaissance et l'élimination des spermatozoïdes anormaux ou morts a été proposée par plusieurs groupes (Cooper and Hamilton, 1977 ; Weissenberg et al., 1995). Néanmoins, des études plus approfondies utilisant différentes espèces et moyens de créer des spermatozoïdes dits anormaux, tels que des traitements médicamenteux, sont nécessaires pour établir la fonction et les mécanismes sous-jacents à ce processus d'élimination.

2. *La maturation membranaire*

La maturation épидидymaire des spermatozoïdes concerne tous les composants biochimiques cellulaires du spermatozoïde que sont les lipides, les glucides et les protéines. En effet, la membrane cytoplasmique des gamètes subit un profond remodelage lipidique, protéique et glucidique conduisant à une plus grande fluidité et à l'acquisition et/ou à la modification des protéines essentielles à la reconnaissance et à la fusion avec l'ovocyte.

✦ La composition lipidique

Sur le plan lipidique, nous observons une augmentation de la fluidité membranaire induite par de nombreux changements dont un gain de phospholipides, une perte de cholestérol, une augmentation des acides gras polyinsaturés, conduisant à une diminution du rapport cholestérol/phospholipides (Rejraji et al., 2006 ; Saez et al., 2011).

Chez les Mammifères, durant le transit épидидymaire le ratio cholestérol/phospholipides augmente dans la membrane plasmique des spermatozoïdes. Ce phénomène est lié à la perte d'une grande quantité de phospholipides (Jones, 1998). Ils peuvent être éliminés par des phospholipases C ou A2 qui sont endogènes ou issues du fluide. Le profil de distribution des différentes classes de phospholipides est également modifié avec une diminution des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylsérines et des sphingomyélines et une augmentation des phosphatidylcholines (Haidl and Opper, 1997). Ces modifications augmentent la fluidité de la membrane mais diminuent sa stabilité. Néanmoins, elles sont nécessaires aux étapes suivantes telles que la capacitation, la réaction acrosomique et la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (Hall et al., 1991). L'efflux de cholestérol augmente également la fluidité et la perméabilité membranaires permettant l'influx d'ions calciques et l'activation de signaux de transduction préparant à la capacitation (Visconti et al., 1999a, 1999b, 1999c).

De plus, la saturation des acides gras membranaires diminue (Aveldaño, 1992), la proportion des acides gras polyinsaturés est donc augmentée lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes.

La composition protéique

Les protéines, quant à elles subissent de nombreuses modifications (glycosylation, post-traductionnelles, pontage disulfure notamment sur les protamines, protéolyse ménagée). Elles sont également supprimées (perte de l'ACE pour *angiotensin I converting enzyme*), incorporées (par exemple la glutathione peroxydase 5, les sialoprotéines) ou relocalisées (Dacheux et al., 2003, 2009). Parmi les modifications des protéines, le meilleur exemple est la fertiline qui fait partie de la famille de protéines ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*). En effet, la fertiline est essentielle à la fertilité car elle est impliquée dans la migration du spermatozoïde à travers l'oviducte et dans la capacité à lier la zone pellucide et la membrane plasmique de l'ovocyte (Cho et al., 1998). La fertiline est mise en place au cours de la spermatogenèse sous forme de précurseur et est maturée dans l'épididyme par des événements de protéolyse (Blobel, 2000). La protéine CRISP3 (*Cystein rich secretory protein*) quant à elle, est une protéine acquise durant le transit épидидymaire et est importante pour la reconnaissance et la liaison à l'ovocyte (Da Ros et al., 2015).

De même que la membrane plasmique, la chromatine spermatique est également maturée au sein de l'épididyme.

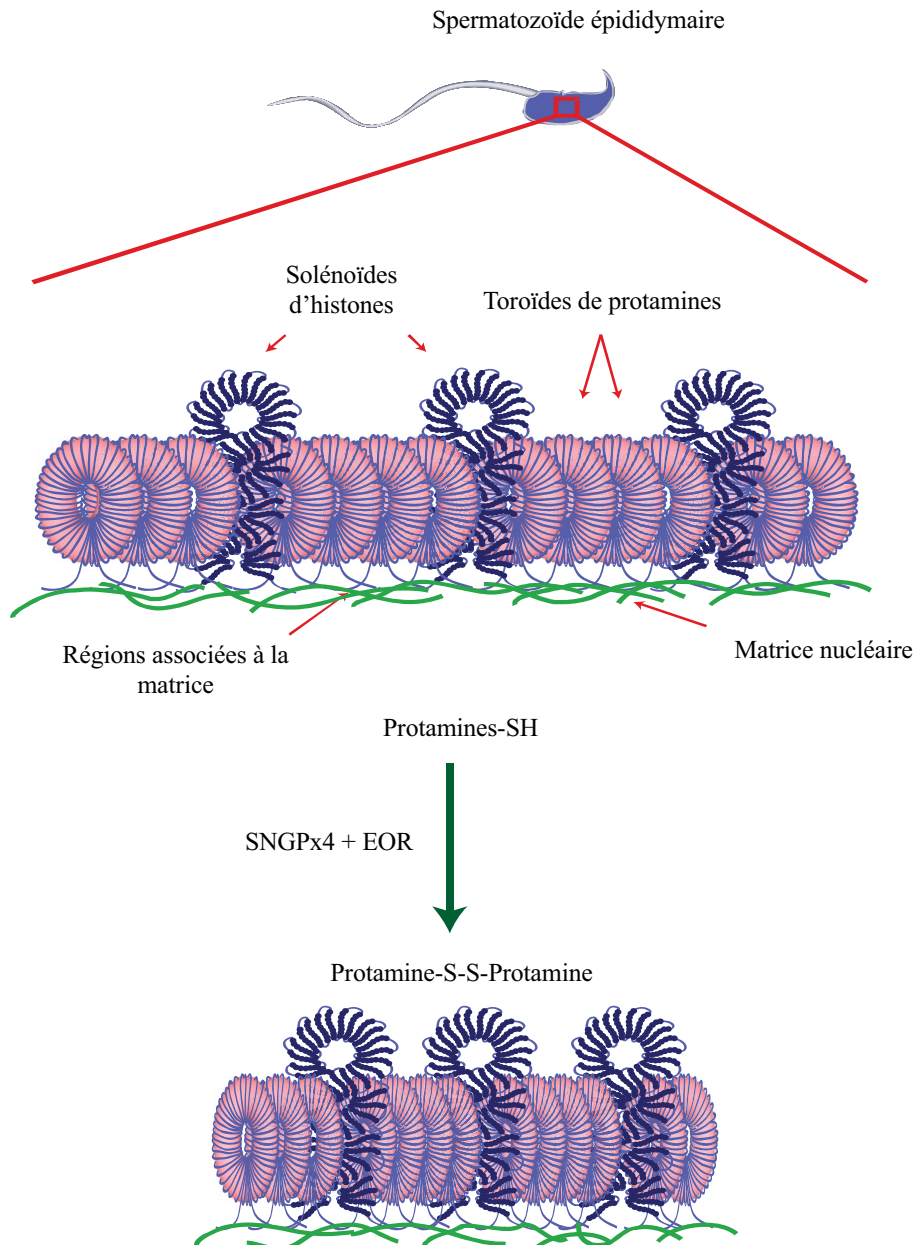


Figure 29 : Compaction nucléaire spermatique au cours du transit épидидymaire. A la sortie du testicule, au cours du transit épидидymaire, le spermatozoïde va subir une seconde compaction du noyau par l'établissement de ponts disulfures entre les protamines (rose) par l'intervention de la *sperm nuclear glutathione peroxidase 4* (SNGPx4) et des espèces oxygénées réactives (EOR). Les solénoïdes contenant les histones persistantes sont représentés en bleus et la matrice nucléaire en verte. (Modifiée d'après Noblanc *et al.*, 2014).

3. La maturation nucléaire

La morphologie des spermatozoïdes évolue également au cours du transit épидидymaire, surtout au niveau de la tête spermatique, par l'augmentation de la compaction de la chromatine, facilitant la mobilité du spermatozoïde dans le tractus génital femelle et augmentant la protection du génome paternel des atteintes extérieures (figure 29 ; Noblanc et al., 2012).

Cette compaction se fait par l'établissement de ponts disulfures entre les groupements thiols libres des cystéines portées par les protamines (Seligman et al., 1994 ; Shalgi et al., 1989). Cette mise en place se fait de manière spontanée ou par l'intervention d'enzymes de type disulfide isomérase localisées dans le noyau spermatique (Shalgi et al., 1989). Une telle enzyme, la SNGPx4 pour *sperm nucleus glutathione peroxydase 4* (ou *nuclear phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase* [nPHGPx]), spécifique du noyau spermatique a été caractérisée chez la plupart des Mammifères. *Sngpx4* est exprimée presque exclusivement dans les testicules à partir du même gène que les isoformes cytosolique et mitochondriale de GPx4. Un exon alternatif à la place du premier exon permettant de produire un ARNm spécifique de l'isoforme nucléaire (Moreno et al., 2003). C'est une protéine de 34KDa possédant une séquence de localisation nucléaire dans la partie amino-terminale ainsi qu'un domaine riche en arginine (Pfeifer et al., 2001). Mise en place dans le noyau spermatique en fin de spermatogénèse, cette enzyme fonctionne pendant le début du trajet épидидymaire des spermatozoïdes (Conrad et al., 2005). Elle a été montrée pour être liée à la matrice nucléaire spermatique (Puglisi et al., 2014). Elle possède une activité enzymatique capable de réduire les différentes espèces oxygénées réactives (EOR) de type peroxyde telles que l'H₂O₂, les phospholipides peroxydés ... (Pfeifer et al., 2001).

Il a été proposé que ce variant de GPx4 agisse comme une protamine thiol peroxydase responsable de la stabilisation de la chromatine par l'établissement de ponts disulfures entre les protamines (Pfeifer et al., 2001). Pour son activité, l'isoforme SNGPx4 ne dépendrait pas de la disponibilité du glutathion (GSH), qui diminue significativement pendant la spermatogénèse et la maturation précoce durant le transit épидидymaire. De plus, chez des animaux déficients en sélénium, les spermatozoïdes possèdent des noyaux moins compactés confirmant l'importance de cette molécule pour SNGPx4 (Boitani and Puglisi, 2009 ; Flohé, 2007 ; Sánchez-Gutiérrez et al., 2008 ; Shalini and Bansal, 2008). Par ailleurs, des expériences *in vitro* ont montré que le dithiothréitol provoque la décondensation de l'ADN des spermatozoïdes, la condensation étant rétablie par l'ajout d'H₂O₂ (Noblanc et al., 2012 ; Pfeifer et al., 2001). Ensemble, ces données soutiennent fortement l'idée que le variant GPx4 localisé dans le noyau des spermatozoïdes est

responsable du pontage disulfure des protamines en utilisant différents EOR présents dans l'environnement spermatique (Noblauc et al., 2012).

En plus de la compaction effectuée par pontages disulfures entre les protamines et notamment entre les PRM 1, il existe l'établissement de liaisons de type doigts de zinc entre 2 histidines et 2 cystéines des PRM 2 (Björndahl and Kvist, 2010). Sans faire le lien avec la nécessité du zinc dans la compaction du noyau spermatique, il a été montré des corrélations entre faible concentration en zinc dans le tractus génital mâle et infertilité masculine (faible concentration de spermatozoïdes ; Ebisch et al., 2007). Cependant, le rôle du zinc reste encore à confirmer par de plus amples études.

4. La protection des spermatozoïdes

L'épididyme doit également assurer la protection des spermatozoïdes en contexte infectieux (infections rétrogrades du tractus génital mâle). Cependant, la réponse mise en place contre le pathogène doit être contrôlée pour ne pas se révéler délétère pour le gamète. En effet, les spermatozoïdes sont produits à la puberté, bien après l'établissement du répertoire du soi qui garde en mémoire les composés propres de l'individu et les protège de toute réponse auto-immune (pour revue voir Hedger, 2011). L'un des éléments majeurs de la protection des gamètes est l'organisation même du tissu épидидymaire, dans lequel la présence d'une barrière épithéliale permet de séparer physiquement les gamètes du compartiment sanguin et de créer un microenvironnement optimal pour leur développement et leur maturation. Cependant, la barrière hémato-épididymaire n'est pas aussi efficace que la barrière hémato-testiculaire d'un point de vue immunologique (Mital et al., 2011). De ce fait, l'épididyme possède des molécules qui interviennent dans la réponse immunitaire non spécifique, et qui présentent des activités antibactériennes, antivirales et anti-inflammatoires. En effet, de nombreuses protéines secrétées par l'épithélium épидидymaire ont des actions antibactériennes comme par exemple HE2/EP2 ou hCAp-18 (Dacheux et al., 2003). Ces protéines peuvent également intervenir dans la liaison à la zone pellucide (Doussau et al., 2008). Pendant le stockage dans la queue d'épididyme, les spermatozoïdes sont soumis à différentes agressions. Cette région possède une température et une pression partielle en oxygène inférieures à celles présentes dans la tête de l'épididyme. Ces caractéristiques permettent ainsi de préserver les spermatozoïdes d'une réaction acrosomique précoce (Cooper, 1998).

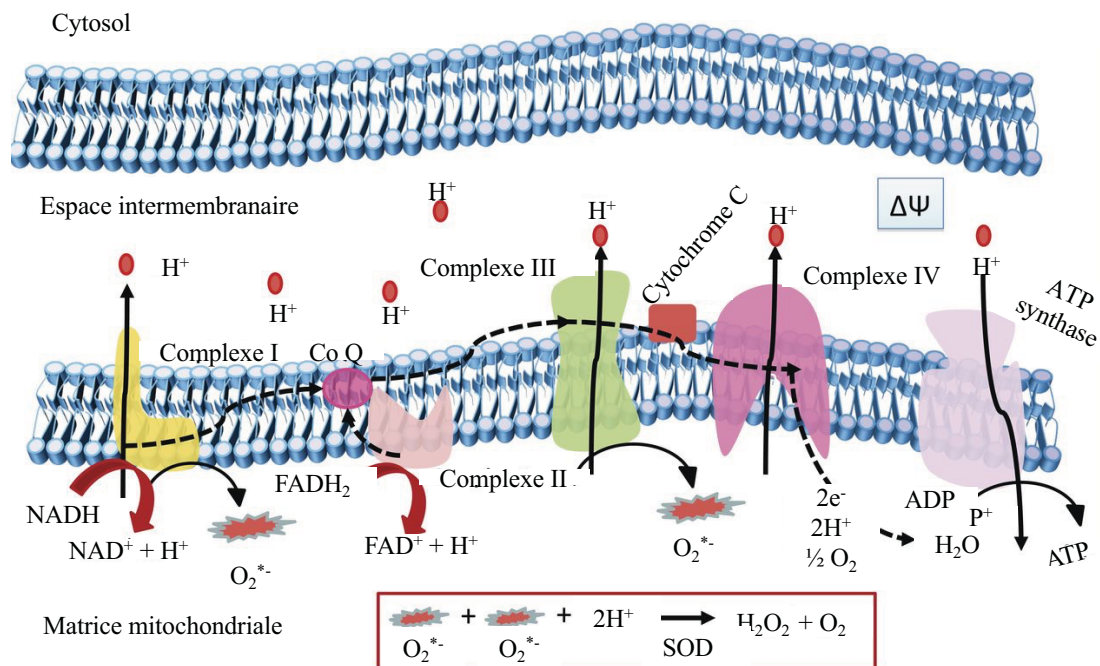


Figure 30 : La respiration cellulaire : production d'espèces oxygénées réactives.

La respiration est un processus clé de toute cellule aérobie qui a lieu dans l'organe mitochondriale d'une cellule. L'oxygène permet d'apporter des électrons aux différents complexes de la membrane interne mitochondriale. L'oxygène (ou O₂) est transformé en O₂⁻, qui sera lui transformé par la superoxyde dismutase (ou SOD) en oxygène et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), seule molécule capable de traverser la membrane. L'H₂O₂ est une molécule apparentée aux espèces oxygénées réactives qui sont des molécules réactives et de signalisation.

(Modifiée d'après *Agrawal and Mabalirajan, 2016*).

Durant le transit épидидymaire, les spermatozoïdes qui sont des cellules quiescentes, sont également exposés à différents types d'agressions. Les plus connues et les plus étudiées sont celles provoquées par les espèces oxygénées réactives (ou EOR) pourtant nécessaires à une maturation optimale. Les systèmes mis en jeu pour la protection des spermatozoïdes vis-à-vis du stress oxydant seront détaillés par la suite.

b. Les EOR et leurs effets sur le spermatozoïde

Comme nous venons de le voir, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est nécessaire pour établir une compaction accrue du noyau spermatique *via* l'intervention notamment de SNGPx4. Le peroxyde d'hydrogène est une molécule dérivée de l'oxygène et apparentée aux EOR. Ces dernières sont des molécules neutres, des ions ou des radicaux, issues du métabolisme aérobie des cellules, composées d'oxygène et comportant soit des électrons non appariés dans la couche de valence, soit une liaison instable entre deux atomes, ce qui les rend relativement réactives et leur confère un pouvoir oxydant.

Les EOR sont donc des molécules qui, pour la plupart, sont très réactives avec les différents composants cellulaires (lipides, protéines, acides nucléiques). Elles jouent également des rôles physiologiques indispensables au dialogue intercellulaire, à la protection immunitaire, au maintien de l'homéostasie en dioxygène, à la régulation de l'apoptose... (Zhang et al., 2016). Selon leur réactivité et leur capacité à traverser ou non les membranes biologiques, elles peuvent agir à plus ou moins grande distance de leur lieu de synthèse dans différents processus biologiques. Les EOR sont donc des molécules de voies de signalisation. Au niveau spermatique, elles interviennent notamment dans deux réactions clés, indispensables à la fécondation : la capacitation et la réaction acrosomique dans les voies génitales femelles (Lamirande and O'Flaherty, 2012 ; de Lamirande and O'Flaherty, 2008).

Le principal producteur d'EOR au niveau spermatique est la mitochondrie, présente en plusieurs exemplaires dans la pièce intermédiaire. En effet, la mitochondrie est le siège de la respiration aérobie cellulaire, et permet notamment la création de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) dont va dériver l' H_2O_2 par l'action de la superoxyde dismutase (ou SOD ; figure 30).

De plus, les EOR peuvent également être produites en excès, lors du vieillissement, d'une exposition de l'organisme à différents stress exogènes et endogènes comme les radiations, les variations de température, les médicaments, le tabagisme, les infections, les maladies d'origine métabolique... (Sabeti et al., 2016).

En cas de forte concentration et étant donné leur réactivité les EOR réagissent avec les différents éléments cellulaires, bien avant d'être éliminées ou d'avoir atteint leurs cibles physiologiques. Des cascades de réactions chimiques se produisent alors, entraînant de nombreux dommages aux différents composants cellulaires (lipides, protéines et acides nucléiques) suivis d'une mort cellulaire.

1. L'oxydation des protéines

Les EOR peuvent endommager les protéines et les rendre moins actives, voire non fonctionnelles, par différentes réactions entraînant une modification de leur conformation spatiale (en générant des liaisons entre les chaînes peptidiques ou bien en les déstructurant) et de leurs propriétés physico-chimiques.

Les chaînes latérales de tous les acides aminés peuvent réagir avec les EOR, bien que celles contenant un cycle aromatique (phénylalanine, tryptophane, tyrosine), du soufre (cystéine, méthionine) ou du sélénium (sélénocystéine) soient plus susceptibles de réaliser ce type de réactions.

2. La peroxydation lipidique

Les EOR réagissent avec les lipides, notamment avec ceux présentant des doubles liaisons ou insaturations tels que les acides gras polyinsaturés libres, associés à des lipoprotéines ou sous forme de phospholipides, et les stérols.

Les spermatozoïdes qui ont une membrane enrichie en acides gras polyinsaturés et en stérols après leur maturation durant le trajet dans l'épididyme, sont particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique. Elle provoque une augmentation de la rigidité de la membrane plasmique spermatique, une perte de la fluidité membranaire et donc une baisse de la mobilité du spermatozoïde (Aitken and Clarkson, 1987). Le traitement de spermatozoïdes humains par des molécules et enzymes augmentant la concentration en EOR dans le milieu d'incubation, entraîne une augmentation de la peroxydation lipidique et une perte de leur mobilité (Gomez et al., 1998). La présence d'un des dérivés de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde, est corrélée négativement avec les paramètres spermatiques (mobilité, morphologie du spermatozoïde ; Benedetti et al., 2012 ; Dorostghoal et al., 2017).

Associés avec les dommages aux protéines, ceci peut générer une perte de fonction des protéines membranaires (enzymes, récepteurs) et gravement altérer les processus

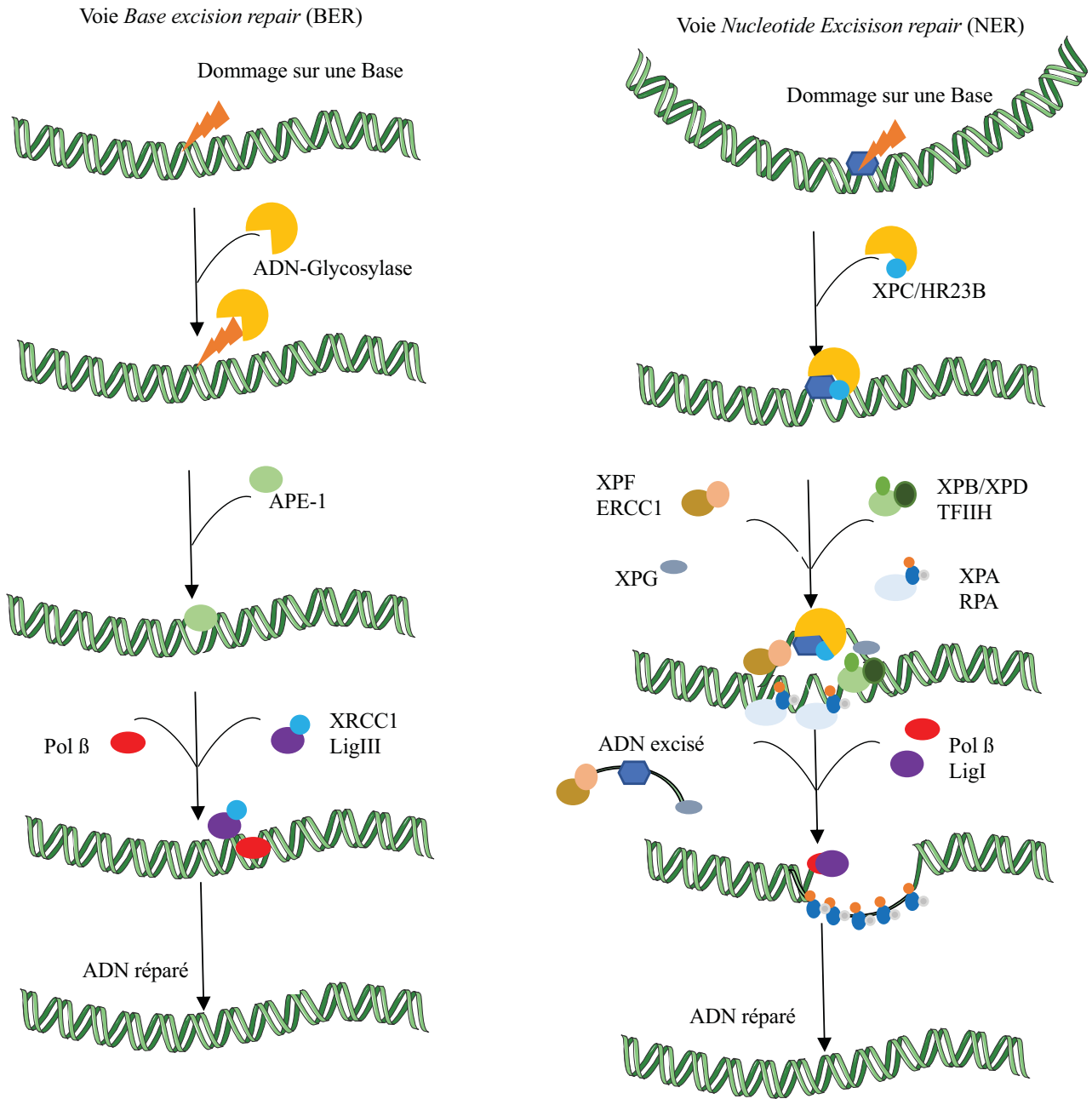


Figure 31 : Les deux voies de réparation de l'ADN BER (*base excision repair*) et NER (*nucleotide excision repair*).

La voie de réparation BER s'initie par une activité glycosylase suivie par une coupure du brin d'ADN par APE-1 formant ainsi un site abasique. La coupure et l'incorporation de nucléotides sont accomplies par la polymérase Pol β . La coupure en résultant est liée par le complexe XRCC1 et LigIII sur APE1 et Pol β . La voie NER fait intervenir plus d'acteurs que la voie BER et induit une cassure d'ADN plus importante. (Modifiée d'après *Emil Mladenov and George Iliakis, 2011*).

indispensables pour la reconnaissance gamétique ou la fécondation tels que la capacitation, la réaction acrosomique et la fusion gamétique (Aitken et al., 1989 ; Tsunoda et al., 2012).

3. L'oxydation des acides nucléiques

Au niveau de l'ADN, les bases azotées peuvent être la cible de l'oxydation. Des liaisons covalentes inter- et intra-brins ainsi qu'avec les protéines chromatiniennes, peuvent être mises en place et des cassures de l'ADN (simple et double brins) peuvent survenir (Jena, 2012). Les EOR peuvent réagir avec toutes les bases (A, T, G, C) bien que la guanine soit leur cible privilégiée du fait de son plus faible potentiel d'oxydoréduction (plus fort pouvoir réducteur). Le produit le plus fréquent de l'oxydation de la guanine est le 7,8-dihydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine (ou 8-OHdG), même s'il existe d'autres formes de guanine oxydée (pour revue voir Kino et al., 2017).

Dans les cellules somatiques, ces différentes lésions de l'ADN, que ce soient des bases modifiées (oxydation, site abasique), de la fragmentation ou des liaisons covalentes anormales, peuvent entraîner une modification de la conformation du filament d'ADN et bloquer les processus de réplication et de transcription. Ces dommages sont potentiellement néfastes pour la cellule et seront donc réparés rapidement par différentes voies selon le type de lésion.

4. Le processus de réparation des dommages à l'ADN

De façon générale, les lésions simples ne touchant qu'une seule base modifiée (telle que le 8-OHdG ...) sont réparées par les protéines de la voie BER (*Base Excision Repair*) ou MR (*Mismatch Repair*) tandis que les lésions plus encombrantes comme les liaisons covalentes entre bases, sont prises en charge par les protéines de la voie NER (*Nucleotide Excision Repair*) qui remplacent un plus long morceau du brin endommagé (figure 31). La voie BER démarre par l'arrivée d'une ADN-glycosylase spécifique de la lésion, comme OGG1 (*oxoguanine glycosylase 1*) qui reconnaît le 8-OHdG (Smith et al., 2013), qui clive la liaison N-glycosidique entraînant l'apparition d'un site abasique. Par la suite, une endonculéase apurinique/apurimidique (*apurinic/apurimidic endonuclease 1* ou APE1) hydrolyse le phosphate en 5' du site induisant l'apparition d'une cassure de l'ADN. La dernière étape consiste en la réparation de la cassure par des ADN ligases et d'autres protéines dont XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing-1*). La voie NER intervient par un mécanisme similaire à celui de la voie BER mais avec une cassure de l'ADN plus longue (figure 31).

Cependant, ces processus de réparation peuvent parfois insérer des erreurs dans la séquence de nucléotides ou ne pas se poursuivre jusqu'au bout, entraînant la formation de sites abasiques ou de cassures de l'ADN. De plus, si toutes les erreurs ne sont pas détectées et réparées, lors du processus de réplication la lecture des bases modifiées sur le brin matrice peut entraîner l'insertion du mauvais nucléotide dans le brin complémentaire et donc de mutations qui peuvent être transmises à la descendance. En effet, dans le cas de la modification 8-OHdG, son appariement avec la cytosine est reconnu comme un mésappariement, alors que l'association avec l'adénine ne l'est pas. Ainsi l'oxydation de la guanine conduit à une conversion fréquente en thymine dans la séquence de l'ADN (Jena, 2012 ; Melis et al., 2013).

Dans le cas des spermatozoïdes, l'ensemble des dommages à l'ADN spermatique ne peut pas être réparé par le spermatozoïde lui-même car son ADN très compacté est inaccessible et l'ensemble de la machinerie cellulaire a été réduite à son minimum lors de la spermiation. C'est uniquement lors de la fécondation que l'ovocyte prendra en charge la réparation des dommages de l'ADN spermatique. Si ces dommages sont trop importants ou que l'ovocyte possède lui-même des défauts à réparer, nous observerons un arrêt du développement embryonnaire ou la transmission de mutations à la descendance (Ohno et al., 2014). En effet, le zygote répare les dommages à l'ADN, notamment par la voie de réparation BER, par un processus non apoptotique qui agit en ralentissant la réplication de l'ADN et la déméthylation du *pronucleus* mâle (*cf.* § III.C.a.1. déméthylation du génome), ce qui induit un délai dans le développement embryonnaire (Fernández-Gonzalez et al., 2008 ; Gawecka et al., 2013 ; Marchetti et al., 2015).

5. L'équilibre oxydant

Afin de se prémunir contre ces dommages oxydants au niveau épидидymaire, il existe donc un équilibre subtil entre la production des EOR et leur élimination par le système antioxydant créé par l'épididyme pour protéger le spermatozoïde. Le système antioxydant peut être décomposé en deux sous-groupes faisant intervenir soit des molécules comme les vitamines, le sélénium et le zinc soit des enzymes antioxydantes de la voie de dégradation des EOR, comme la SOD, la catalase, les peroxyrédoxines et d'autres membres de la famille des glutathiones peroxydases, tels que GPx1, GPx3 ou GPx5 (Drevet, 2006 ; Toppo et al., 2009 ; figure 32). Ces trois *Gpx* sont exprimées dans de nombreux tissus de l'organisme dont l'épididyme et *Gpx5* est fortement exprimée dans cet organe. La protéine GPx5 est une protéine dimérique, glycosylée et sécrétée. L'expression du gène *Gpx5* dans l'épididyme est sous le

contrôle des androgènes et de facteurs testiculaires (Drevet et al., 1998 ; Kolasa et al., 2008). Chez la souris, ce gène comporte 5 exons et 4 introns. La protéine produite au niveau de la tête de l'épididyme est sécrétée dans le fluide épидидymaire au contact des spermatozoïdes. Une partie de GPx5 va s'associer à la membrane plasmique de la tête des spermatozoïdes, tandis qu'une autre partie restera circulante sous forme libre ou associée à des vésicules lipidiques et ceci jusque dans le tractus génital femelle (Rejraji et al., 2002). La fonction de Gpx5 dans l'élimination des EOR (et notamment de l'H₂O₂) a été montrée *in vitro* et *in vivo* (Chabory et al., 2009 ; Vernet et al., 1996).

Afin d'étudier l'impact du stress oxydant, c'est-à-dire un déséquilibre entre la production et l'élimination des EOR par le système antioxydant, sur l'intégrité du noyau spermatique et la fertilité, des modèles murins invalidés pour différentes enzymes antioxydantes ont été générés.

6. L'étude du stress oxydant sur l'intégrité du spermatozoïde

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le spermatozoïde subi une maturation lors du transit épидидymaire et notamment une compaction du noyau par l'établissement de ponts disulfures entre les groupements thiols portés par les cystéines des protamines. L'établissement de ces ponts disulfures nécessite l'utilisation des EOR (Seligman et al., 1994 ; Shalgi et al., 1989). Cette mise en place se fait de manière spontanée ou par l'intervention d'enzymes de type disulfide isomérase localisées dans le noyau spermatique (Shalgi et al., 1989). Parmi ces enzymes, nous pouvons retrouver certaines glutathiones peroxydases ou des peroxyrédoxines... Une dérégulation de l'équilibre des EOR au sein de l'épididyme peut conduire à de nombreux défauts au niveau spermatique (peroxydation lipidique, compaction nucléaire altérée ...) et l'étude de modèles murins invalidés pour des enzymes antioxydantes a permis de montrer l'impact du stress oxydant sur l'intégrité du spermatozoïde.

Une invalidation constitutive de *Gpx1* ou *Gpx3* n'engendre aucun phénotype d'infertilité. L'invalidation constitutive de l'isoforme de la *Gpx4*, spécifique du noyau, *Sngpx4*, chez la souris a été réalisée par l'insertion du gène eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) au sein de l'exon alternatif, pour ne pas modifier l'expression des isoformes cytosolique et mitochondriale (Conrad et al., 2005) ; ces souris sont viables et ne présentent aucun phénotype d'infertilité. Néanmoins, ces souris présentent un retard de condensation de la chromatine des spermatozoïdes et une décondensation plus rapide de cette chromatine, suite à un traitement de

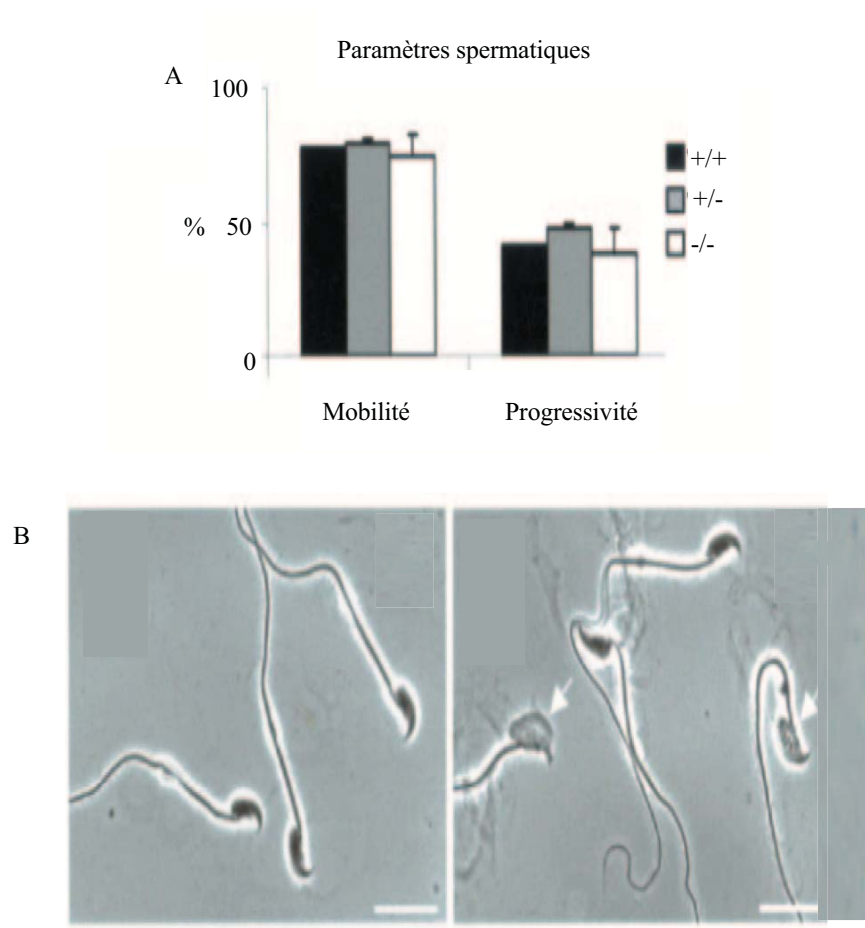


Figure 33 : Phénotype des souris invalidées pour *Sngpx4*.

Les spermatozoïdes des souris invalidées pour *Sngpx4* ne présentent pas de différence de mobilité (A). Observation d'une morphologie aberrante des noyaux spermatiques chez les souris *Sngpx4*^{-/-}, comparé aux souris sauvages (WT ; B).

(D'après Conrad *et al.*, 2005).

décondensation comparées à des souris sauvages (Conrad et al., 2005 ; Puglisi et al., 2012 ; figure 33). De plus, Puglisi a montré récemment que le croisement de souris mâles *Sngpx4*^{-/-} avec des souris femelles sauvages induit moins de gestations et des portées de tailles moins importantes (Puglisi et al., 2012). Des expériences de FIV ont montré une diminution de 70% du pourcentage de zygotes obtenus par insémination d'ovocytes sauvages par des spermatozoïdes *Sngpx4*^{-/-} ayant subi la capacitation, comparé à celle effectuées par des spermatozoïdes sauvages. Les tests de liaison et de fusion à la membrane plasmique de l'ovocyte sauvage ne montrent aucune différence entre les spermatozoïdes *Sngpx4*^{-/-} et sauvages. Les auteurs en déduisent que cette infertilité des souris mâles *Sngpx4*^{-/-} serait due à une incapacité des spermatozoïdes à traverser la zone pellucide entourant l'ovocyte (Pipolo et al., 2017). Enfin, ces souris présentent des niveaux élevés d'oxydation et de fragmentation de l'ADN et une sensibilité plus importante à la décondensation de la chromatine spermatique (Noblanc et al., 2012).

Comme pour l'inactivation de *Sngpx4*, celle de la peroxyrédoxine *Prdx6*, conduit à une baisse de la mobilité des spermatozoïdes et à une augmentation des niveaux de groupements thiols libres portés par les cystéines des protamines donc à une absence de ponts disulfures entre les protamines induisant une décondensation du noyau spermatique (Ozkosem et al., 2015). En effet, les peroxyrédoxines (PRDX) du fait de leur activité réductrice des peroxydes tels que l'H₂O₂, peuvent établir des ponts disulfures entre des protéines. De plus, les peroxyrédoxines comme PRDX6, font partie des enzymes antioxydantes retrouvées dans l'épididyme et le spermatozoïde. Elles protègent donc le génome paternel des dommages oxydants à l'ADN (O'Flaherty and de Souza, 2011). L'inactivation de *Prdx6* chez la souris conduit, avec l'âge, à une diminution de la mobilité et de la compaction de la chromatine des spermatozoïdes et à une augmentation des dommages à l'ADN (fragmentation et oxydation) dus à une augmentation du stress oxydant (Ozkosem et al., 2015). Chez l'homme, une faible quantité de PRDX1 et 6 conduit à un phénotype spermatique similaire à celui de la souris *Gpx5*^{-/-}, associé à une infertilité mâle (Gong et al., 2012). Il semblerait donc que PRDX chez l'homme joue le rôle assuré par GPx5 chez la souris. Que ce soit *via* GPx5 ou *via* les PRDX, il est clair que les enzymes antioxydantes luminales de l'épididyme et du spermatozoïde participent à l'équilibre redox post-testiculaire important pour la maturation structurelle et fonctionnelle des gamètes mâles.

De la même façon, l'inactivation de la *Catalase* ou de la *SOD* conduit à des infertilités liées à l'âge chez les souris (Selvaratnam and Robaire, 2016). Chez les souris *Sod*^{-/-}, nous

observons une augmentation des dommages à l'ADN (marquage γ H2A.X, signe de cassures à l'ADN) et de l'oxydation de l'ADN (8-OHdG) avec une réduction de l'activité antioxydante et notamment de la PRDX1. En revanche, les souris *Cat*^{-/-} ne présentent pas de baisse de l'activité antioxydante, due à une compensation par l'augmentation de Prdx1, ni de présence d'oxydation de l'ADN (Selvaratnam and Robaire, 2016). Il n'existe aucun modèle d'inactivation de la *Prdx1*.

Outre des modèles d'inactivation des acteurs du système antioxydant, des études utilisent des spermatozoïdes oxydés artificiellement pour étudier l'impact des dommages oxydants sur la descendance. Les auteurs montrent une dérégulation du métabolisme lipidique, du glucose et de la croissance dans la descendance femelle (Lane et al., 2014). L'induction de dommages oxydants à l'ADN de spermatozoïdes de macaques Rhésus conduit à une importante fragmentation de l'ADN et à un arrêt du développement avant le stade embryonnaire 8 cellules (Burrue et al., 2013). Dans de récentes études, il est montré que les dommages à l'ADN dans le spermatozoïde murin (modifications de nucléotides ou cassures simples et doubles brins), induits par des radiations conduisent à des mutations *de novo* plus importantes que chez les souris sauvages et ce type d'altérations est associé avec des syndromes d'autisme chez l'homme (Adewoye et al., 2015 ; Feinberg et al., 2015 ; Malaspina et al., 2015).

7. Le stress oxydant et l'infertilité masculine

De même que chez les nombreuses espèces décrites précédemment, les EOR sont délétères pour le spermatozoïde humain. En effet, la présence d'un stress oxydant chez l'homme conduit entre autres, à une fragmentation de l'ADN spermatique et à une peroxydation lipidique et est corrélée à des infertilités masculines (pour revue voir Bisht and Dada, 2017).

Le stress oxydant présent chez ces hommes a de nombreuses origines comme nous l'avons déjà évoqué (*cf.* § II.C.b. Les EOR et leurs effets sur le spermatozoïde ; Lewis et al., 2013). Par exemple, des hommes ayant une leucocytospermie, c'est-à-dire un excès de leucocytes dans le liquide séminal (Haidl et al., 2008 ; Kullisaar et al., 2008), présentant un excès d'EOR dans l'environnement spermatique et des dommages spermatiques entraînant une baisse de la mobilité des gamètes (Plante et al., 1994).

Par ailleurs, l'utilisation de procédures de PMA (FIV, ICSI) est rapportée pour engendrer des EOR et sont donc délétères pour les spermatozoïdes (pour revues voir Agarwal et al., 2006 ; Aitken, 2016 ; Gharagozloo and Aitken, 2011 ; Rappa et al., 2016). La cryoconservation des spermatozoïdes, l'exposition aux milieux de culture ou la manipulation des spermatozoïdes au

cours des processus de sélection, en particulier pour l'ICSI, sont générateurs d'EOR (Alvarez and Storey, 1992 ; Goto et al., 1993 ; Shekarriz et al., 1995). De plus, la cryconservation/décongélation des spermatozoïdes est montrée pour induire une peroxydation lipidique de la membrane spermatique (Alvarez and Storey, 1992).

Néanmoins, les dommages spermatiques causés par les EOR sont difficiles à démontrer suite à une procédure de PMA (Agarwal et al., 2003) et bien que l'ovocyte puisse réparer, dans une certaine mesure, ces dommages paternels, lui-même est endommagé lors de ces procédures (Agarwal et al., 2012 ; Attaran et al., 2000). De plus, les taux d'EOR ne sont pas mesurés lors de ces pratiques et cela pourrait expliquer le faible taux de réussite (Pinborg et al., 2009 ; Troude et al., 2016). Il serait donc intéressant de développer des systèmes de « contrôle » des dommages oxydants au niveau spermatique, lors de ces approches, comme c'est le cas pour la mobilité ou la morphologie ou d'atténuer le niveau d'EOR engendré.

Une fois dans la queue d'épididyme, le spermatozoïde est totalement mature d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Il est mobile et possède une chromatine hautement compactée afin de protéger le génome haploïde paternel qu'il va transmettre au futur embryon après la fécondation dans les voies génitales femelles. Hormis la transmission du patrimoine génétique paternel, le spermatozoïde transmet également une information épigénétique qui influence le développement embryonnaire.

III. L'épigénome du spermatozoïde

L'épigénome regroupe toutes les modifications de la chromatine (méthylation d'ADN, histones, et leurs modifications post-traductionnelles) et les ARN non codants qui ne changent pas la séquence d'ADN mais influencent l'expression des gènes. L'épigénome a la particularité de pouvoir intégrer des signaux provenant de l'environnement, donnant aux organismes un moyen de réagir et de s'adapter aux changements (Waterland et al., 2006 ; Weaver et al., 2004).

A. La méthylation de l'ADN

a. Généralités

La méthylation de l'ADN est l'ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) sur le cinquième carbone de la cytosine (5-méthylcytosine ; 5mC). Chez les Mammifères, les CpG isolés sont généralement hyperméthylés (60 à 90%, en fonction du type cellulaire) tandis que les îlots CpG

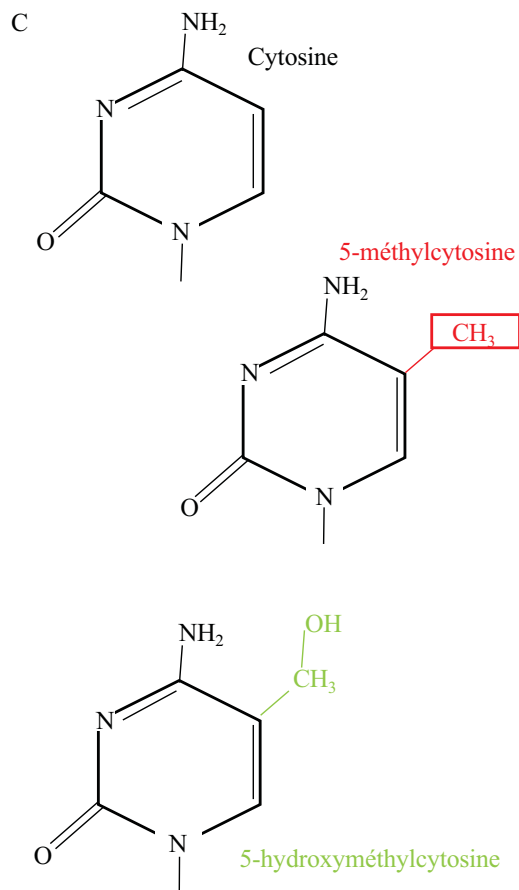
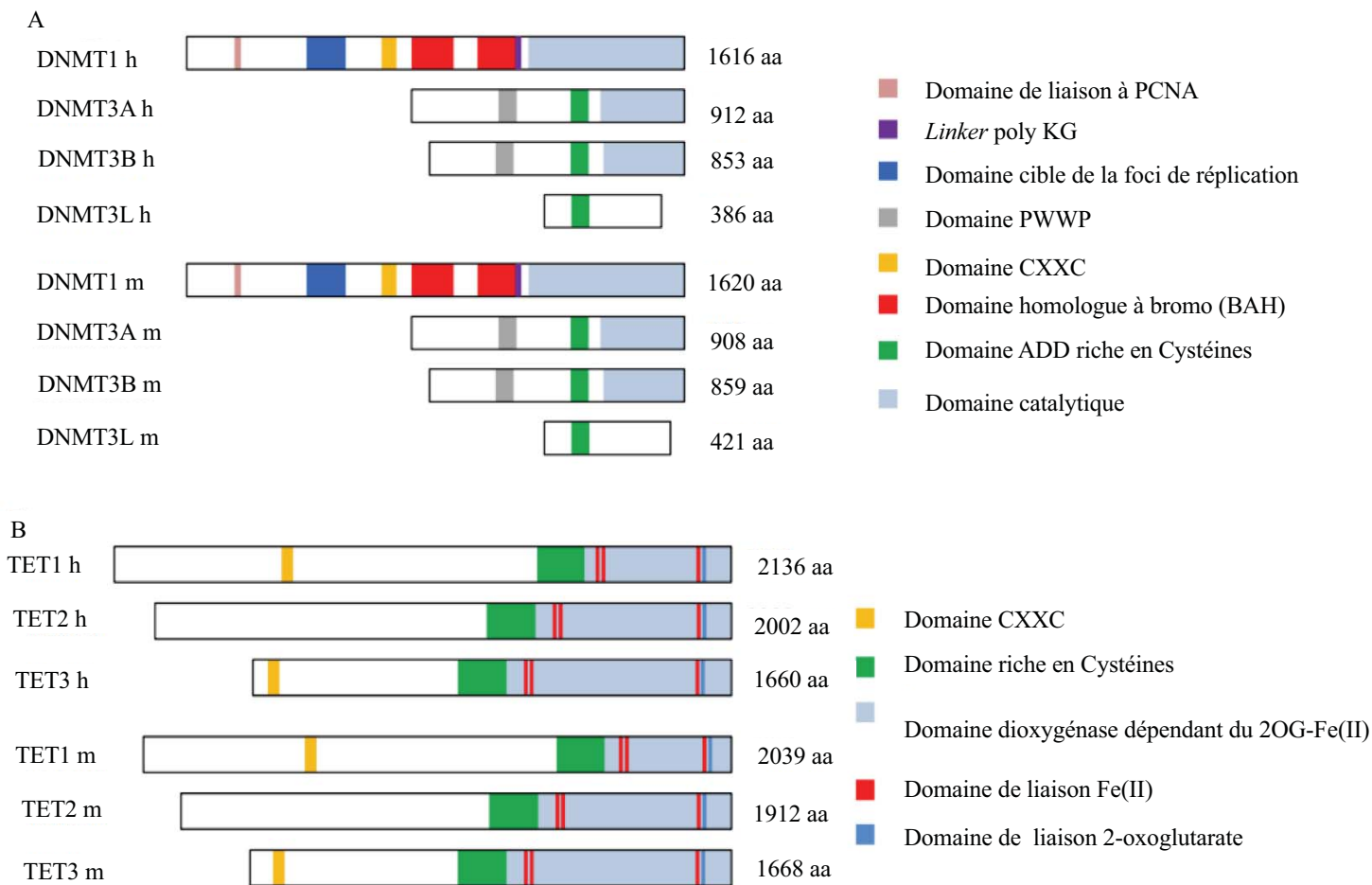


Figure 34 : Structure des enzymes DNMT et TET des Mammifères.

(A) DNMT partage un domaine catalytique C-terminale, exceptée pour DNMT3L qui ne contient pas de domaine catalytique. La région N-terminale de DNMT1 contient un domaine d'interaction avec PCNA, la fourche de réplication et l'ADN non méthylé. DNMT1 contient deux domaines BAH. DNMT 3A et 3B B comprennent un domaine PWWP qui reconnaît la marque H3K36me et un domaine ADD qui permet l'interaction avec l'histone H3 sur la lysine 4.

h : humain, m : souris, aa : acides aminés, DNMT : *DNA methyltransferases*, TET : *Ten Eleven Translocation*

(B) Les protéines TET contiennent un domaine riche en cystéines dans le C-terminale adjacent au domaine DSBH typique des dioxygénases dépendante du Fe(II) et 2-oxoglutarate. TET1 et TET3 contiennent également un domaine CXXC. La taille des protéines est identique par le nombre d'acides aminés.

(C) Structure chimique de la cytosine (C), de la 5-méthylcytosine (5mC) et de la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). La méthylation (groupement -CH₃) se positionne sur le carbone 5 de la cytosine pour donner le 5mC et l'oxydation de ce groupement méthyle conduit à la 5hmC.

(Modifiée d'après Bhutanie *et al.*, 2011).

qui sont des longues régions de 500 à 2000 pb avec une haute densité en CG, restent hypométhylés (Deaton and Bird, 2011). La méthylation de l'ADN permet d'organiser la chromatine (frontière euchromatine-hétérochromatine) et de réguler la transcription de gènes car elle touche de nombreux promoteurs (Jones, 2012). En effet, la méthylation de l'ADN a un rôle de répresseur transcriptionnel en agissant par encombrement stérique du grand sillon de l'hélice d'ADN et en inhibant le recrutement des facteurs de transcription (Iguchi-Ariga and Schaffner, 1989 ; Prendergast and Ziff, 1991). Elles peuvent également agir indirectement par le recrutement de complexes protéiques qui reconnaissent et se fixent sur la 5mC (Nan et al., 1998 ; Sasai and Defossez, 2009). Quoique réversible, la méthylation de l'ADN est une marque épigénétique stable qui joue le rôle de verrou transcriptionnel. C'est au niveau des séquences répétées (rétrotransposons *LINE* et *SINE*, régions péri-centomériques), qui représentent près de la moitié du génome, que nous trouvons essentiellement la méthylation de l'ADN (Yoder et al., 1997).

La méthylation est mise en place par des ADN méthyltransférases qui catalysent le transfert d'un groupement méthyle de la S-adénosyl-1-méthionine sur la position cinq du carbone de la cytosine (5mC ; Chen and Li, 2004). Il existe deux catégories d'ADN méthyltransférases en fonction de leur activité de méthylation *de novo* ou de maintenance (figure 34 ; Holliday and Pugh, 1975 ; Riggs, 1975). La première enzyme avec une activité d'ADN méthyltransférase, intervenant dans la méthylation dite de maintenance, est DNMT1 (Bestor, 1988). Elle restaure une méthylation complète sur les deux brins à partir du CpG hémiméthylé (Arand et al., 2012 ; Leonhardt et al., 1992). La perte de *Dnmt1* dans les cellules souches embryonnaires murines (mESC) provoque une dramatique hypométhylation de l'ADN mais incomplète, conduisant donc à s'interroger sur la présence d'autres protéines à activité d'ADN méthyltransférase.

Deux enzymes, DNMT3A et 3B, ont ainsi été identifiées (Okano et al., 1999), intervenant dans la méthylation dite *de novo*. Elles interviennent notamment dans l'établissement d'une méthylation différentielle entre les gamètes mâles et femelles, appelée empreinte parentale, sur certaines régions génomiques. Cette dernière permet d'établir une expression transcriptionnelle mono-allélique dépendante de l'origine de la méthylation. Les gènes concernés sont souvent organisés en *cluster*, un ensemble de gènes dont la transcription est soumise à l'état de méthylation d'une voire deux régions différenciellement méthylées (DMR ou *differentially-methylated region*) selon leur origine parentale. Cette méthylation est

à l'origine du recrutement ou de la répulsion de différents facteurs modifiant les histones ou isolant les gènes des régions régulatrices, comme par exemple l'insulateur protéique CTCF (*CCCTC-binding factor* ; Biliya and Bulla, 2010 ; Pant et al., 2003). Dans un même *cluster* soumis à cette méthylation, certains gènes peuvent être maternellement exprimés tandis que les gènes voisins seront paternellement exprimés. Les DMR maternellement méthylées sont généralement situées dans une région promotrice ou intronique de gènes comme *Kcnq1* (codant pour un canal potassium voltage dépendant) ou *Snrpn* (*small nuclear riboprotein* intervenant dans la fabrication des pré-ARNm) et les paternellement méthylées sont, elles, retrouvées dans des régions intergéniques de gènes tels que *Igf2/H19* (codant pour une hormone de croissance et un ARNnc, respectivement) ou *Rasgrf1* (codant pour un facteur d'échange de guanine ; figure 35 ; Kobayashi et al., 2009). Une troisième ADN méthyltransférase *de novo*, DNMTL3, existe. Elle ne possède pas de domaine amino-terminal (site catalytique) caractéristique mais néanmoins elle est un cofacteur d'activation crucial pour DNMT3A et 3B et est donc nécessaire pour la méthylation (Bourc'his and Bestor, 2004 ; Bourc'his et al., 2001 ; Chedin et al., 2002 ; Gowher et al., 2005a, 2005b ; Jia et al., 2007).

Récemment, il a été découvert une nouvelle ADN méthyltransférase *de novo*, qui a évolué *via* une duplication du gène *Dnmt3b* chez les rongeurs, *Dnmt3c*. Cette enzyme est responsable de la méthylation des promoteurs des rétrotransposons au sein des cellules germinales et elle est indispensable pour la fertilité des souris (Barau et al., 2016 ; Jain et al., 2017). En effet, des souris mâles mutantes pour ce gène, présentent une méthylation anormale des séquences des rétrotransposons *LINE* et *LTR* dans la lignée germinale et accumulent des taux plus élevés de transcrits et de protéines dérivées des transposons (Jain et al., 2017).

b. La méthylation de l'ADN spermatique

Chez la souris, pendant la formation et la migration des précurseurs des cellules germinales ou PGC (*primordial germ cells*), à 11,5-13,5 jours *post-coitum* (*dpc*), la méthylation de l'ADN est partiellement effacée jusqu'à ce qu'il ne reste que 10% des CpG totaux méthylés. En effet, l'effacement de la méthylation est requis car les PGC sont dérivées des cellules embryonnaires qui ont déjà acquis un devenir de cellules somatiques (Guibert et al., 2012 ; Hajkova et al., 2002 ; Seisenberger et al., 2012). L'effacement de la méthylation de l'ADN des CpG est un élément clé de la spécification des PGC, mais la dynamique et les mécanismes sous-jacents de ce processus restent incertains (Hackett et al., 2012). Néanmoins, des études récentes

montrent l'implication de la conversion de la 5mC en 5hmC (5-hydroxyméthylcytosine) dans le processus de déméthylation de l'ADN. Cette conversion implique des enzymes appelées *ten-eleven translocation* (ou Tet ; Gan et al., 2013 ; Hackett et al., 2013 ; Tahiliani et al., 2009). La marque 5hmC sera elle-même oxydée par des Tet en 5fC (5-formylcytosine) et en 5caC (5-carboxycytosine ; He et al., 2011 ; Ito et al., 2011). Chez les Mammifères, la famille TET contient trois membres (TET 1 à 3) exprimés différemment selon le tissu et le stade de développement (Tahiliani et al., 2009). TET 1 et 2 sont présents dans les cellules souches embryonnaires (ES) et PGC (Hackett et al., 2012). Tandis que TET 3 est exprimée dans l'ovocyte, le spermatozoïde et dans l'embryon préimplantatoire (Gu et al., 2011 ; Iqbal et al., 2011 ; Tahiliani et al., 2009).

Chez la souris mâle, le processus de méthylation de l'ADN des cellules germinales débute entre 15,5 et 18,5 *dpc* et se poursuit après la naissance jusqu'au stade pachytène de la méiose sous l'action des ADN méthyltransférases *Dnmt3a*, *3b* et *3l*, lors de la spermatogenèse (La Salle and Trasler, 2006). Les gamètes ont leurs propres caractéristiques d'hyperméthylation. En effet, à la fin de la re-méthylation, 80 à 90%, des CpG sont méthylés dans le spermatozoïde mature, tandis que le génome maternel montre quant à lui de faibles niveaux de méthylation (40% ; Popp et al., 2010).

c. L'infertilité et la méthylation de l'ADN

Chez la souris, l'invalidation des ADN méthyltransférases *Dnmt3a* et *b* cause un arrêt en méiose des spermatogonies, une surexpression des éléments répétés type *LINE* et des *IAP* (*intracisternal A particles*) ainsi qu'une perte de spermatocytes par apoptose (Bourc'his and Bestor, 2004 ; Walsh et al., 1998). Les souris invalidées pour *Dnmt3l* sont viables, mais l'absence de méthylation *de novo* dans la lignée germinale induit une stérilité (Bourc'his and Bestor, 2004).

Des défauts de spermatogenèse ont été associés à une mise en place de l'empreinte parentale perturbée dans les cellules germinales et notamment des défauts de méthylation (Hartmann et al., 2006). De façon globale, chez les hommes infertiles, 14,4% des anomalies de méthylation de l'ADN se produisent sur le gène à empreinte parentale *Igf2/H19* et sur le gène *gene trap locus 2*. En effet, des patients oligozoospermiques présentent une faible méthylation de l'ADN ou une région génique à empreinte parentale *Igf2/H19* non-méthylée associées à une qualité spermatique réduite comparée aux hommes fertiles (Niemitz and Feinberg, 2004 ; Zama

and Uzumcu, 2010). De plus, une hypométhylation de l'ADN sur le gène à empreinte *Igf2/H19* conduit à une térazoospermie associée à une baisse du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité (Boissonnas et al., 2010).

D'autres profils anormaux de méthylation de l'ADN sur les régions à empreinte parentale comme le DMR *MEST* (*mesoderm specific transcript* ; Marques et al., 2008 ; Poplinski et al., 2010) sont associés à des oligozoospermies et à des oligoasthénotérazoospermies (Feuer et al., 2013 ; Katari et al., 2009 ; Owen and Segars, 2009). De plus, des défauts de méthylation de l'ADN sur des promoteurs de gènes impliqués dans la spermatogenèse comme *DAZL* (*Deleted in azoospermia like*) et *CREM* (*cAMP responsive element modulator*) sont rapportés chez des patients présentant une oligoasthénotérazoospermie (Nanassy and Carrell, 2011 ; Navarro-Costa et al., 2010).

Ces défauts de méthylation de l'ADN peuvent être dus à des erreurs lors de la méthylation des PGC ou à une altération de la méthylation de l'ADN dans les spermatocytes. Récemment, une étude a montré que chez des patients infertiles, le taux de 5hmC est supérieur à celui de patients fertiles et corrèle avec des défauts de morphologie du spermatozoïde ainsi qu'avec un indice de fragmentation de l'ADN élevé (Efimova et al., 2017). De plus, des patients présentant une globozoospermie ont une perte de la marque 5hmC sur des gènes comme *DNMT1* ou sur des gènes à empreinte parentale tels que *GRB10* ou *PLAGL1* (intervenant notamment dans la croissance cellulaire ; Wang et al., 2015).

B. Les acides ribonucléiques (ARNs)

a. Généralités

Il existe de nombreux ARN divisés en deux grandes catégories, les ARN codants ou messagers (ARNm) et les ARN non codants (ARNnc). Les ARNm sont transcrits à partir de l'ADN et traduits en protéines. Les ARNnc ne sont pas traduits en protéines et ont de nombreuses fonctions. Ils peuvent être subdivisés en deux groupes : les ARN de ménage et les ARN régulateurs.

1. Les ARN de ménage

Parmi ces ARNnc, nous retrouvons les ARN qui sont importants pour la traduction des ARNm, les ARN ribosomiaux (ARNr) qui ont une taille très variable de 120 à 5000 nucléotides (nt) et les ARN de transfert (ARNt) plus petits de 70 à 95 nt.

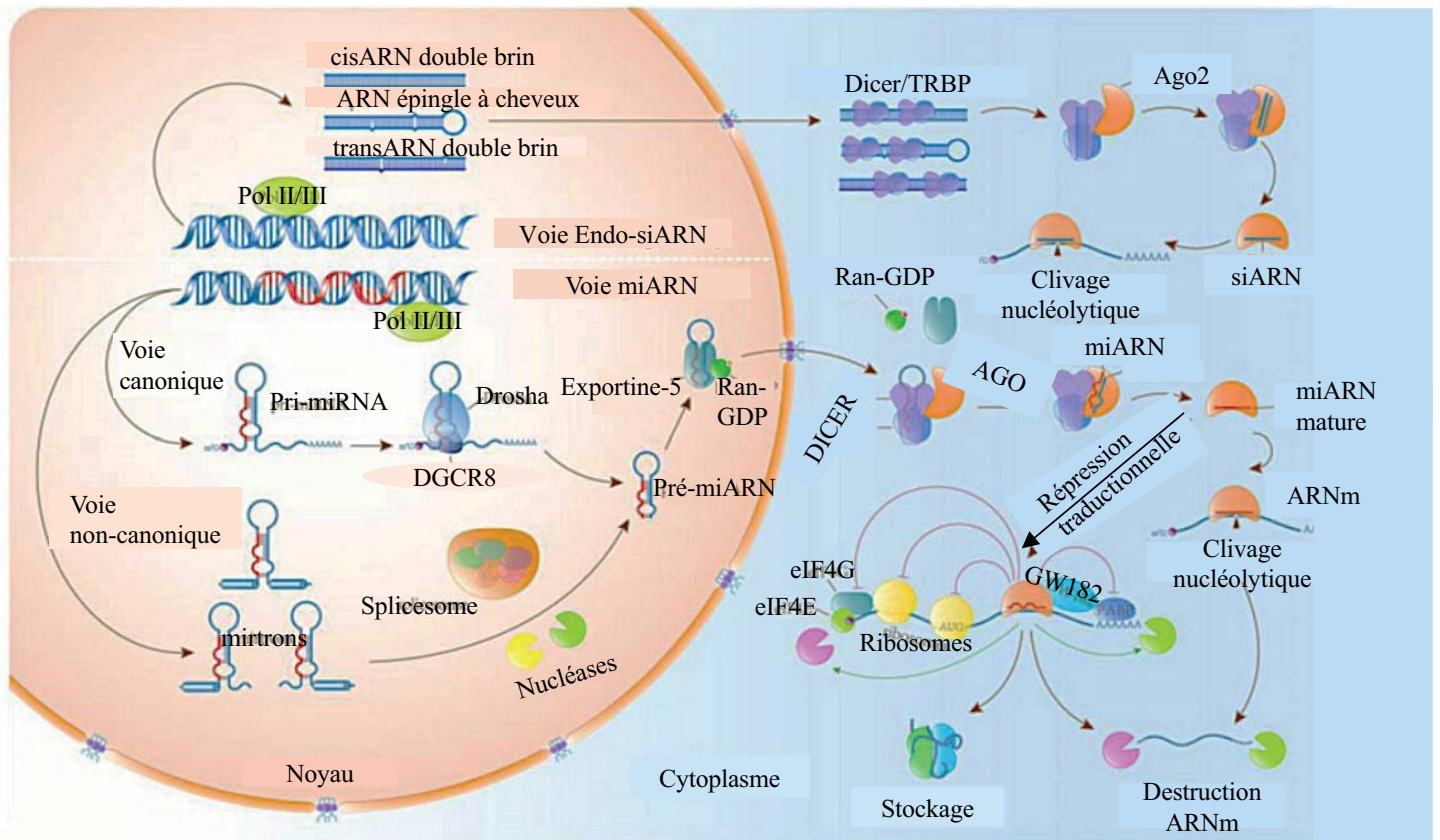


Figure 36 : Biogenèse des miARN/endo-siARN.

Les miARN sont transcrits par la polymérase II ou III (Pol II, III). Dans la voie canonique, les précurseurs primaires (pri-miARN) sont clivés par Drosha en pré-miARN avec l'aide de DCCR8. Dans la voie non canonique, "mirtrons" contenant les précurseurs miARN comme introns, sont produits en pré-miARN dans le *spliceosome* avec ou sans nucléases et indépendamment de Drosha/DCCR8. Les pré-miARN sont transportés par l'exportin5/Ran/GTP. Après avoir été libéré dans le cytoplasme, les pré-miARN sont coupés par Dicer/TRBP et ainsi chargés sur AGO. Durant cette étape seulement un brin du miARN reste avec AGO tandis que l'autre brin est abandonné. Chez les animaux, seuls les miARN montrent une complémentarité partielle avec leurs cibles et ainsi la fonction majeure de ces miARN est la répression de la traduction plutôt que le clivage nucléolytique.

(Modifiée d'après Luo *et al.*, 2016).

Plus tardivement, dans les années 1980 et 1990 furent décelés respectivement les snARN (*small nuclear RNA*) et les snoARN (*small nucleolar RNA* ; Morris et al., 2014). Les snARN de 150 nt interviennent plutôt dans l'épissage alternatif tandis que les snoARN sont impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles telles que la 2'-O-méthylation et la pseudo-uridylation des ARN pré-ribosomiaux (Kiss-László et al., 1996). Les snoARN sont contenus dans des introns, et après l'excision de ces introns, ils s'associent à des protéines spécifiques pour former des complexes ribonucléoprotéiques (Shi et al., 2017).

2. Les ARN régulateurs : différentes classes d'ARN non codants

Dans ce groupe nous rassemblons des ARN qui jouent principalement un rôle dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Ils sont disséminés dans le génome et coïncident souvent avec des gènes codant pour des protéines sur le même brin ou sur le brin anti-sens. Ils sont donc annotés selon leur sens dans le génome ainsi que selon leur taille (petits ARN < 200 nt et longs ARN >200 nt). Parmi eux, nous notons par exemple, les miARN et les endo-siARN de 21 à 24 nt qui interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle et les ARN interagissant avec les protéines PIWI (ou piARN).

La biogenèse des miARN requiert deux enzymes RNase III ainsi que DROSHA et DICER (Subramanyam and Blelloch, 2011 ; Yang and Lai, 2011). Drosha est responsable de la transformation des transcrits primaires de miARN (qui ont une longue taille) en précurseur de miARN sous forme de boucle (ou pré-miARN) dans le noyau. Par la suite le pré-miARN est exporté du noyau par une exportine 5. Tandis que Dicer coupe le pré-miARN en miARN matures (simples brins de 22 nt) dans le cytoplasme (figure 36). Les endo-siARN peuvent dériver du chevauchement de transcrits sens et antisens, de séquences répétées et de structures en épingle à cheveux (Malone and Hannon, 2009 ; Okamura and Lai, 2008). Comme pour les miARN, les endo-siARN requièrent Dicer et certaines protéines pour exercer leur activité (Okamura and Lai, 2008 ; Subramanyam and Blelloch, 2011 ; figure 35).

Il existe deux classes de piARN, les piARN pré-pachytènes et les piARN pachytènes dans les cellules germinales testiculaires. Ils ne sont pas générés durant les mêmes stades de développement dans le testicule et leur biogenèse n'est pas totalement la même. Les piARN interagissent avec les protéines de type PIWI et régulent la transposition.

Après leur passage dans le cytoplasme, les piARN subissent une transformation. Les longs précurseurs simple brins sont divisés en courts précurseurs, qui sont ensuite liés à des protéines comme MIWI ou MILI.

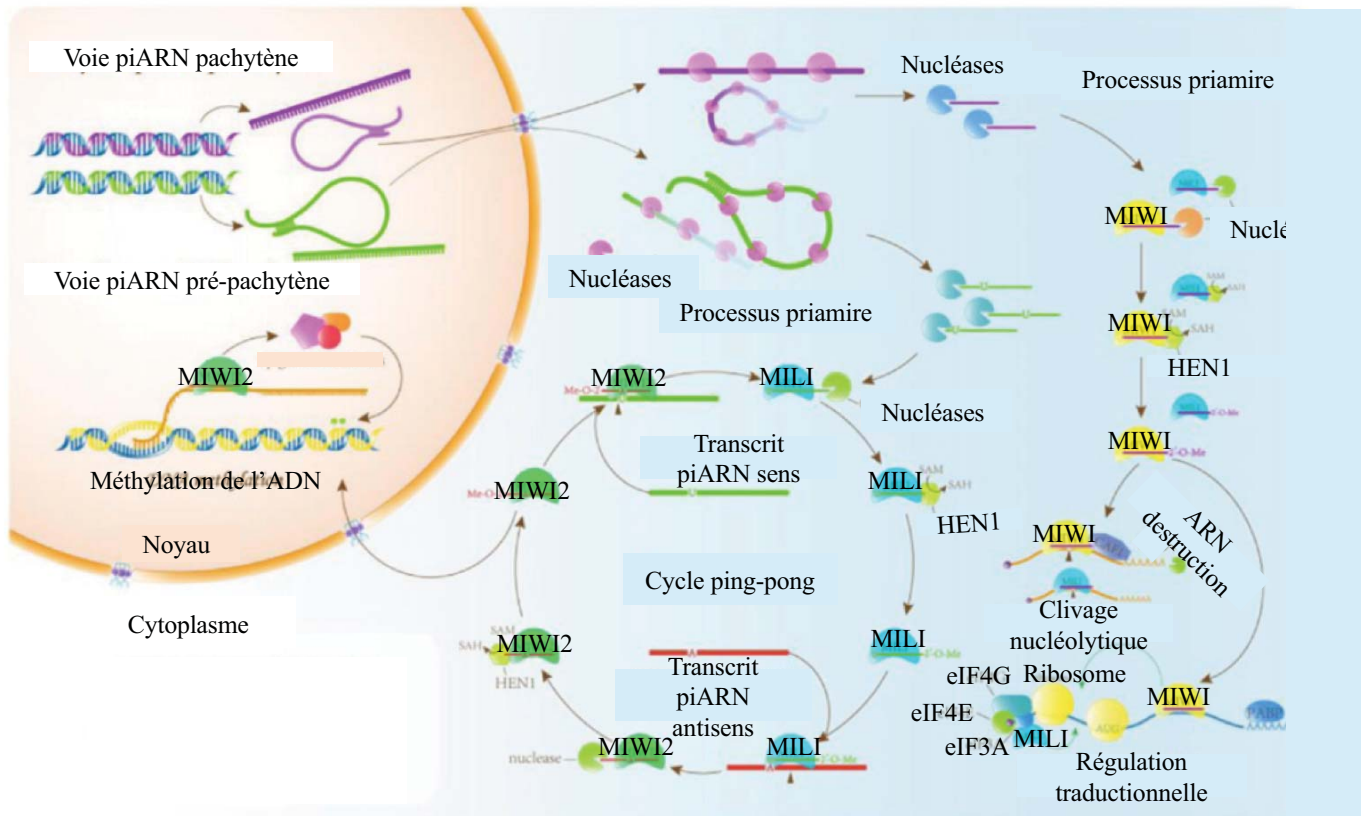


Figure 37 : Biogenèse des piARN.

Les piARN pachytènes et les piARN pré-pachytènes ne sont pas seulement générés durant des stades différents mais leur voie de biosynthèse n'est pas exactement la même. Après leur libération dans le cytoplasme, les piARN pachytènes vont subir un premier traitement où les longs précurseurs simple brin sont divisés en courts précurseurs. Le mécanisme détaillé reste peu clair. Ils sont ensuite chargés sur les protéines MIWI ou MILI et subissent une modification 3'-terminal par Hen1. Cependant, les piARN pré-pachytènes adoptent un cycle ping-pong pour amplifier les piARN sens et antisens. Les précurseurs de ces derniers sont coupés aléatoirement en courts segments démarrants avec une 5'-uridine. Les précurseurs sens sont ensuite pris en charges par MILI et dirigés sur les piARN antisens et clivés à 10 nucléotides. Ainsi, les piARN antisens peuvent être utilisés pour cliver les piARN sens. Les piARN pachytènes et les protéines PIWI exercent des fonctions dans le clivage nucléotidiques de cibles ou la régulation de la traduction. Certains piARN pré-pachytènes avec la protéine MIWI2 sont amenés au noyau et participe à la méthylation de l'ADN.

(Modifiée d'après Luo *et al.*, 2016).

Une fois dans le cytoplasme, les piARN pré-pachytènes adoptent un cycle dit ping-pong pour amplifier les piARN sens et antisens (Malone and Hannon, 2009). Les précurseurs de ces piARN pré-pachytènes vont être coupés aléatoirement en courts segments. Ces précurseurs sens sont coupés par la suite liés avec MILI et dirigés sur les transcrits antisens piARN ainsi clivés en piARN de 10 nt (pour revue voir Luo et al., 2016 ; figure 37).

De plus, dans les cellules germinales mâles, la méthylation de l'ADN est initiée par les piARN. Ces piARN sont dérivés de séquences répétées et agissent sur la mise sous silence et la méthylation de l'ADN des éléments transposables, mais aussi sur *Rasgrf1*, un *locus* à empreinte parentale paternelle qui contient une séquence de type rétrotransposon (Watanabe et al., 2011). L'interaction entre la voie des piARN et les enzymes ADN méthyltransférases reste peu comprise, cependant les piARN paraissent agir en amont de DNMT3L, car l'invalidation de *Dnmt3l* n'affecte pas l'expression des piARN mais un défaut dans la voie des piARN conduit à une perte de la méthylation de l'ADN sur les éléments transposables (Aravin et al., 2008 ; Kuramochi-Miyagawa et al., 2008).

b. Les ARN des spermatozoïdes

En 1997, Krawetz et Kramer ont découvert les premiers ARN spermatiques chez les Mammifères (Kramer and Krawetz, 1997 ; Rassoulzadegan et al., 2006, 2007 ; Wykes et al., 1997) et quelques années plus tard, il a été montré que ces ARN pouvaient être transférés à la descendance (Miller et al., 2005 ; Wykes et al., 2000). Chez l'homme, il est estimé que 18 000 ARNm sont délivrés à l'embryon dont 6 uniques au spermatozoïde (*clusterine*, *Akap4*, *Prm2*, *Cdh13*, *Foxg1b* et *Wnt5a* ; Ostermeier et al., 2004). L'auteur suggère que ces ARNm participent à la formation du *pronucleus* mâle et au contrôle du développement embryonnaire précoce.

Par la suite, la fonction de ces ARN durant la spermatogenèse, la fécondation et le développement embryonnaire ont été analysés et notamment celle des miARN qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (Belleannée et al., 2012).

Les ARNnc sont présents dans les cellules germinales et sont requis pour des événements critiques dans le développement de la lignée germinale, incluant la spécification des PGC, la migration et la colonisation dans les gonades, la différenciation spécifique du sexe des gamètes, la fécondation, le développement embryonnaire et la fondation de la population de PGC descendante (pour revue voir Luo et al., 2016).

Chez la souris, la voie des miARN est essentielle à la spermatogenèse (Hayashi et al., 2008 ; Maatouk et al., 2008 ; Unhavaithaya et al., 2009). Par exemple, miR-34c est fortement exprimé dans les cellules germinales mâles durant la spermatogenèse et sa surexpression

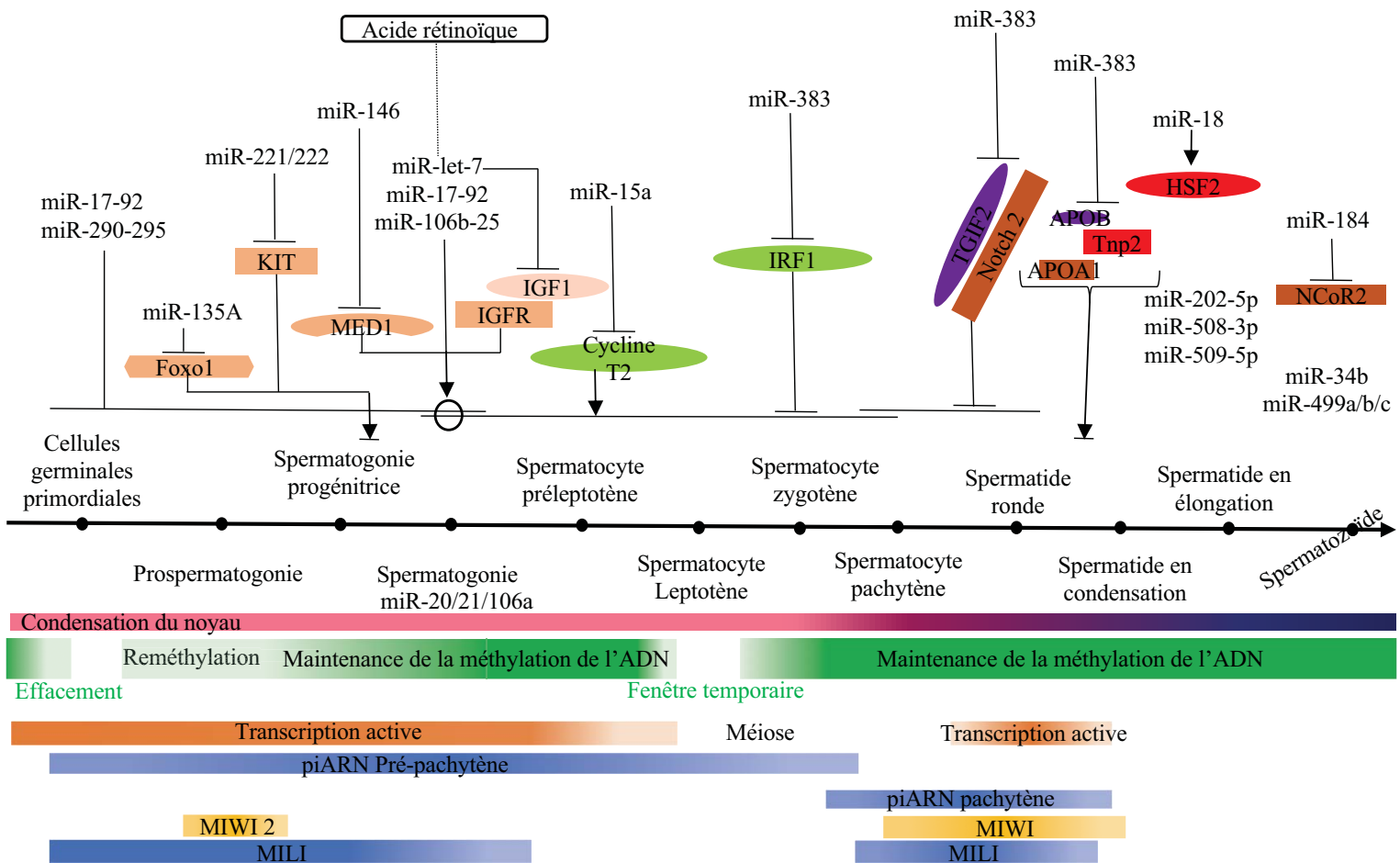


Figure 38 : Implications des miARN au cours de la spermatogénèse

Expression temporelle et fonctionnelle des miARN, piARN/PIWI, de la méthylation de l'ADN et de la transcription durant la spermatogénèse chez la souris. Il existe des miARN spécifiques du testicule et de l'espèce. Parmi eux, certains dérèglent leur cibles pour inhiber la spermatogénèse et promouvoir un autre processus cellulaire.

La méthylation de l'ADN est effacée durant le stade 11,5-13,5 jours *post-coitum* (*dpc*) dans les cellules germinales primordiales (PGC ou cellules progénitrices) et est graduellement ré-établie de 15,5 *dpc* à 2 jours post-natal dans les prospermatogonies. La transcription dans les cellules germinales mâles reste active jusqu'au début de la méiose et devient de nouveau active dans le stade spermatide ronde. Les piARN pré-pachytènes commencent à être exprimés dans les PGC et peuvent durer jusqu'au stade précoce des spermatocytes (leptotène et zygotène). Les piARN pachytènes sont enrichis du stade pachytène des spermatocytes primaires jusqu'au stade spermatide ronde. La protéine MILI existe dans les PGC jusqu'au stade spermatide ronde. Cependant, le niveau de MILI est indétecté durant le stade spermatocyte précoce. La protéine MIWI2 est exprimée seulement dans les prospermatogonies vers la naissance et l'expression de MIWI est corrélée avec les piARN pachytènes.

(Modifiée d'après Luo *et al.*, 2016).

conduit à une augmentation de l'expression de gènes spécifiques des cellules germinales, incluant *Spata17* (*spermatogenesis associated 17*) et *Spef2* (*sperm flagellar 2*; Bouhallier et al., 2010), miR-18 cible un facteur de transcription essentiel à la régulation de la spermatogenèse, HSF2 (*Heat shock transcription factor 2*; figure 38; Björk et al., 2010).

Récemment, il a été montré qu'au cours du transit épидидymaire, des miARN sont transférés au spermatozoïde *via* les épидидymosomes, qui sont des vésicules dérivées de la membrane et libérées dans l'épithélium épидидymaire (Sullivan and Saez, 2013), modifiant ainsi le profil épигénétique des spermatozoïdes (Reilly et al., 2016).

c. L'infertilité masculine et les ARN spermatiques

Pour étudier l'impact des ARNnc sur la fertilité, des modèles de souris invalidées pour des protéines intervenant dans la régulation ou nécessaires aux ARNnc, ont été créés. Par exemple, la perte de *Dicer* dans les PGC murines conduit à un défaut de prolifération, à une spermatogenèse défectueuse, à une morphologie spermatique et à une mobilité altérées (Hayashi et al., 2008; Maatouk et al., 2008). Ces défauts sont dus à des problèmes dans l'activité des miARN. De plus, l'invalidation de *Drosha* dans les spermatocytes induit une perte des spermatides et une stérilité (Wu et al., 2012).

Chez des verrats, l'augmentation de l'expression des miARN let-7a, b, d et e ainsi que de miR-22 et la diminution de celle de miR-15b, sont associées à une faible mobilité et à une morphologie anormale des spermatozoïdes (Curry et al., 2011).

Chez l'homme, des polymorphismes (ou SNP) dans les gènes de *DICER* ou de *DROSHA* sont associés avec à des oligozoospermies (Qin et al., 2012). D'autres miARN peuvent être associés à des azoospermies comme miR-34b, miR-34c-5p et miR-122 qui sont sous-exprimés chez des patients présentant des azoospermies (Abu-Halima et al., 2014a, 2014b; Lian et al., 2009).

Les piARN et leurs protéines associées jouent également un rôle important dans la spermatogenèse. La délétion de *Mili*, *Miwi* ou *Miwi-2* conduit à une activation des rétrotransposons dans les cellules germinales mâles, à un arrêt de la méiose et à une stérilité (Aravin et al., 2007; Carmell et al., 2007; Deng and Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004, 2008). En effet, la perte de ces protéines conduit à un défaut de méthylation de l'ADN. Chez la souris, les mutants pour *Miwi2* présentent un arrêt de développement des cellules germinales au stade leptotène de la méiose, corrélant avec des défauts dans la réparation des cassures doubles brins d'ADN et suggèrent donc un rôle de *Miwi2* dans la recombinaison méiotique normale (Carmell et al., 2007; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004). De même que

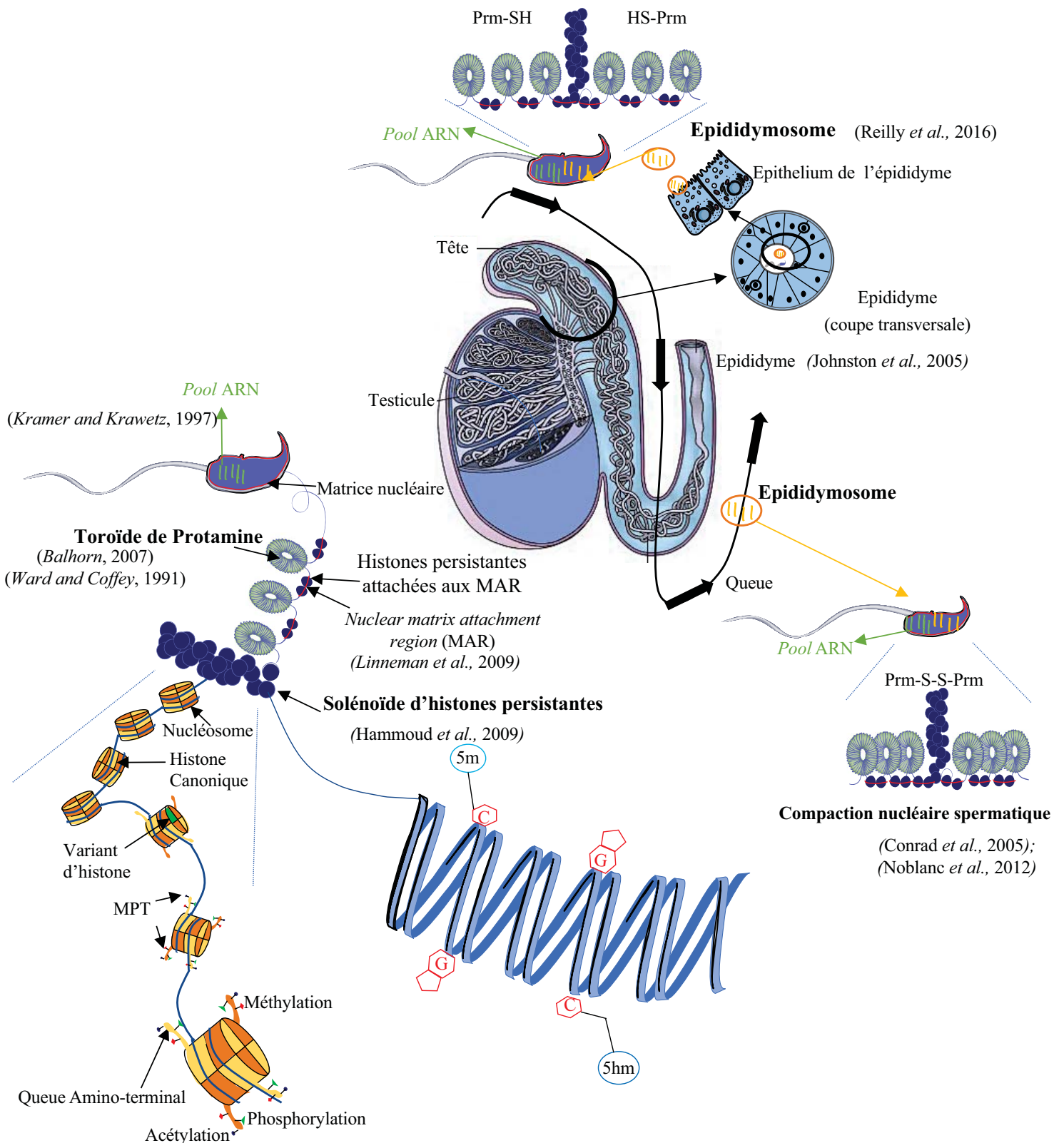


Figure 39 : Chromatine et épigénome du noyau spermatique

Au cours de la spermatogenèse dans les testicules, certaines histones sont remplacées par des variants d'histones spécifiques telles que TH2B, H2AL1. Ensuite, la plupart des histones (canoniques et variants) sont remplacées par des protéines basiques ; protamines (PRM). Néanmoins, il persiste des histones dans les solénoïdes et entre deux toroïdes, attachées à la matrice nucléaire (barre rouge). L'ADN spermatique est structuré en toroïde (riche en protamines) et solénoïde (histones) qui permet de condenser fortement la chromatine spermatique. Le spermatozoïde contient également des marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN avec la méthylcytosine et l'hydroxyméthylcytosine, les histones avec des modifications post-traductionnelles (MPT) et un *pool* d'ARN (ARNm et ARN non-codants). Pendant le transit épидидymaire (flèche noire), les spermatozoïdes subissent une maturation, le noyau est encore condensé au moyen d'un pontage disulfure intense créé sur des groupes thiols portés par les protamines riches en cystéines et enrichi en ARN non-codants fournis par les épидидymosomes.

C: cytosine ; G: guanine ; 5m: 5-méthylcytosine ; 5hm: 5-hydroxyméthylcytosine ; MAR: *Matrix attachment region* ; Prm: Protamine ; MPT: modifications post-traductionnelles ; SH: groupement thiol ; S-S: ponts disulfures

pour les protéines intervenant dans la régulation des miARN, celles de la régulation des piARN, les protéines PIWI présentent des SNP chez des patients azoospermiques et oligozoospermiques (Gu et al., 2010). Associés à des perturbations de la méthylation de l'ADN dans les régions promotrices des protéines PIWI 1 et 2, nous observons des défauts de spermatogenèse et des infertilités masculines (Friemel et al., 2014).

Nous venons de voir que le spermatozoïde emmène en plus de son génome, un épigénome complexe qui est d'une importance cruciale pour garantir la qualité du spermatozoïde et la fertilité. Cet épigénome sera transmis au futur embryon et va jouer un rôle dans le développement embryonnaire après la fécondation.

A. L'épigénome paternel post-fécondation

a. La méthylation de l'ADN spermatique.

Dans de nombreuses espèces, le méthylome du spermatozoïde a été montré pour être très différent de celui d'une cellule somatique, mais similaire à celui des cellules souches embryonnaires (Farthing et al., 2008 ; Weber and Schübeler, 2007). Des approches d'analyse de la méthylation du génome montrent que les régions non méthylées ou hypométhylées dans les spermatozoïdes par rapport aux cellules somatiques, concernent les « *genes bodies* » et les îlots CpG (Boyer et al., 2005 ; Smith et al., 2012), c'est-à-dire des promoteurs de facteurs de transcription et de signalisation contrôlant le développement précoce tels que Sox2 ou Foxd3. Pour rappel, ces mêmes régions sont également marquées par les histones persistantes (Brykczynska et al., 2010 ; Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009) suggérant une transcription de ces gènes dans l'embryon juste après la fécondation.

Néanmoins, après la fécondation, dans les deux *pronuclei*, l'ADN est déméthylé afin d'obtenir un état totipotent pour le développement embryonnaire.

1. La déméthylation du génome

Pour les deux *pronuclei*, la déméthylation de l'ADN est médiée par 1) une active déméthylation de l'ADN dépendante des enzymes TET, incluant TET3, et la formation successive de 5hmC, 5fC et 5caC (*cf.* chapitre précédent III.A., Tahiliani et al., 2009). L'accumulation de la marque 5hmC est importante dans le *pronucleus* mâle et TET3 est localisée de façon majoritaire dans le *pronucleus* mâle (Amouroux et al., 2016 ; Gu et al., 2011 ;

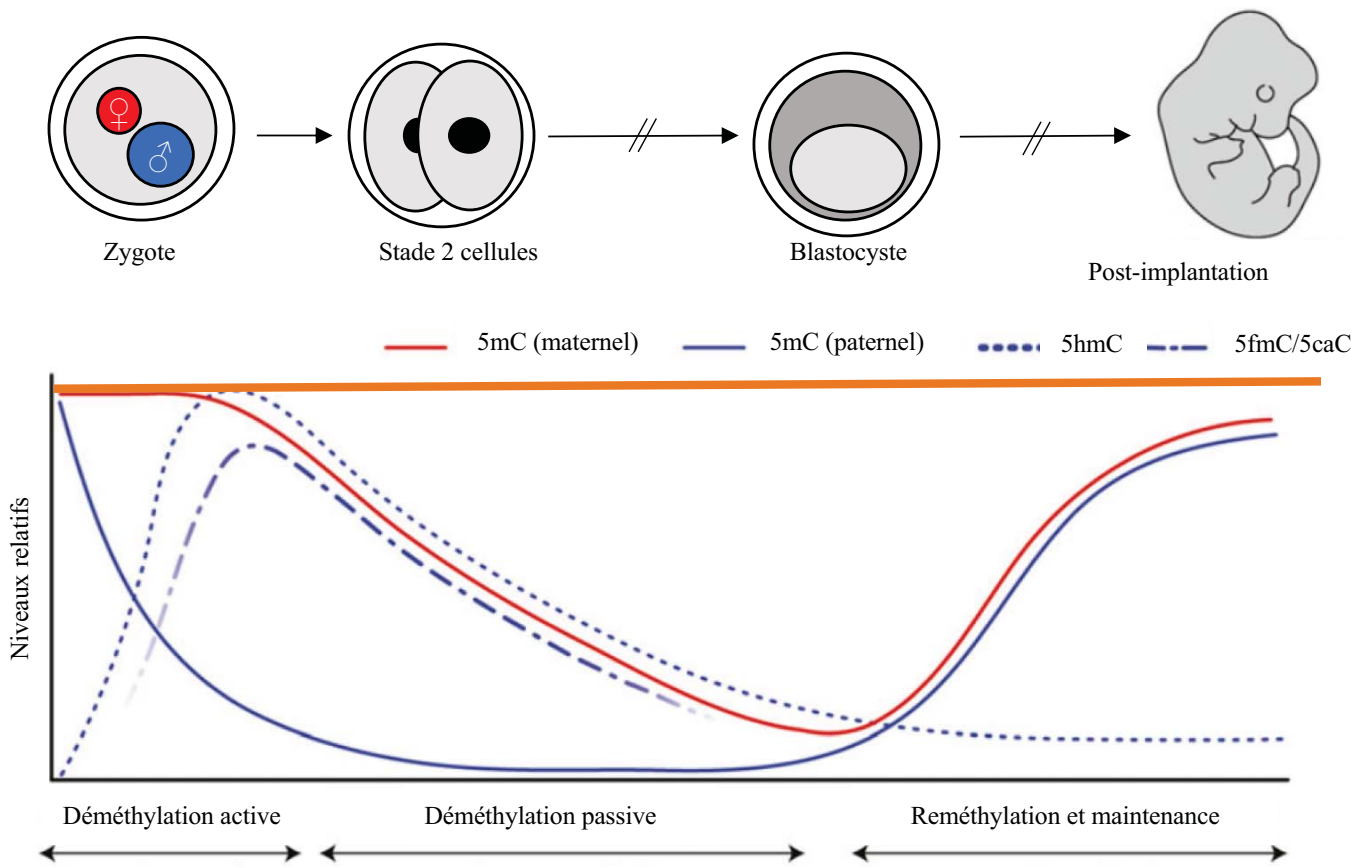


Figure 40 : Dynamique de la déméthylation de l'ADN et la maintenance de l'empreinte épigénétique dans les embryons préimplantatoires.

Les caractéristiques distinctes du génome paternel et maternel imposent une asymétrie épigénétique dans le zygote. Le génome maternel (*pronucleus* rouge : ligne rouge) subit une déméthylation passive de l'ADN à travers les différents cycles de réplication. Le génome paternel (*pronucleus* et ligne bleus) subit une active déméthylation avant la réplication de l'ADN dans le zygote.

Concomitant avec la perte globale de 5mC, les marques 5hmC (ligne en pointillées bleus) et les dérivés oxydés (5fC, 5caC, ligne bleue en tiret) sont augmentés. Bien que le *loci* sélectionné soit restauré en cytosines non modifiées, la 5hmC est passivement diluée parallèlement à la déméthylation du génome maternel. Seules certaines régions de type répétées ou à empreinte parentale ne sont pas déméthylées (ligne orange).

(Modifiée d'après Messerschmidt *et al.*, 2014).

Iqbal et al., 2011 ; figure 34). L'ADN hérité du père est rapidement déméthylé avant la réplication de l'ADN et avant la formation du zygote (figure 40 ; Messerschmidt et al., 2014 ; Mayer et al., 2000 ; Oswald et al., 2000). 2) Par une déméthylation passive dépendante de la réplication (Guo et al., 2014 ; Shen et al., 2014 ; Wang et al., 2014).

Les différents dérivés de la cytosine méthylée (5hmC, 5fC et 5caC) sont finalement transformés en cytosine non méthylée par la voie de réparation de l'ADN, TDG-BER (*thymidine DNA glycosylase-base excision repair*) indépendante de la réplication (figure 40 ; Kohli and Zhang, 2013). Les enzymes TDG ne reconnaissant que les formes 5fC et 5caC, la 5hmC subit une déamination en 5hmU (5-hydroxyméthyluracile) par l'intervention de cytosine déaminases comme AID/APOBEC (Xue et al., 2016 ; Zhang et al., 2012). Un site abasique est ainsi généré et les acteurs de la voie de réparation BER interviennent comme APE1, XRCC1 ... (Schuermann et al., 2016 ; Weber et al., 2016). XRCC1 est localisé dans le *pronucleus* mâle mais absent du *pronucleus* femelle (figure 40 ; Hajkova et al., 2010 ; Wossidlo et al., 2010). De plus, l'ADN méthyltransférase DNMT1 est exclue du noyau des embryons préimplantatoires (Hirasawa et al., 2008 ; Howell et al., 2001), induisant ainsi l'absence de méthylation de l'ADN juste après la fécondation. A partir du stade blastocyste, les cellules méthylent leur ADN, par intervention des ADN méthyltransférases *de novo* DNMT3A, 3B et 3L, en fonction de leur devenir et du sexe embryonnaire.

Afin d'étudier l'importance de la 5hmC dans l'embryon, des équipes ont invalidé les gènes codant pour les *Tet*. Les souris invalidées pour *Tet1* sont viables (Dawlaty et al., 2011) mais ont une petite taille à la naissance, démontrant un retard de croissance lors du développement embryonnaire. Ces souris sont également infertiles car *Tet1* est indispensable lors de la méiose (Yamaguchi et al., 2012).

L'invalidation de *Tet2* ne conduit pas à des défauts lors du développement embryonnaire mais affecte l'hématopoïèse, en augmentant le stock de cellules progénitrices hématopoïétiques et la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches. Des mutations de *Tet2* ont été découvertes chez l'homme dans des cancers myéloïdes et des lymphomes (Delhommeau et al., 2009 ; Langemeijer et al., 2009 ; Tefferi et al., 2009).

L'invalidation de *Tet3* cause un arrêt du développement de la majorité des embryons (Gu et al., 2011). En effet, ces souris présentent un retard dans l'activation des allèles paternels, essentiels au développement embryonnaire, tels que *Nanog* et *Oct4* et une absence de la marque 5hmC causant une fécondité réduite et des défauts de développement chez les descendants.

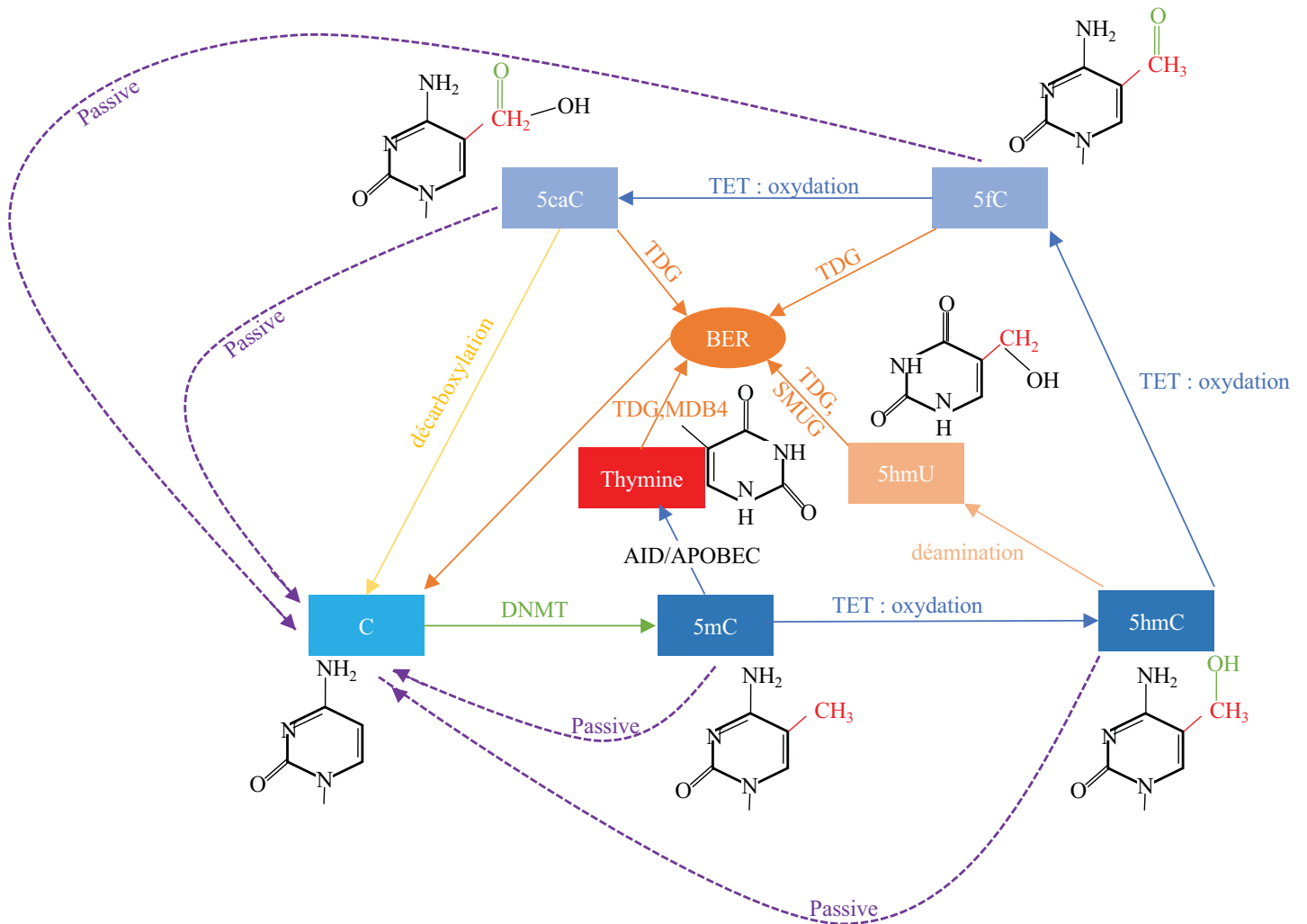


Figure 41 : Voies de déméthylation du génome.

La cytosine est méthylée par les enzymes DNMT (*DNA methyltransferases*) en 5-méthylcytosines (5mC). La déméthylation de l'ADN peut se faire par deux procédés soit de façon passive au cours de la réplication du génome, soit de façon active par différents processus. Les enzymes TET (pour *ten-eleven translocase*) oxydent la 5mC qui sera transformée en 5hmC (ou 5-hydroxyméthylcytosine), elle même sera oxydée par les TET en 5fC (5-formylcytosine) ou 5caC (5-carboxycytosine). Ces marques seront transformées en cytosines (C) non méthylées par la voie de réparation TDG/BER (*thymidine DNA glycosylase - base excision repair*). 5-hmU : 5-hydrométhyluracile.

(Modifiée d'après Seisenberger *et al.*, 2012)

Une déficience combinée de *Tet1* et *Tet3* chez la souris entraîne une augmentation de la marque 5mC et une perte de 5hmC au stade huit cellules. Il apparaît chez ces embryons une baisse de l'expression de gènes intervenant dans la biosynthèse du cholestérol, et pour le peu d'embryons qui survivent, l'apparition d'une holoprosencéphalie (malformation cérébrale) associée à des troubles neurologiques (Kang et al., 2015).

De plus, des analyses de séquençage à haut débit montrent que la 5hmC est enrichie sur les promoteurs de gènes avec des histones bivalentes (possédant les marques H3K27me3 et H3K4me3) et sur des régions *enhancers* (Branco et al., 2011 ; Pastor et al., 2011 ; Stroud et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la 5hmC est associée à la modulation de l'expression des gènes (Wu et al., 2011). Les transcrits alternativement épissés affichent une réduction de 5hmC sur les exons excisés par rapport aux exons constitutifs, ce qui suggère que la marque 5hmC peut jouer un rôle dans la production des isoformes des transcrits, notamment au sein des cellules neurales. Ces gènes codent pour des protéines spécifiques des synapses comme *Gli3* (*Gli family zing finger 3*) ou *Cpm* (*carboxypeptidase M* ; Khare et al., 2012).

2. Le maintien de la méthylation

Certaines régions ne sont pas déméthylées dans le *pronucleus* mâle (les éléments transposables, les gènes à empreinte parentale, les séquences répétées et les *IAPs* ; Lane et al., 2003). Un mécanisme commence à être évoqué, qui serait le même dans le *pronucleus* femelle, pour expliquer l'absence de déméthylation active dans ce *pronucleus*. La protéine Stella (ou PGC7) initialement identifiée dans les PGC, protégerait l'ADN de la déméthylation, notamment sur les *loci* à empreinte parentale paternelle (comme *Rasgrf1*). Ceci serait accompli en empêchant la fixation de la protéine TET3 et en maintenant la présence de la marque H3K9me2 mise en place durant la spermatogenèse, sur les DMR qui n'ont pas été soumises au remplacement des histones (Nakamura et al., 2007, 2012). L'invalidation du gène codant pour la protéine Stella conduit à un arrêt du développement de l'embryon associé à une perte de la 5mC dans les *pronuclei* mâle et femelle (Nakamura et al., 2007).

Deux autres protéines ont été identifiées pour protéger les DMR de la déméthylation : *Zfp57* une protéine à doigts de zinc de type KRAB, et *Trim28*. L'interaction de ces deux protéines, qui ciblent spécifiquement les DMR, induit le recrutement de complexes répressifs comme NuRD (*Nucleosome Remodelling Deacetylase*), SETDB1 (histone méthyltransférase) et les DNMT (Quenneville et al., 2011 ; Zuo et al., 2012). La perte de *Trim28* est létale pour

l'embryon, en partie à cause de défauts dans l'expression des gènes à empreinte (Messerschmidt et al., 2012). La perte de *Setdb1* conduit à une levée de la répression des rétrotransposons et à une augmentation des cassures double brins de l'ADN (Kim et al., 2016a).

Cependant, des erreurs dans l'établissement de la méthylation de l'ADN des régions DMR peuvent être délétères pour le développement embryonnaire. La perte de cette méthylation résulte soit d'une délétion ou d'une mutation dans la séquence génomique (Horsthemke, 2014). Elle peut également être issue d'une disomie parentale c'est à dire de l'apport d'un chromosome uniquement d'un seul parent (Yamazawa et al., 2010). Ou bien encore d'une épimutation qui correspond à une altération de la méthylation sur la DMR ou d'un défaut dans les modifications post-traductionnelles des histones sur cette région (Delaval et al., 2006). Les altérations de la méthylation de l'ADN peuvent être dues à un défaut lors de la mise en place de la méthylation par les DNMT ou lors de l'effacement de la méthylation au cours du développement embryonnaire.

Les facteurs environnementaux peuvent affecter les marques épigénétiques, notamment celles du spermatozoïde (pour revue voir Pacchierotti and Spanò, 2015). De façon similaire, l'utilisation des procédures de PMA peut affecter les marques épigénétiques de *loci* à empreinte parentale et altérer leur expression. En effet, plusieurs études ont rapporté un lien entre la PMA et des défauts d'empreintes parentales conduisant à une augmentation de l'incidence de syndromes comprenant les syndromes d'Angelman, de Prader-Willi, de Beckwith-Wiedmann (Chang et al., 2005), de Silver-Russell (Chopra et al., 2010) et de rétinoblastomes (Marees et al., 2009), chez les enfants conçus par PMA comparés à ceux nés de fécondations naturelles (Amor and Halliday, 2008 ; Iliadou et al., 2011a ; Kelley-Quon et al., 2013). Des enfants conçus par ICSI qui ont un syndrome de Beckwith-Wiedmann ou de Silver-Russell présentent une hypométhylation du DMR *Igf2/H19* (Chang et al., 2005 ; Chopra et al., 2010).

b. Le rôle des histones paternelles

Comme nous avons pu le voir, les histones jouent un rôle important dans la régulation de la chromatine des cellules somatiques mais aussi germinales. Les histones (canoniques et variants) qui persistent dans le noyau spermatique ne sont pas toutes remplacées, après la fécondation et jouent donc un rôle dans le développement embryonnaire (*cf.* chapitre suivant).

Deux à quatre heures après la fécondation, dans le *pronucleus* mâle, les protamines sont remplacées par les histones canoniques H3 et H4 qui sont hyperacétylées permettant une

conformation ouverte de la chromatine pour la future transcription des gènes du développement (Santos et al., 2005 ; Sarmiento et al., 2004). En plus des modifications post-traductionnelles caractérisées sur les histones persistantes (*cf.* § II.A.b.4. histones persistantes), le *pronucleus* mâle conserve des marques propres telles que H4K5ac, H4K16ac et H3K27ac empêchant notamment la méthylation de la lysine du site H3K27 et donc permettant l'expression de gènes importants pour le développement embryonnaire (Hayashi-Takanaka et al., 2011). La marque H3K4me est notamment très importante pour le développement embryonnaire. En effet, H3K4me est essentielle pour l'activation des gènes zygotiques dans le *pronucleus* mâle qui est nécessaire pour le développement préimplantatoire (Aoshima et al., 2015). L'absence de cette marque conduit à un arrêt de développement.

1. L'histone H1

Le domaine carboxy-terminal de l'histone H1 a été montré pour interagir directement avec les ADN méthyltransférases DNMT1 et DNMT3B mais pas avec DNMT3A (Yang et al., 2013b). Parallèlement à l'enrichissement en histone H1, nous observons le recrutement de DNMT1 et DNMT3B sur les gènes à empreinte parentale *H19* et *Gtl2* dans les cellules ES suggérant que l'histone H1 peut participer à la mise sous silence des gènes *via* des mécanismes indépendants de la compaction durant le développement préimplantatoire (Yang et al., 2013b). L'histone H1 est également modifiée de façon covalente par phosphorylation, méthylation et acétylation sur ses queues amino- et carboxy- terminales, et dans son domaine *fold* (Izzo and Schneider, 2016). Cependant, la fonction et l'effet de ces modifications post-traductionnelles dans le développement embryonnaire ne sont pas encore définis.

2. Les variants H2A

Les variants H2AL1/2, qui sont enrichis dans les régions hétérochromatiennes, disparaissent rapidement après la fécondation chez la souris (Wu et al., 2008). Le variant γ H2A.X est retrouvé activement incorporé dans les *pronuclei* mâle et femelle peu après la fécondation, et est maintenu dans les embryons à deux et quatre cellules, pour permettre la réparation des cassures d'ADN, avant de décroître au stade morula et blastocyste (Nashun et al., 2010).

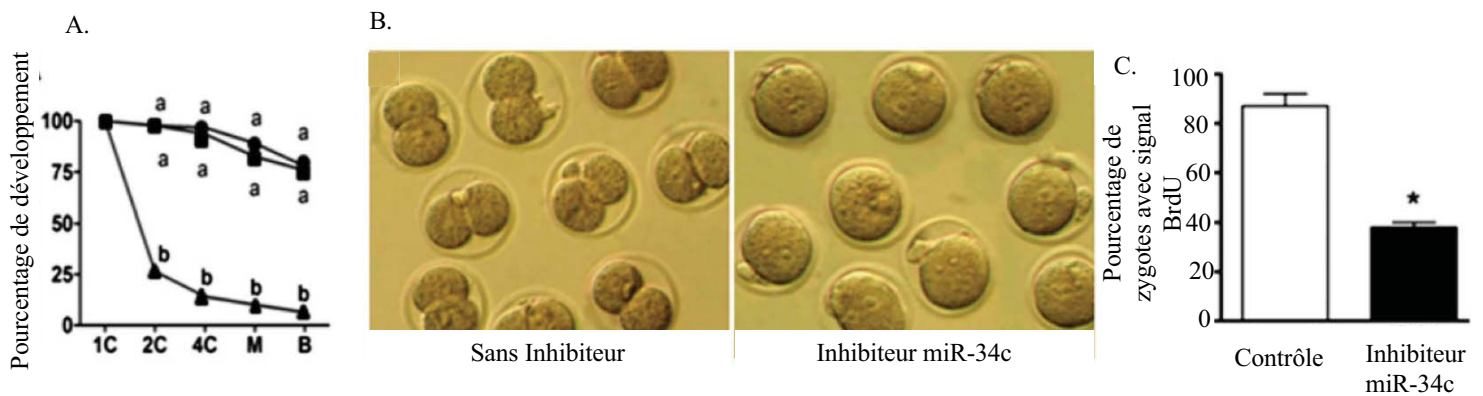


Figure 42 : Effets de l'injection de l'inhibiteur de miR-34c sur le développement d'embryons murins.

L'injection de l'inhibiteur de miR-34c supprime le développement du zygote (n=5). Le pourcentage de développement est basé sur le nombre d'embryons au stade une cellule. Il y a une diminution significative dans le nombre d'embryons au stade deux cellules, quatre cellules, morula et blastocystes chez les zygotes injectés par l'inhibiteur de miR-34c. Chaque donnée de points représente plus de 200 embryons (A).

L'inhibiteur de miR-34c inhibe la fusion des *pronuclei*. Les *pronuclei* dans les zygotes injectés avec le contrôle fusionnent et clivent 20h après l'injection (B).

Le pourcentage d'embryons ayant le signal de BrdU est significativement plus faible après l'injection de l'inhibiteur de miR-34c qu'après l'injection du contrôle (n= 3 ; C). *p<0.05 comparé au contrôle. (Modifiée d'après Liu *et al.*, 2012)

3. Les variants H3

Alors que l'histone H3.3 maternelle est incorporée dans le génome au niveau de l'euchromatine durant l'ovogenèse, elle est retirée en même temps que l'histone H4 du *pronucleus* maternel à la fécondation (Akiyama et al., 2011). Le génome paternel acquiert l'histone H3.3 mais pas les histones H3.1 ni H3.2. En effet, quatre heures après la fécondation, le *pronucleus* mâle nouvellement formé apparaît porter seulement des nucléosomes contenant H3.3, tandis que le *pronucleus* femelle ne porte aucune histone H3.3 (Akiyama et al., 2011 ; Santenard et al., 2010). Au stade une cellule, l'histone H3.3 est déposée sur les deux *pronuclei* bien que l'asymétrie soit maintenue dans le *pronucleus* mâle sur les régions péri-centromériques. H3.3 permettrait l'expression de régions dites satellites proches des régions péri-centromériques supposées jouer un rôle critique dans la formation de l'hétérochromatine et le développement embryonnaire (Akiyama et al., 2011 ; Probst et al., 2010). La présence d'H3.3 sur l'euchromatine et l'hétérochromatine n'est détectée qu'au stade deux cellules (Orsi et al., 2009). De plus, l'embryon doit réarranger les régions paternelles (hétérochromatine et euchromatine) du *pronucleus* pour former un génome embryonnaire fonctionnel après la fécondation (Probst et al., 2010 ; van de Werken et al., 2014). La voie impliquée dans ce processus est complètement différente entre les embryons humains et murins. Chez l'homme, l'hétérochromatine constitutive (cHC) du *pronucleus* paternel est établie par la voie H3K9/HP1 maternelle qui reconnaît les marques portées par la cHC canonique (H3K9Me3 et H4K20me3) sur le génome paternel. Dans l'embryon de souris, l'hétérochromatine paternelle spermatique est dépourvue de marques d'hétérochromatine canonique et est principalement établie par l'action des protéines du groupe Polycomb PRC1/2 (Casanova et al., 2013 ; van der Heijden et al., 2006 ; Probst et al., 2010 ; van de Werken et al., 2014).

c. Le rôle des ARN spermatiques

Depuis la découverte de la transmission d'ARNm et d'ARNnc par le spermatozoïde à l'embryon après fécondation, des études ont été réalisées pour connaître l'impact et le rôle de ces ARNnc dans le développement embryonnaire. Un miARN spécifique de la lignée germinale mâle (spermatozoïde) est retrouvé dans le zygote après la fécondation : miR-34c. L'injection d'un inhibiteur de miR-34c dans l'ovocyte induit un arrêt de la division cellulaire embryonnaire (à la première division ; Liu et al., 2012). miR-34c interviendrait dans la régulation, par inhibition, de l'expression du gène *Blc2* (ou *B-cell leukemia/lymphoma 2*) qui possède une fonction anti-proliférative (figure 42).

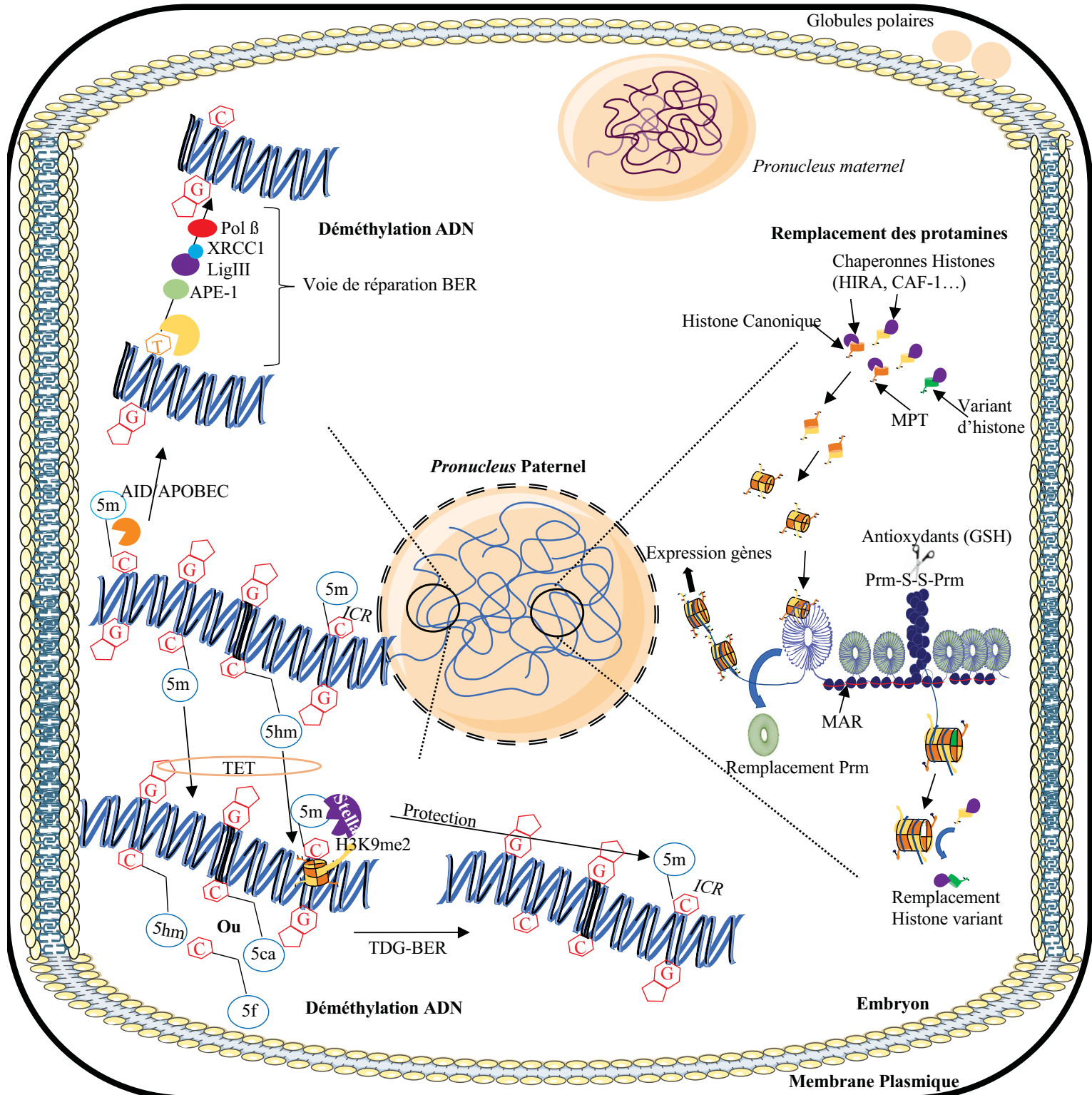


Figure 43 : Dynamique de la reprogrammation de l'épigénome du *pronucleus* paternel

Après la fécondation dans un embryon à une cellule, le noyau paternel subit de nombreux remodelages. Tout d'abord, les protamines sont remplacées par des histones issues de la mère. Différents variants d'histones sont également supprimés par une histone canonique ou un autre variant. La majorité de la méthylcytosine sera effacée pour l'acquisition de la totipotence cellulaire, par deux processus: la réparation TET-TDG-BER pour réformer une cytosine non méthylée ou par la voie AID/APOBEC qui convertie la 5-méthylcytosine en thymine par le système BER et répare le mésappariement (TG) en cytosine non-méthylée. Néanmoins, certaines régions doivent être protégées de la déméthylation de l'ADN (séquences répétées, régions à empreinte parentale ICR ...) grâce à la présence de la protéine Stella et H3K9me2.

AID/APOBEC: cytidine déaminase ; APE: Apurinic/Apyrimidic endonucléase ; BER: *Base excision repair* ; C: cytosine ; G: guanine ; GSH: Glutathione ; 5m: 5-méthylcytosine ; 5hm: 5-hydroxyméthylcytosine ; 5f: 5-formylcytosine ; 5-caC: 5-carboxycytosine ; ICR : *Imprinting control region* ; Lig: Ligase ; MAR: *Matrix attachment region* ; Pol: Polymérase ; Prm: Protamine ; MPT: modifications post-traductionnelles ; S-S : ponts disulfures ; TDG: *Thymine DNA glycosylase* ; TET: *Ten eleven translocation* ; XRCC1: *X-ray repair cross-complementing protein 1*

De plus, certaines études montrent un lien entre la méthylation de l'ADN et les ARNnc. En effet, l'expression des ARNm de DNMT3 A et B est régulée négativement par miR-29b dans des embryons précoces de souris. Les modifications de l'activité du miR-29b pourraient induire des changements des niveaux de méthylation de l'ADN dans les embryons pré-implantatoires de souris et conduire à un arrêt du développement (Zhang et al., 2015).

Des spermatozoïdes issus de souris invalidées pour *Dicer* ou *Drosha*, présentant donc une biogenèse des miARN/endo-siARN altérée, injectés dans des ovocytes de souris sauvages, montrent l'importance des miARN/endo-siARN spermatiques dans le développement préimplantatoire. Nous observons notamment une dérégulation de l'expression des gènes dans l'embryon pré-implantatoire. Le phénotype de ces embryons peut être sauvé, dans leur développement, par l'injection d'un *pool* d'ARN spermatique de souris sauvages (Yuan et al., 2016).

Toutes ces études montrent l'importance de l'épigénome spermatique dans le développement embryonnaire (figure 43) mais récemment des équipes ont cherché à comprendre le rôle de l'épigénome spermatique au-delà du développement embryonnaire, sur la santé du futur individu et de sa descendance.

d. L'épigénome et effets transgénérationnels

De récentes études suggèrent que l'épigénome paternel est responsable de la transmission de pathologies aux générations suivantes, un phénomène appelé épigénétique transgénérationnelle. Cette hérédité implique la transmission de l'épigénome *via* la lignée germinale aux générations suivantes. Au départ, les parents (génération F0) subissent un stress environnemental tel qu'un stress nutritionnel (régime riche en graisse ou faible en protéines), un stress psychologique, une exposition à des toxines ou à des médicaments, mais également des mutations dans les gènes codant pour les acteurs de la régulation épigénétique (comme décrit précédemment) modifiant ainsi l'épigénome paternel (Blake and Watson, 2016). En effet, de nombreuses équipes de recherche montrent que des souris mâles nourries avec des régimes déséquilibrés (faible teneur en protéines, richesse en graisse, déficience en folate) entraînent l'apparition de troubles métaboliques et notent des changements dans l'épigénome spermatique dans la descendance (Carone et al., 2010 ; Fullston et al., 2013 ; Mejos et al., 2013 ; Ng et al., 2010 ; Wei et al., 2014). Dans la descendance, la méthylation de l'ADN des régions régulatrices de gènes impliqués dans le métabolisme comme l'homéostasie du glucose et du cholestérol est modifiée (Carone et al., 2010 ; Fullston et al., 2013 ; Ng et al., 2010). L'étude de Ng rapporte

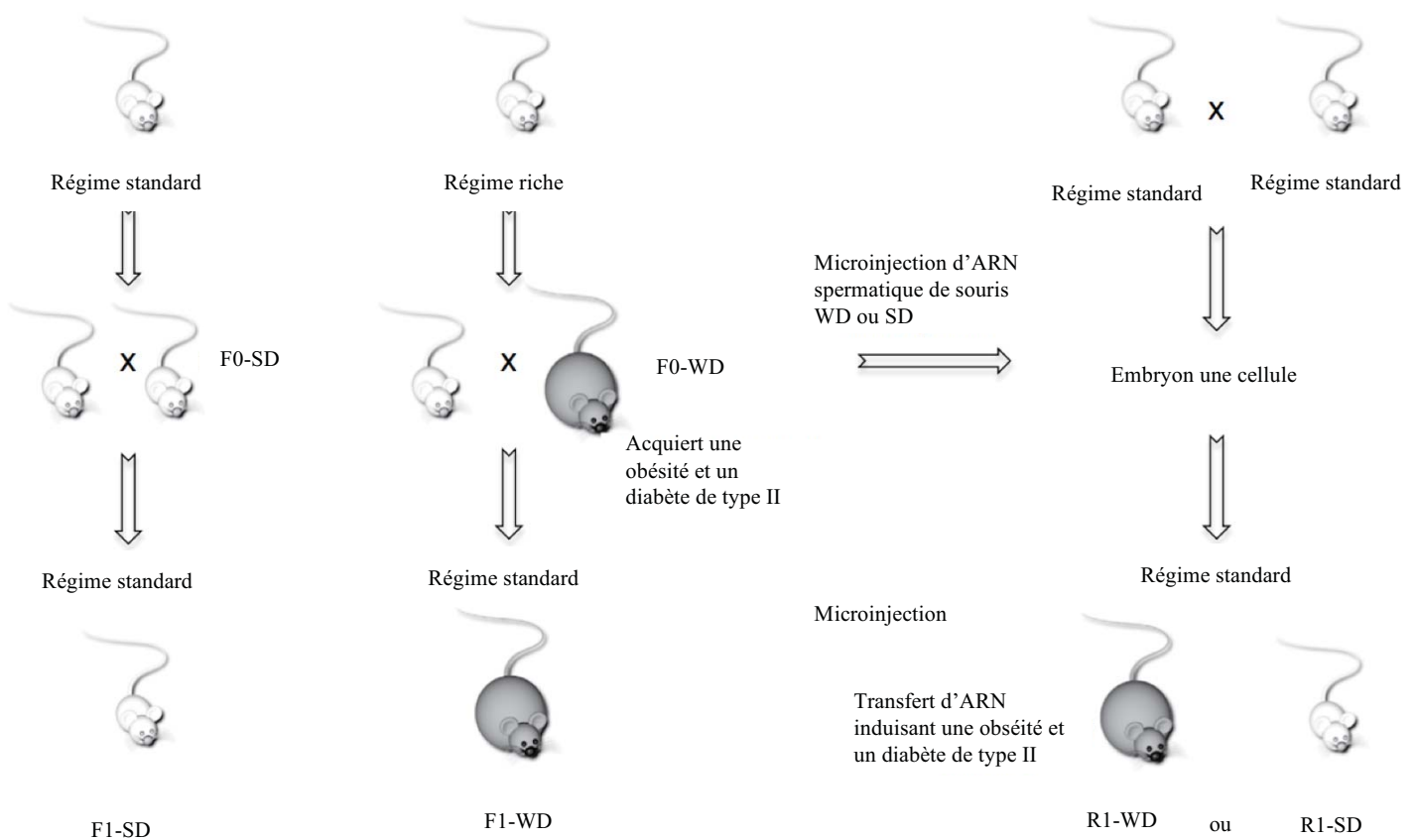


Figure 44 : Effets transgénérationnels au travers des ARN spermatiques.

Des souris mâles C57Bl/6 âgées de trois semaines sont divisées en trois groupes. Un groupe (F0-SD) qui est nourri avec un régime standard (SD) et les autres avec un régime riche en graisse (WD). A l'âge de 16 semaines, elles sont croisées avec des femelles qui ont été nourries au régime standard. La descendance F1 en résultant est également nourrie au régime standard. Les ARN des spermatozoïdes sont extraits de mâles nourris avec le régime standard ou riche et sont injectés dans des ovocytes fécondés C57Bl/6 collectés après une ovulation normale. Après la réimplantation chez des mères, la moitié des ovocytes se développe normalement (désigné comme la génération R1). Toutes les souris sont nourries avec le régime standard hormis pour les mâles F0.

Ici, ils montrent que la micro-injection d'ARN spermatique de souris mâles nourries avec une régime riche dans des embryons une cellule conduit à l'établissement d'un phénotype métabolique dans la descendance induit par le régime paternel tandis que avec des ARN de souris contrôles (régime standard) n'induisent pas de phénotype.

(D'après Grandjean *et al.*, 2015).

une altération de l'homéostasie du glucose chez les souriceaux femelles issus de souris mâles nourries avec un régime riche en graisse. L'analyse transcriptomique de ces souriceaux montre une altération de l'expression des gènes dans les tissus adipeux rétro-péritonéaux et les îlots pancréatiques, c'est-à-dire les tissus intervenant dans la régulation métabolique. La méthylation de l'ADN du promoteur du gène *interleukin 13 receptor subunit alpha 2 (Il13ra2)* est également modifiée (Ng et al., 2010, 2014).

Un régime faible en protéines consommé par des souris mâles entraîne, dans la descendance, une augmentation de la méthylation de l'ADN de séquences régulatrices de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des lipides et du cholestérol comme *Ppara* (Carone et al., 2010). Néanmoins, les auteurs ne notent aucune modification de la méthylation de l'ADN des gènes à empreinte parentale dans la descendance, ni dans le profil de méthylation de l'ADN spermatique entre les souris nourries ou non avec le régime faible en protéines. De façon contradictoire, d'autres études démontrent qu'un stress alimentaire modifie le profil de méthylation de l'ADN spermatique notamment sur les gènes du phosphatidylinositol (PI) de la voie de régulation de l'insuline (Wei et al., 2013). De futures études sont donc indispensables pour confirmer si un stress environnemental peut induire un changement de l'épigénome spermatique et pour comprendre son impact sur la descendance.

De même que chez la souris, il est rapporté qu'un homme subissant un stress environnemental peut transmettre des troubles métaboliques à sa descendance. Par exemple, des pères présentant une hypométhylation des DMR de gènes tels que *MEST* ou *PEG3* (*paternally expressed gene 3*, intervenant dans la prolifération cellulaire) transmettent des maladies chroniques métaboliques à la descendance (Jirtle and Skinner, 2007 ; Murphy and Jirtle, 2003 ; Soubry et al., 2013, 2015).

Outre le profil de méthylation spermatique, d'autres études se sont intéressées à l'impact de modifications des autres acteurs épigénétiques paternels (histones persistantes, *pool* d'ARN) sur la descendance. Néanmoins, il existe peu d'études sur le lien entre modifications post-traductionnelles des histones persistantes spermatiques et héritage transgénérationnel. Une étude consistant en l'administration de cocaïne à des rats mâles, montre une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 sur le promoteur du gène *Bdnf* (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) dans le spermatozoïde et la descendance. Néanmoins, les auteurs ne notent pas d'effet transgénérationnel car cette hyperacétylation ne se retrouve pas transmise sur plusieurs générations (Vassoler et al., 2013).



Figure 45 : Phénotype des fœtus issus du croisement femelle sauvage avec des mâles $Gpx5^{-/-}$. L'ensemble des dommages oxydants dans l'épididyme des souris invalidées pour le gène $Gpx5$ ($Gpx5^{-/-}$) a des conséquences sur leur descendance. En effet, on observe une augmentation des malformations des fœtus lors des croisements de souris mâles $Gpx5^{-/-}$ âgées de plus d'un an avec des souris femelles sauvages. Certaines de ces malformations sont visibles sur les photographies, où un embryon normal est entouré en rouge. (D'après Chabory *et al.*, 2009).

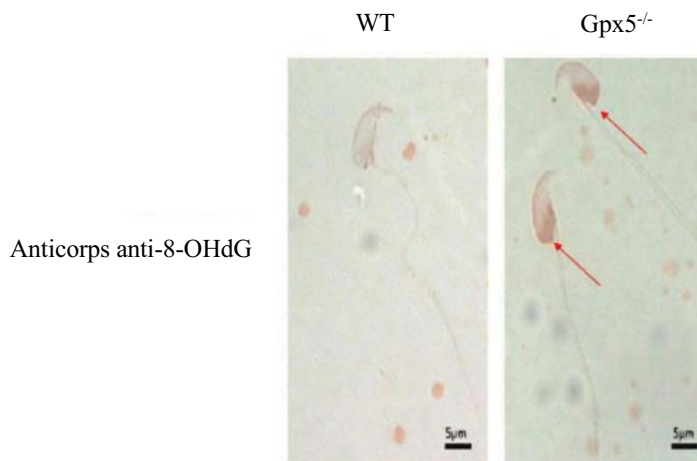


Figure 46 : ADN spermatique oxydé des spermatozoïdes issus de mâles $Gpx5^{-/-}$. Immunodétection de la guanine oxydée (8-OHdG) sur les spermatozoïdes des queues d'épididyme issues de souris mâles sauvages (WT) et $Gpx5^{-/-}$ âgées de 6 mois. Observation d'une coloration brune qui marque l'oxydation de l'ADN chez les souris $Gpx5^{-/-}$ et qui se localise en périphérie et basale du noyau spermatique. (Modifiée d'après Chabory *et al.*, 2009).

Plusieurs études menées ces dernières années ont suggéré que les ARNnc spermatiques pouvaient également influencer le développement embryonnaire. Par exemple, un stress nutritionnel chez des rongeurs (régime riche en matière grasse) modifie le *pool* en miARN spermatiques et entraîne des anomalies métaboliques dans les générations suivantes (Fullston et al., 2013). Deux autres études ont montré qu'un régime protéique modifié (augmentation ou diminution de la teneur en protéines) administré à des souris mâles conduit à une augmentation de la quantité d'une famille d'ARNnc, les ARNt fragmentés spermatiques qui sont des ARN dérivés des ARNt (ou tRF ; Chen et al., 2016 ; Grandjean et al., 2015 ; Sharma et al., 2016). Les auteurs constatent également des troubles métaboliques dans la descendance. Un phénotype identique est observé en injectant des ARN spermatiques récupérés chez des mâles en condition de stress, dans des embryons issus de parents n'ayant subi aucun stress (figure 44), établissant ainsi la relation entre les ARNnc et le phénotype (Gapp et al., 2014). Ces ARNnc pourraient provenir du *pool* d'ARN apportés par les épидидymosomes (Reilly et al., 2016 ; Sharma et al., 2016). De plus, ces ARNnc pourraient être le lien entre le stress environnemental subi par le père et les modifications du profil de méthylation de la cytosine dans la descendance, sans modification de la méthylation de l'ADN spermatique, sachant, qu'ils peuvent réguler la méthylation de l'ADN, comme évoqué précédemment.

IV. Les conséquences post-fécondation des dommages oxydants sur le noyau spermatique

Comme nous avons pu le voir précédemment, la balance oxydante est importante dans l'épididyme pour finaliser la compaction du noyau paternel et garantir l'intégrité du noyau spermatique et donc du génome et de l'épigénome paternels qui seront transmis à la descendance à l'issue de la fécondation.

Afin d'étudier l'impact du stress oxydant post-testiculaire sur l'intégrité du noyau spermatique, l'équipe a généré un modèle murin invalidé pour une enzyme antioxydante, la « *glutathion peroxidase 5* » (ou *Gpx5*), créant ainsi un déséquilibre de la balance oxydante dans l'épididyme, lieu de maturation des spermatozoïdes (Aitken et al., 2009 ; Chaborry et al., 2009). Le croisement de souris femelles sauvages (de fertilité avérée) âgées de deux mois, avec des mâles invalidés pour *Gpx5* (*Gpx5*^{-/-}) conduit à une diminution de la fertilité liée à une augmentation de la mortalité périnatale, à des avortements précoces et à des anomalies de développement (figure 45). Dans la queue de l'épididyme des souris *Gpx5*^{-/-}, une augmentation de l'activité enzymatique de recyclage de l'H₂O₂ a été observée, *via* la stimulation de

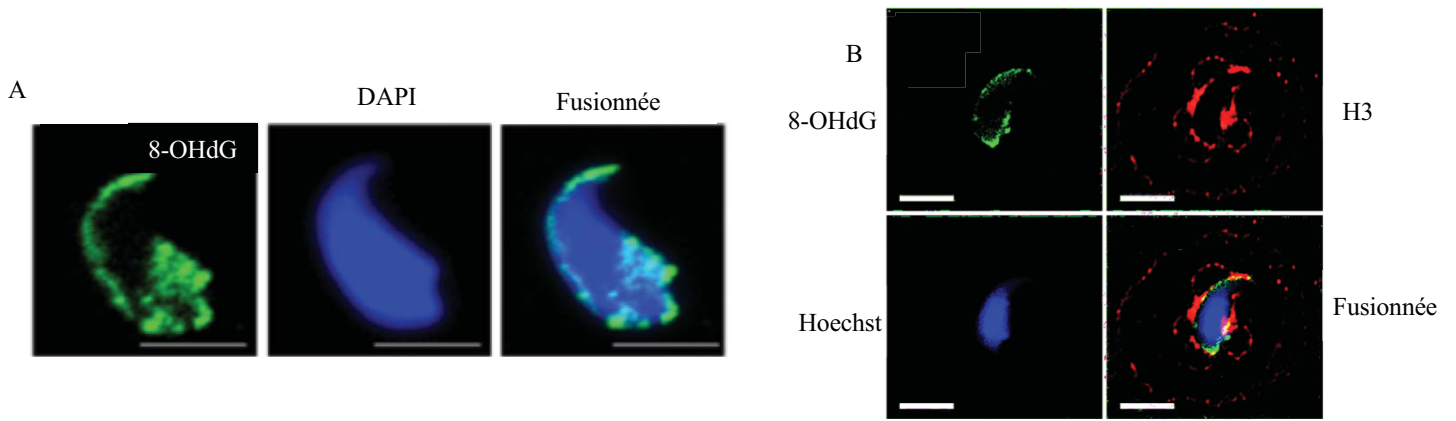


Figure 47 : Immunofluorescence sur l'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes de souris *Gpx5*^{-/-}.

A. Immunofluorescence de la guanine oxydée (8-OHdG) sur les spermatozoïdes des souris *Gpx5*^{-/-}, observée au microscope confocale. Echelle (ligne blanche) : 5 μm.

B. L'immunofluorescence réalisée sur ces spermatozoïdes montre que dans les halos on retrouve le marquage de l'histone H3 (rouge). L'oxydation de l'ADN (8-OHdG ; vert) est liée aux histones persistantes attachées à la matrice nucléaire. Hoechst (bleu) : noyau. Echelle (ligne blanche) : 5 μm.

(Modifiée d'après Noblanc *et al.*, 2013).

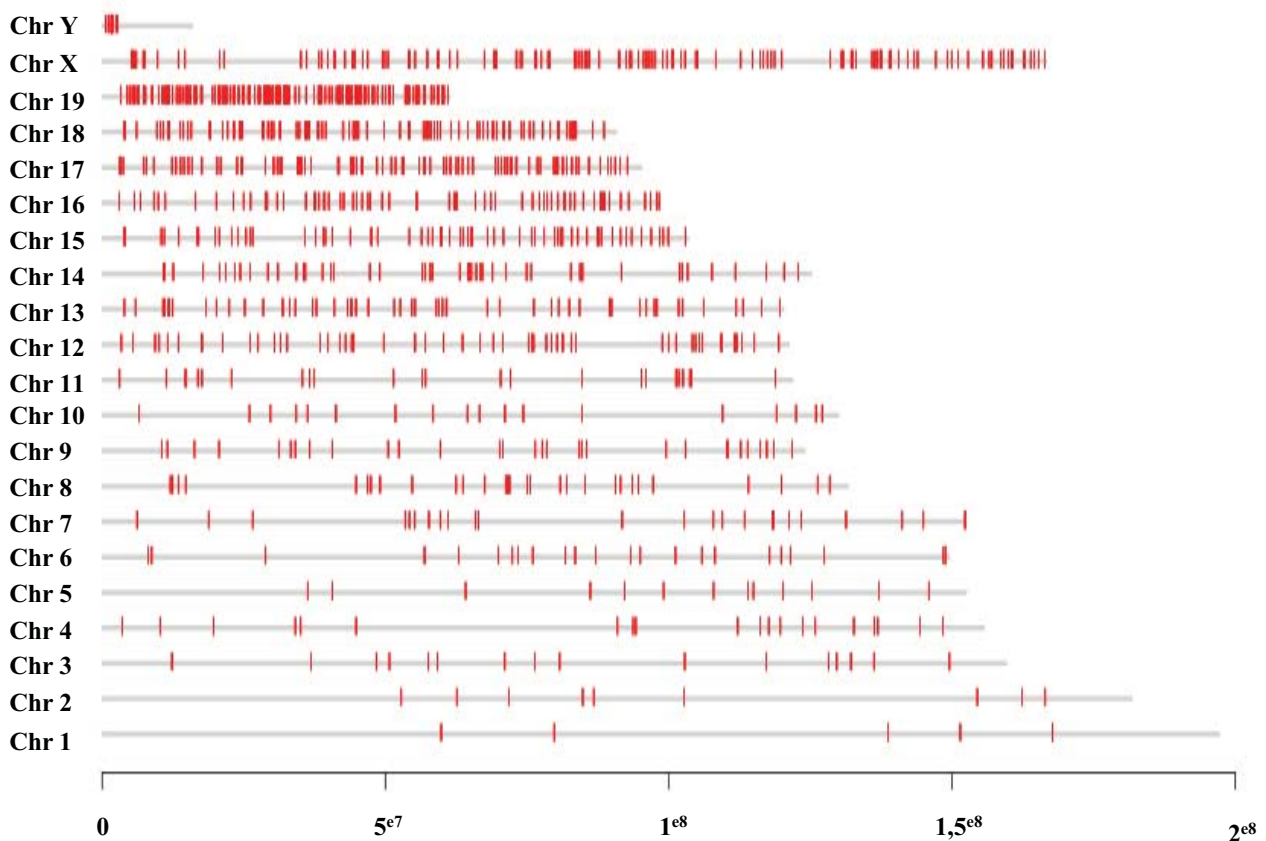


Figure 48 : Cartographie du génome représentant le nombre de *hotspots* d'oxydation.

Chaque barre rouge représente un *hotspot* d'oxydation, obtenu après immunoprécipitation avec l'anticorps 8-OHdG, c'est-à-dire une région d'un million de paires de bases qui est mille fois plus oxydée chez les spermatozoïdes des souris *Gpx5*^{-/-} comparée aux souris sauvages. Les chromosomes sont représentés selon leur taille. On note que le chromosome 19 et la région péri-centromérique du chromosome Y sont particulièrement touchés par l'oxydation.

(Modifiée d'après Kocer *et al.*, 2015).

l'expression d'autres enzymes GPx exprimées dans ce tissu (Gpx1, 3, et 4 en l'occurrence) ainsi que par l'augmentation de l'expression de la catalase et de la GST. Ainsi, la perte de *Gpx5* dans la lumière de l'épididyme provoque un stress oxydant luminal attribué à un défaut de recyclage de l'H₂O₂, que l'épithélium tente de réguler en augmentant la production des autres enzymes antioxydantes locales (Chabory et al., 2009).

L'analyse des spermatozoïdes épидидymaires des souris *Gpx5*^{-/-} n'a montré aucune altération structurelle (morphologie normale) ni fonctionnelle (mobilité et aptitude à féconder normales). Néanmoins, nous observons une augmentation des dommages oxydants nucléaires des gamètes, identifiés par immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-8-OHdG qui reconnaît les guanines oxydées (figures 46, 47). Cette oxydation accrue est aussi visible au niveau de l'épithélium de la queue de l'épididyme où nous observons de même des noyaux oxydés. Cette situation s'accroît avec l'âge des mâles. Le fait que cette diminution de la fertilité et cette augmentation des défauts de la chromatine ne soient visibles qu'à partir d'un certain âge est probablement à relier au constat que les capacités antioxydantes des cellules et de l'organisme en général diminuent avec le vieillissement, limitant ainsi la compensation de la perte de *Gpx5* (Chabory et al., 2009).

Ces dommages oxydants à l'ADN, comme nous l'avons vu, peuvent être à l'origine de mutations lors de la réparation de l'ADN paternel par l'ovocyte après la fécondation (*cf.* § II.C.b.3. Oxydation des acides nucléiques) ce qui pourrait expliquer pourquoi les souriceaux des mâles *Gpx5*^{-/-} ayant fécondé des souris femelles normales présentent une mortalité périnatale et des problèmes de développement embryonnaire. En analysant de façon plus précise les dommages oxydants au noyau spermatique, par immunofluorescence (anticorps anti-8-OHdG), l'équipe a noté que les dommages étaient localisés aux régions basales et périphériques du noyau spermatique, en particulier au niveau des régions liées à la matrice nucléaire (figures 23, 46, 47 ; Noblanc et al., 2013).

Une analyse par immunoprécipitation de l'ADN oxydé des spermatozoïdes *Gpx5*^{-/-}, en utilisant l'anticorps anti-8-OHdG, a montré que les chromosomes murins ne sont pas affectés de façon homogène par l'oxydation (figure 48 ; Kocer et al., 2015). En effet, les petits chromosomes tels que les autosomes 17 à 19 ou le chromosome sexuel Y sont particulièrement touchés par l'oxydation dans les spermatozoïdes de souris (figure 46).

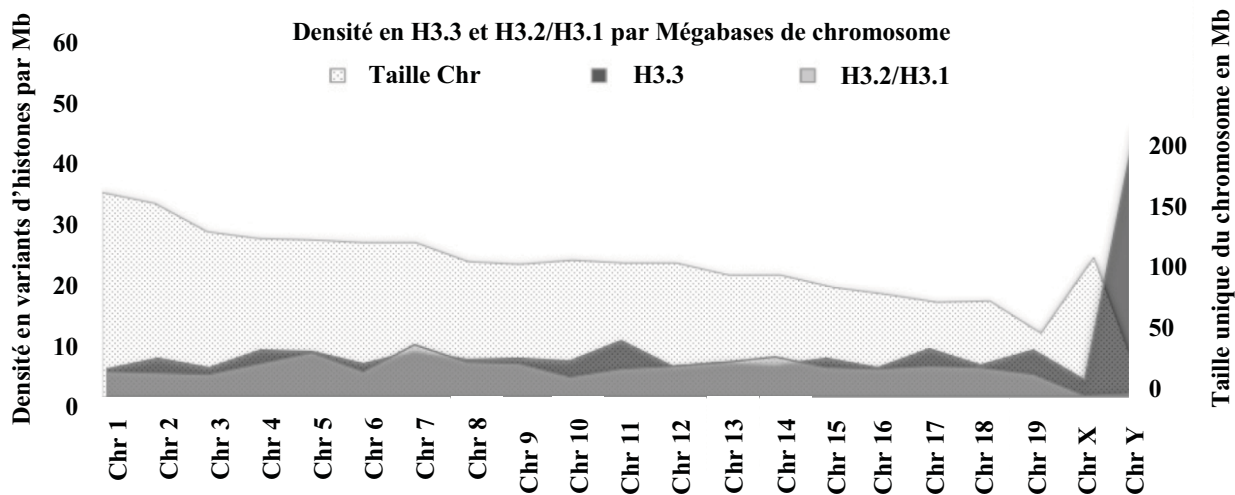
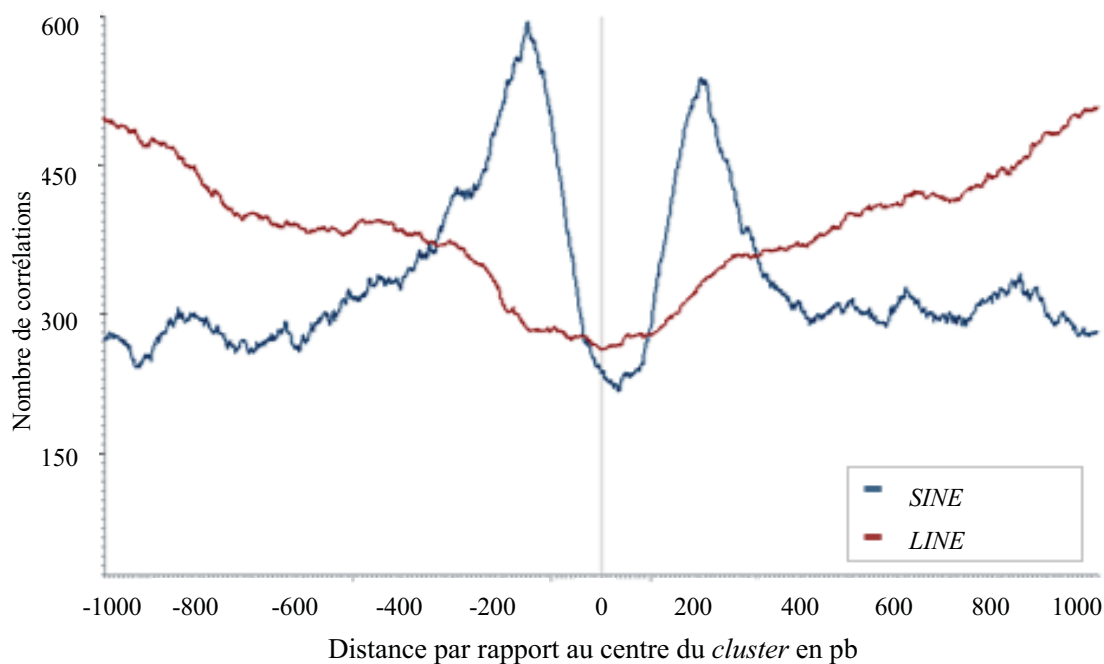


Figure 49 : Distribution des variants d'histones H3 entre les chromosomes murins.

Graphique montrant la densité des régions ADN associées à H3.3 (gris foncé) ou celles associées à H3.2/H3.1 (gris pâle) par mégabases sur le chromosome. La surface en points représente la taille des chromosomes en mégabases (Mb). Chr : Chromosome.

(Modifiée d'après Kocer *et al.*, 2015).



	Corrélations avec <i>SINE</i>		Corrélations avec <i>LINE</i>	
	Nb. Clusters	Nb. <i>SINE</i>	Nb. Clusters	Nb. <i>LINE</i>
<i>Gpx5</i> ^{-/-}	4768 (27.58%)	6286 (1.93%)	1483 (8.58%)	1613 (1.13%)

Figure 50 : Corrélation des séquences oxydées avec les séquences répétées.

Schéma représentant l'enrichissement de séquences répétées type *SINE* (ligne bleue) et de type *LINE* (ligne rouge) au centre des séquences oxydées des spermatozoïdes *Gpx5*^{-/-}. L'axe des ordonnées (Y) indique le nombre de corrélations et l'axe des abscisses (X) montre la distance en pb du centre des séquences oxydées (arbitrairement définie à 0). Pour les séquences de type *SINE* (ligne bleue), deux pics apparaissent autour de 200 pb du centre. Les régions oxydées ont une taille de 400 pb suggérant que les séquences oxydées encadrent de chaque côté des régions *SINE*. Par contre, les séquences de type *LINE*, sont inversement corrélées aux séquences oxydées. Le tableau indique le nombre de séquences oxydées et le pourcentage de séquences *LINE* ou *SINE* correspondantes. Nb : Nombre ; pb : paires de bases

(Modifiée d'après Kocer *et al.*, 2015).

Deux hypothèses non exclusives pour expliquer cette différence d'oxydation entre les chromosomes pourraient être :

- les plus petits chromosomes seraient plus riches en nucléosomes que les grands, donc moins condensés, et par voie de conséquence plus susceptibles d'être altérés.
- les chromosomes les plus petits pourraient être localisés dans les régions plus accessibles aux agressions oxydantes (en périphérie et/ou en région basale du noyau spermatique, proche d'une source importante d'espèces oxygénées réactives représentée par les mitochondries de la pièce intermédiaire ; Noblanc et al., 2013).

Suite aux travaux d'Erkek (Erkek et al., 2013) et à l'analyse bio-informatique des séquences oxydées immunoprécipitées (Kocer et al., 2015), nous avons démontré que les chromosomes ne présentent globalement pas de différence de densité en nucléosomes à l'exception du chromosome Y qui effectivement comporte plus d'histones que les autres chromosomes (figure 49). Ainsi, c'est en majorité le positionnement des chromosomes dans le noyau spermatique qui permettrait d'expliquer cette différence de susceptibilité vis-à-vis de l'oxydation. L'analyse bio-informatique conduite dans l'étude de Kocer et al., 2015 fait ressortir également une forte corrélation des séquences oxydées avec des séquences répétées de type *SINE* (*short interspersed repeat elements* ; figure 50). Dans les cellules somatiques, les *SINE* possèdent de nombreuses fonctions dans : l'épissage alternatif, la liaison de facteurs de transcription, la régulation de la méthylation et de la structure de la chromatine (Dixon et al., 2012 ; Ichiyangi, 2013). De plus, les *SINE* sont retrouvés associés aux nucléosomes (Ichiyangi, 2013) et enrichis au niveau de régions *MAR* (Tikhonov et al., 2001). Dans le spermatozoïde mature, les *SINE* sont également retrouvés sur des régions qui ne sont pas méthylées, ce qui est en accord avec l'analyse bio-informatique des régions oxydées. En effet, il a été montré qu'il n'y a pas de corrélation entre les séquences oxydées et les régions CpG (Molaro et al., 2011).

Projet de Recherche

Les souris générées au laboratoire invalidées pour le gène *Gpx5* (*Gpx5*^{-/-}) ainsi que les souris invalidées à la fois pour *Sngpx4* et *Gpx5* (*Sngpx4;Gpx5*^{-/-} ou DKO) constituent des modèles intéressants pour étudier l'impact du stress oxydant sur l'intégrité à la fois du génome et de l'épigénome du spermatozoïde murin.

Mon projet de recherche durant ma thèse a été organisé autour de plusieurs questions fondamentales qui ont consisté à :

- ✚ Comprendre l'organisation tridimensionnelle des chromosomes du spermatozoïde murin afin de vérifier si la position des chromosomes dans le noyau spermatique murin permettait d'expliquer la différence de susceptibilité à l'oxydation notée entre les chromosomes. En effet, à la suite de l'analyse bio-informatique des séquences oxydées, les petits chromosomes ont été trouvés plus affectés par l'oxydation sans pour autant contenir plus de nucléosomes que les grands. Comme l'oxydation de l'ADN spermatique semblait être restreinte à la périphérie et à la région basale du noyau spermatique il m'a été demandé de vérifier expérimentalement cette hypothèse.
- ✚ Mettre au point une approche d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*) spermatique murine associée aux histones persistantes afin de séparer les séquences nucléosomales liées ou non à la matrice nucléaire et d'identifier les gènes retrouvés dans chaque fraction. Effectivement, plusieurs approches de *ChIP* avec des anticorps anti-histones sur la chromatine spermatique murine et humaine ont permis déjà d'identifier certains gènes liés à ces histones spermatiques. Néanmoins, la vision n'est que partielle puisqu'une partie des histones persistantes dans le noyau spermatique est solidement attachée à la matrice nucléaire et donc de fait exclue des protocoles classiques de *ChIP*.
- ✚ Étudier si un stress oxydant épидидymaire peut altérer le méthylome spermatique et conduire à une déméthylation anormale du *pronucleus* mâle après la fécondation. Le méthylome spermatique qui est caractérisé par un taux important de 5-méthylcytosine (5mC) va subir, après la fécondation, une déméthylation par l'action d'une enzyme TET oxydant la 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). Néanmoins, certaines régions devront être protégées de cette déméthylation comme les régions portant les gènes à empreinte parentale et les séquences répétées (type *SINE*, *LINE*...). Ainsi, des perturbations du méthylome spermatique dans ces régions pourraient conduire à des situations d'infertilité et/ou entraîner des défauts de développement embryonnaire. En

effet, il est envisageable qu'en cas de stress oxydant au niveau épидидymaire, la 5mC puisse subir une oxydation spontanée dans des régions qui normalement ne sont pas ciblées par l'activité TET pouvant induire une déméthylation anormale de ces régions après la fécondation et conduire à des défauts de développement embryonnaire.

Dans un prolongement plus clinique, j'ai pu dans le cours de ma thèse participer à une étude dont le but a été de tester l'éventuel effet bénéfique d'une supplémentation orale antioxydante sur le niveau d'altérations du noyau spermatique en utilisant les modèles murins du laboratoire dans une approche préclinique. L'équipe a ainsi été sollicitée pour tester un mélange d'antioxydants commercialisée sous le nom de Fertilix® par la société CellOxess LLC (Pennington, New Jersey, États-Unis). En effet, comme nous avons pu le voir le génome spermatique se retrouve modifié en présence d'un stress oxydant épидидymaire. Or, dans le modèle *Gpx5*^{-/-}, il est observé dans les premiers mois de la souris, une augmentation de l'activité enzymatique antioxydante épидидymaire afin de pallier l'absence de *Gpx5* (Chabory et al., 2009). A partir de ce constat, il était intéressant de voir si un apport exogène d'antioxydants pouvait permettre de compenser l'absence de *Gpx5* et rétablir l'équilibre redox au niveau épидидymaire afin de protéger le génome paternel du stress oxydant. La littérature foisonne d'essais de supplémentation orale antioxydante chez l'homme mais dont l'efficacité reste encore très controversée pour des raisons qui seront exposées plus loin (pour revue voir Gharagozloo and Aitken, 2011). L'apport du modèle murin dans un contexte préclinique est important car il permet de s'affranchir d'un certain nombre de paramètres qui biaisent les interprétations réalisées avec des cohortes de patients. Par ailleurs, dans cette abondante littérature, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer l'impact d'une telle supplémentation antioxydante sur le niveau d'oxydation de l'ADN spermatique, un critère important de l'intégrité nucléaire et de la réussite de la fécondation et du développement du futur embryon.

***Matériels et
Méthodes***

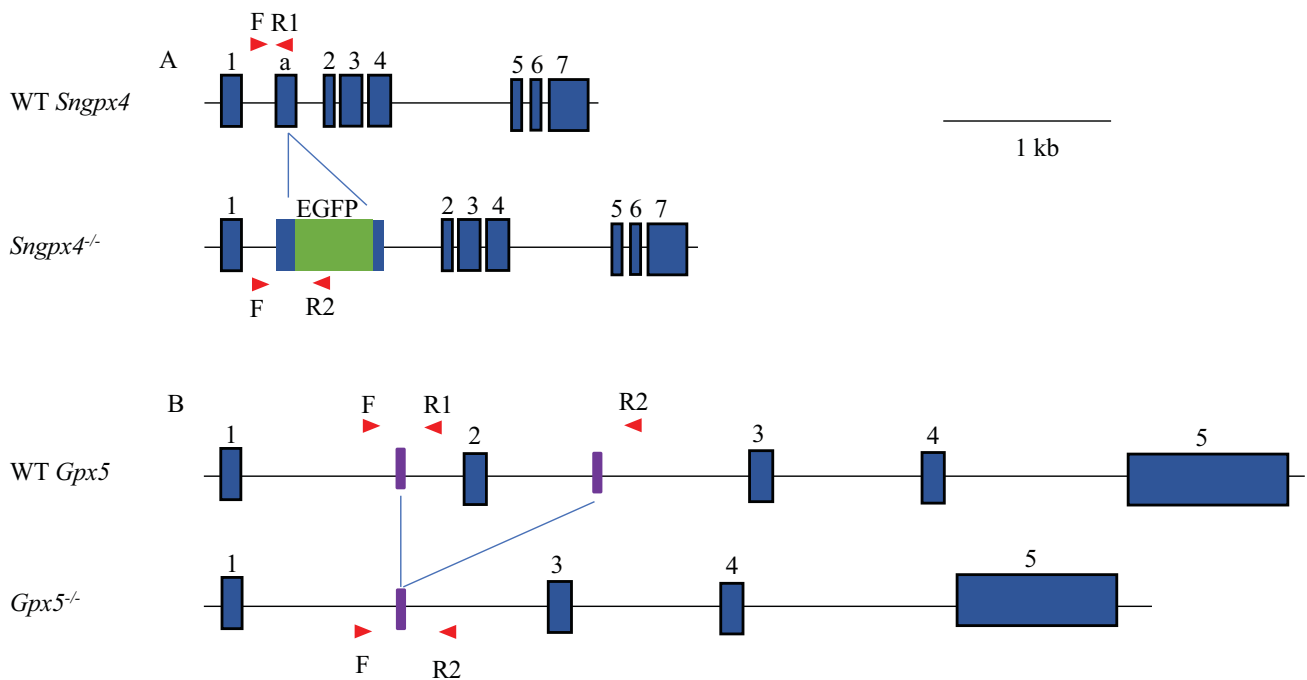


Figure 51 : L'organisation des allèles sauvages et invalidés des gènes codant pour SNGPx4 et GPx5

Les deux gènes invalidés chez les souris DKO, *Gpx4* (A) et *Gpx5* (B), sont ici représentés à l'échelle. Les exons sont colorés en bleus et les séquences ajoutées (A) en vertes ou excisées (B) en violet. La position et le sens des amorces (F, R1 et R2) sont indiquées par des flèches rouges sur chaque allèle de chaque gène.

I. Les Animaux

A. Hébergement

Les souris utilisées lors de cette étude sont élevées en conditions environnementales contrôlées au sein d'une animalerie habilitée : la température ambiante est maintenue constante à 22°C et l'éclairage consiste en une alternance de périodes de lumière et d'obscurité de 12 heures (h). L'eau et la nourriture sont disponibles *ad libitum*. Elles sont nourries avec un régime d'entretien (*Global diet*, 2016, Harlan, Gannat, France), à l'exception des souris femelles gestantes et allaitantes (*Global diet*, 2018, Harlan, Gannat, France).

B. Modèles murins

Les expérimentations sont réalisées sur des souris de souches C57Bl/6 de quatre génotypes différents (figure 51) :

- ✚ Sauvages (*wild type*, WT) ;
- ✚ *Sngpx4*^{-/-}, invalidées pour l'isoforme spermatique nucléaire de GPx4 par insertion homozygote de la séquence du gène *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*) dans l'exon alternatif Ea du gène *Gpx4* (Conrad et al., 2005) ;
- ✚ *Gpx5*^{-/-}, invalidées pour la protéine GPx5 par délétion homozygote de l'exon 2 du gène *Gpx5* (Chabory et al., 2009) ;
- ✚ *Sngpx4;Gpx5*^{-/-}, appelées « *double knock-out* » (DKO), invalidées pour les protéines SNGPx4 et GPx5.

C. Génotypage

a. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des souris est obtenu à partir de tissus. Les tissus sont incubés pendant une nuit à 55°C dans du tampon de lyse (Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, NaCl 200 mM, SDS 0,2 %, Protéinase K 0,08 mg/mL). Après une centrifugation de 10 minutes (min) à 10 000xg, un volume de surnageant est prélevé puis additionné de 2 volumes d'éthanol absolu. Une agitation par inversion permet de former un précipité d'ADN qui est culoté par une centrifugation de 10 minutes à 10 000xg. Le surnageant est éliminé et l'ADN est séché à l'air libre. Il est ensuite solubilisé dans 100 µL d'eau bidistillée stérile, par une incubation d'une nuit à 4°C puis de 15 min à 55°C. Il peut alors être stocké à -20°C.

Gène cible	Chromosome	Séquence des amorces de 5' en 3'	Taille (en pb)	T _a
<i>Sngpx4</i>	Chr19	F-TCG-GCG-GCG-CCT-TGG-CTA-CCG-GC-TC	119 342	60°C
		R1-GGA-TCC-GCC-GCG-CTG-TCT-GCA-GCG-TCC-C		
		R2-TGA-AG-AAG-TCG-TGC-TGC-TTC-ATG-TGG		
<i>Gpx5</i>	Chr13	F-GTG-TCT-GAG-AAT-CTA-GTC-CTA-GC	263 1468/278	60°C
		R1-GTG-ACA-GTT-TTC-TCA-GGG-GTT-GG		
		R2-CTG-CCT-TGT-GAA-GGT-TGA-CAG-G		
<i>Hox9</i>	Chr6	F-GGA-GGG-AGG-GGA-GTA-ACA-AA	144	60°C
		R-TCA-CCT-CGC-CTA-GTT-TCT-GG		
<i>Foxd3</i>	Chr4	F-GGT-GCG-CCA-CGT-CTA-ATA-AC	102	60°C
		R-GTC-GGA-AAT-GAG-GTG-GAA-AC		
<i>Gata6</i>	Chr18	F-CTG-GAT-CCC-TCC-TCC-TTC-TC	154	60°C
		R-TAC-TGC-TCT-GCC-GGA-AAA-CT		
<i>Bmp4</i>	Chr14	F-GCC-ACC-CTT-TAA-ACC-AAT-CC	126	57°C
		R-ACT-GCT-GCC-CAA-ACT-GAT-GA		
<i>Gpx1</i>	Chr9	F-GTC-CAC-CGT-GTA-TGC-CTT-CT	217	62°C
		R-CTC-CTG-GTG-TCC-GAA-CTG-AT		
<i>Gpx3</i>	Chr11	F-TCG-GAG-ATA-CTC-CCC-AGT-C	211	58°C
		R-AGT-TCC-AGC-GGA-TGT-CAT-GG		
<i>Gstr</i>	Chr19	F-AGC-TTT-CAT-CGT-GGG-TGA-CC	187	59°C
		R-GGG-ACG-GTT-CAC-ATG-TTC-CG		
<i>Prdx3</i>	Chr19	F-CAG-ACA-TAC-TGT-GGT-CTG-CC	151	59°C
		R-AAG-TCG-TCG-AGA-CTC-AGC-TC		
<i>Prdx6</i>	Chr1	F-CAC-AGA-ACT-TGG-CAG-AGC-TG	219	59°C
		R-TCG-ACT-GGA-TCC-AAC-ATG-CC		
<i>Txn1</i>	Chr 4	F-TGG-TGA-AGC-TGA-TCG-AGA-GC	149	59°C
		R-GGA-ATA-CTT-GTC-ACA-GAG-GG		
<i>Txn1l</i>	Chr 18	F-ACT-GTG-GCA-TTC-AAT-CAG-CC	144	57°C
		R-AGT-TGG-CTC-ACT-CCT-TTC-CG		

Tableau 3 : Liste des *primers* utilisés pour les PCR

Pb : paires de bases ; Ta : température d'hybridation ; F : *forward* ; R : *reverse*

b. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour établir la présence homozygote de l'allèle sauvage ou muté pour chacun des deux gènes chez chaque souris, des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) indépendantes sont réalisées suivant le même protocole. L'ADN génomique (1 μ L) est additionné de 2,5 mM de $MgCl_2$, de 400 mM de dNTPs, de 400 nM de chacune des 2 amorces (*forward*/F et *reverse*/R ; tableau 3 ; figure 51) et de 1,25 U de *GoTaq Flexi DNA polymerase* (Promega, USA) pour un volume final de 25 μ L. Les réactions de polymérisation sont effectuées indépendamment dans un thermocycleur (*Veriti, 96well Thermal Cycler, Applied Biosystems*).

L'analyse de la taille des produits de PCR est effectuée par l'électrophorèse de 12 μ L d'échantillon sur gel d'agarose à 2 %, en présence de bromure d'éthidium (BET). Les résultats sont révélés sur un banc UV.

c. Traitements et manipulations

1. Traitement oral antioxydant

Afin d'étudier l'effet d'une supplémentation antioxydante sur une infertilité masculine due à des dommages oxydants, des souris sauvages et *Gpx5*^{-/-} de 12 mois sont soumises à un traitement oral antioxydant de 8 semaines. Ce traitement est un mélange de différents antioxydants nutraceutiques du nom de Fertilix[®], produit par la société de biotechnologie CelloXess LLC (Pennington, New Jersey, USA). Il est administré aux souris dans leur eau de boisson (eau minérale naturelle Volvic[®], Danone, France), disponible *ad libitum*, suivant le dosage recommandé par le fabricant qui est de 7,5 mg/souris/jour, lors de conditions normales d'élevage. Les biberons d'eau sont pesés toutes les semaines pour contrôler la prise de boisson. De façon à assurer une meilleure conservation du traitement, il est renouvelé une fois par semaine et les biberons sont masqués vis-à-vis de la lumière.

2. Test de fertilité

Le test de fertilité a été réalisée en croisant des souris mâles des quatre lots de souris (WT et *Gpx5*^{-/-} traitées ou non avec le Fertilix[®]) avec des femelles vierges de souche CD1, âgées de 6 à 7 semaines (Harlan, Gannat, France). Avant la mise en contact avec les mâles, les cycles sexuels des femelles ont été synchronisés. Le délai de conception, qui correspond au nombre de jours écoulés entre la mise en présence des souris mâles et femelles et la naissance des souriceaux, ainsi que le nombre de petits par portée ont été mesurés.

II. Analyses

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale.

A. Tissulaires

a. Tissus

Les tissus prélevés lors de la dissection (épididyme, testicule, foie...) sont immédiatement traités. Les tissus nécessaires à une future extraction de l'ARN ou des protéines sont placés dans des tubes stériles, congelés dans l'azote liquide, puis transférés à -80°C.

b. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Afin de mesurer le niveau de peroxydation lipidique nous avons utilisé le kit *TBARS Assay Kit* (Cayman ; Réf : 10009055) comme décrit par le fournisseur. Brièvement, le plasma sanguin, le foie et la queue d'épididyme qui ont été récupérés sur chaque souris mâle avant sacrifice et congelés à -80°C, sont décongelés doucement sur la glace. Pour 100 µl d'échantillon (plasma ou tissus broyés) ajoutez 100 µl de la solution de SDS et 4 ml de réactif coloré, contenant de l'acide acétique, de l'acide thiobarbiturique et de l'hydroxyde de sodium selon les concentrations du fournisseur. Faire bouillir la solution pendant 1 heure puis les incuber 10 min dans la glace et centrifuger les tubes à 1,600xg pendant 10 min à 4°C. Déposer en doublons pour chaque échantillon et pour la gamme standard de MDA, 150 µl par puits et lire l'absorbance à 530-540 nm. Calculer les valeurs de MDA pour chaque échantillon de la courbe standard et pour les échantillons testés.

c. PCR quantitative en temps réel

Les animaux ont été sacrifiés, le foie, les testicules, les têtes et queues d'épididyme, ont été prélevés et une évaluation quantitative (par qRT-PCR) de l'accumulation des ARN messagers d'enzymes antioxydantes a été réalisée pour chacune des souris mâles des quatre lots (WT et *Gpx5*^{-/-} traitées ou non avec le Fertilix®). Le foie étant l'organe de contrôle clé du métabolisme (détoxification) étant donné que notre supplémentation est administrée par voie orale, le testicule le lieu de production des spermatozoïdes et la queue d'épididyme étant l'organe de stockage des spermatozoïdes (figure 28). Les amorces choisies pour chacun des gènes sont identiques à celles utilisées par Noblanc en 2012 (tableau 3 ; Noblanc et al., 2012).

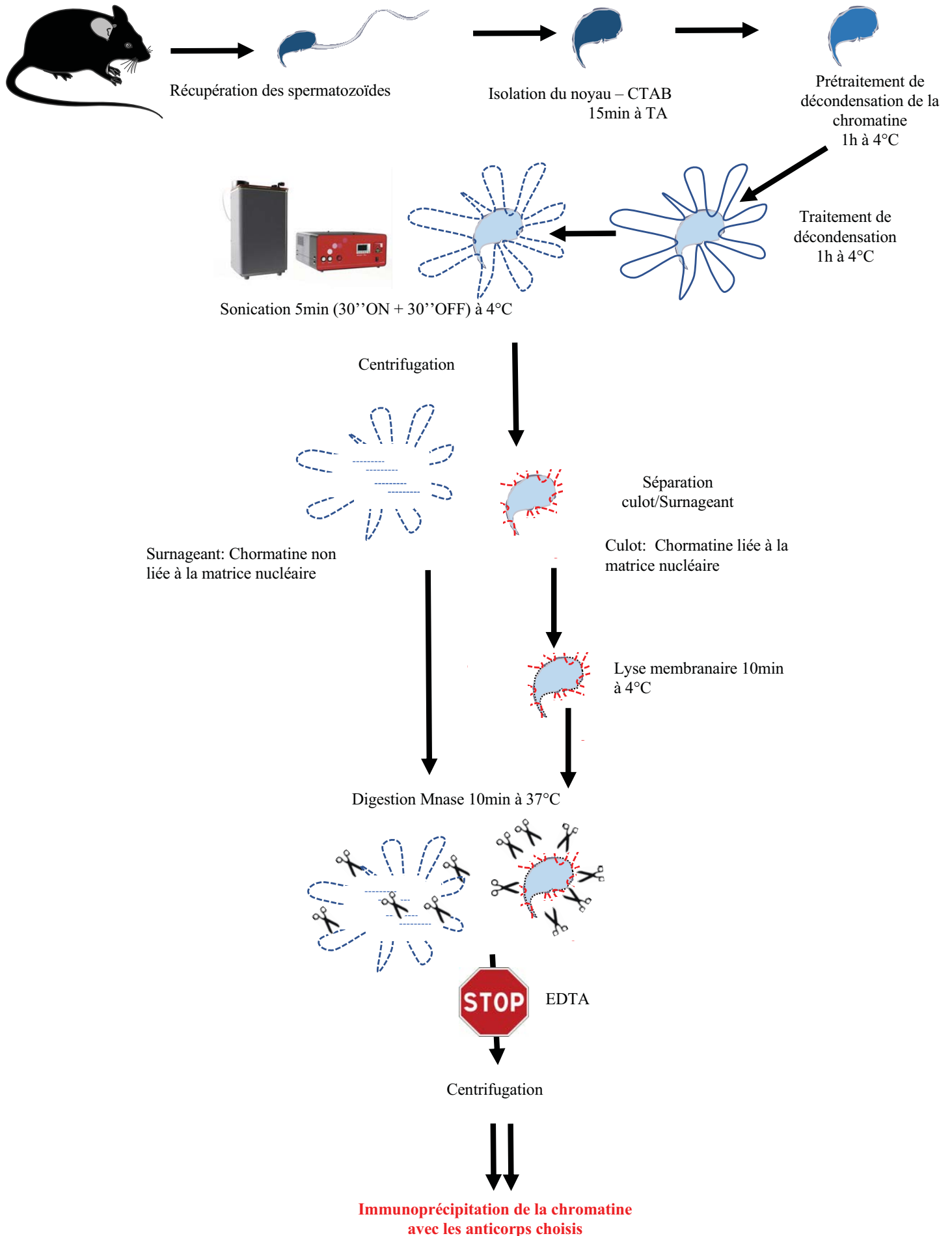


Figure 52 : Protocole de séparation de la chromatine spermatique attachée ou non à la matrice nucléaire.

CTAB : *Cetyl trimethylammonium bromide* ; EDTA : *Ethylenediaminetetraacetic acid* ; Mnase : *micrococcal nuclease* ; TA : Température ambiante

B. Spermatiques

a. Immunoprécipitation de la chromatine

Afin d'analyser les séquences génomiques liées aux histones et notamment aux variants d'histones, un protocole d'immunoprécipitation de la chromatine spermatique est réalisé. Mais à la différence des protocoles classiques d'extraction d'ADN spermatique (Hisano et al., 2013), ici nous avons développé une approche séparant l'ADN lié à la matrice nucléaire de l'ADN retrouvé dans les halos spermatiques (figures 23, 47 et 52 ; Noblanc et al., 2013).

Les spermatozoïdes sont collectés à partir des queues d'épididyme (WT et *Gpx5*^{-/-}), puis placées dans du milieu Tris-HCl pH8 à 50 mM.

Après centrifugation à 720xg, 5 min, les spermatozoïdes sont re-suspendus dans un mélange de Tris-HCl à 50 mM pH8, PMSF 1mM et 1% de CTAB, à 4°C et vortexer régulièrement, afin de retirer les flagelles des spermatozoïdes qui contiennent les mitochondries localisées dans la pièce intermédiaire. Cette procédure évite d'avoir une contamination *via* l'ADN mitochondriale. Les culots sont ensuite lavés avec du Tris-HCl à 50 mM pH8, deux fois après centrifugation à 3000xg 5 min à 4°C. Les spermatozoïdes sont incubés 1h avec le milieu « prétraitement » (PBS 1X, 0.5% Triton X-100, 50 mM DTT, 1 mM PMSF, PI et 0,25 M LiCl) puis avec un milieu « traitement » (Tris-HCl 50 mM pH8, 0,3 M de sucrose, 1M KCl, 1M MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF et PI) pour une durée et une température identique. Ces traitements vont décondenser la chromatine du noyau spermatique. Les différents tubes vont subir une sonication pendant 5 min. Après une centrifugation à 5000xg, 10 min à 4°C, les surnageants sont récupérés et les culots sont re-suspendus dans le tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH8, 1 mM PMSF, 10 mM KCl, 0.5% NP-40, 15 mM NaCl, 2 mM EDTA et PI) à 4°C, pour permettre de ne récupérer que la chromatine. Les surnageants et les culots sont digérés par la MNase (1000U, 88216, Thermofisher) après ajout de 2mM de CaCl₂ ainsi que de 10mM de KCl dans les culots. Les tubes sont incubés 10 min à 37°C avec une agitation dans un thermomixer et la digestion est stoppée après ajout de 20 mM EDTA. Avant centrifugation à 5000xg, 10 min à 4°C les tubes sont agités à 37°C pendant 30 min dans le thermomixer (1400 rpm). Les surnageants de chaque tube sont récupérés et les culots sont conservés à -80°C dans une solution de Tris-HCl pH8 50 mM et 10 mM EDTA.

Afin d'enlever l'affinité de la chromatine avec les billes, les échantillons sont mis en rotation lente avec 45 µl de billes (*Pierce Protein A/G magnetic beads*, Fisher Scientific, 78609) préalablement lavées, pendant 1h à 4°C.

Antigène	Type	Fournisseur	Référence	Dilution	Hôte
8-OHdG	Monoclonal (15A3)	Novus Biologicals	NB110-96878	IF : 1/500 SL : 1/1000	Souris
5mC	Monoclonal (33D3)	Diagenode	C15200081	IF, SI : 1/250	Souris
5hmC	Polyclonal	Active Motif	39769	IF, SI : 1/500	Lapin
Histone H3	Polyclonal	Abcam	ab1791	IF : 1/200 ; ChIP	Lapin
Histone TH2B	Polyclonal	Abcam	ab23913	IF : 1/100 ; ChIP	Lapin
Histone H2A.Z	Polyclonal	Abcam	ab4174	IF : 1/250 ChIP	Lapin
IgG	Polyclonal	Abcam	ab37415	ChIP	Lapin
IgG de souris (HRP)	Polyclonal	PARIS anticorps	BI 2413C	SI : 1/5000	Chèvre
IgG de lapin (HRP)	Polyclonal	PARIS anticorps	BI 2413C	SI : 1/5000	Chèvre
IgG de souris (Alexa)	Polyclonal	Molecular probes, Invitrogen	A488 : A11017 A555 : A21425	IF : 1/1000	Chèvre
IgG de lapin (Alexa)	Polyclonal	Molecular probes, Invitrogen	A488 : A11070 A555 : A21430	IF : 1/1000	Chèvre

Tableau 4 : Les anticorps utilisés en ChIP, immunofluorescence et immunoblot

ChIP : *Chromatin Immunoprecipitation* ; SI : *immunoblot* ; HRP : *horseradish peroxidase* ; IF : *Immunofluorescence*

Sur un rack magnétique, les surnageants sont récupérés et séparés en différents tubes, 10% du volume pour *l'input*, 10 μ l pour le western-blot et le volume restant pour l'immunoprécipitation. Les billes sont resuspendues dans du Tris-HCl 50 mM pH8 et EDTA 10 mM et stockées à -80°C.

Nous ajoutons 5 μ g d'anticorps (tableau 4) au tube surnageant et culot (volume restant) et incubons toute la nuit à 4°C en rotation lente. Le lendemain, sur un rack magnétique, les surnageants sont jetés et les billes nettoyées deux fois avec une solution '*low salt*' (20 mM de Tris-HCl pH8, 150 mM de NaCl, 0,1% de SDS, 1% de Triton X-100 et 2 mM EDTA), une fois avec la solution '*high salt*' (20 mM de Tris-HCl pH8, 300 mM de NaCl, 0,1% de SDS, 1% de Triton X-100 et 2 mM EDTA), une solution de lithium (10 mM de Tris-HCl pH8, 0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% acide déoxycholique, 1 mM EDTA) et une solution de TE (Tris-HCl 50 mM et EDTA 10 mM), afin de récupérer la chromatine immunoprécipitée.

Les billes sont ensuite lavées avec une solution d'éluion (TE, 1% SDS et 0,1 M NaHCO₃) et agitées pendant 15 min dans le thermomixer à 25°C. Les billes sont ensuite stockées à -80°C dans une solution de TE. Les deux surnageants de chaque tube sont rassemblés en un seul tube et nous ajoutons, ainsi que dans les tubes *inputs*, 0,4 mg/ml de protéinase K et 1% de β -mercaptoéthanol avant une incubation à 65°C toute la nuit.

Le lendemain, nous ajoutons un volume de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1) à chaque tube et nous mélangeons par inversion. Après une centrifugation de 5100xg, 10 min à température ambiante (TA) nous récupérons la phase aqueuse supérieure et nous répétons l'opération jusqu'à obtenir une interphase propre. Pour faire disparaître les traces de phénol nous ajoutons un volume de chloroforme : alcool isoamylique (25 : 1) et nous répétons jusqu'à également obtenir une interphase propre. L'ADN est ensuite précipité en ajoutant de l'acétate de sodium à pH 5,2 et deux volumes d'éthanol à 95% et par incubation toute la nuit à -20°C.

Le lendemain, les tubes sont centrifugés à 5100xg pendant 5 min à température ambiante, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec de l'éthanol à 70° pendant 5 min à température ambiante. Après une nouvelle centrifugation, les culots re-suspendus avec du TE et de la RNase A (20 μ g/ml). La concentration et la pureté de l'ADN est mesurée par Nanodrop et par une quantification par fluorescence (SybrGold, S11494, *Life technologies*) en ng/ μ l. Les échantillons sont stockés à -80°C avant séquençage.

b. Immunofluorescence

La présence et la localisation nucléaire de la méthylation de l'ADN est déterminée par une immunofluorescence dans des conditions perméabilisantes sur les spermatozoïdes des souris WT et transgéniques. Les spermatozoïdes en suspension dans du milieu WH sont centrifugés pendant 5 min à 560xg, lavés avec du PBS 1X, avant d'être étalés sur lame Superfrost® (Menzel-Gläser, Allemagne), à raison de 200 000 spermatozoïdes/lame. Les lames sont séchées 1h à TA et incubées pendant 30 min à 4°C dans un milieu fixateur (4% de PFA) puis de nouveau séchées à TA pendant 1h. Les lames sont ensuite réhydratées par 2 bains successifs de 5 min dans du PBS 1X et perméabilisées dans du PBS 1X – Triton X-100 1%. Elles sont alors incubées avec un agent dénaturant, l'HCl 4N à 37°C puis lavées avec du PBS 1X pendant 5 min. Un lavage avec du PBS 1X-Triton X-100 0,1% de 10 min est effectué avant la saturation d'1h dans un tampon de saturation PBS 1X-Triton X-100 0,1% BSA 1% et NGS 1%. Les lames sont alors incubées avec l'anticorps primaire (tableau 4) dilué dans le tampon de saturation pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont lavées 3 fois dans du PBS 1X, Triton X-100 1 %, puis incubées avec l'anticorps secondaire (tableau 4) dilué dans le tampon de saturation pendant 1h à TA. Elles subissent alors 2 lavages de 5 min dans du PBS 1X et les noyaux sont repérés par du Hœchst. Les lames sont ensuite montées avec du PBS 1X/glycérol (1 : 1), puis conservées à 4°C avant observation. Lors de la réalisation d'un double marquage en fluorescence, les deux anticorps primaires sont dilués dans le même tampon de saturation. Afin de détecter l'oxydation de l'ADN spermatique, nous procédons au protocole décrit dans (Noblanc et al., 2013). Les lames d'immunofluorescence sont observées avec un microscope confocale SPE (Leica Microsystems, Allemagne) avec un grossissement de x40.

c. Extraction ADN spermatique

Les queues d'épididyme sont prélevées sur les souris des différents génotypes et les spermatozoïdes sont récupérés dans du Tris-HCl 50 mM pH8 à 37°C. Les tissus sont dilacérés afin de libérer les gamètes dans le milieu WH, dans lequel ils diffusent durant 15 min à 37°C. La suspension de spermatozoïdes est ensuite centrifugée à 760xg, 10 min puis le culot est lavé avec du Tris-HCl 50 mM à pH8. Le culot est ensuite incubé 15 min à TA avec du Tris-HCl 50 mM pH8 et 1% de CTAB en agitant régulièrement pour retirer les flagelles de la tête spermatique. Les tubes sont ensuite centrifugés à 1020xg, 5 min et le culot est lavé avec du Tris-HCl 50 mM à pH8 et les échantillons sont incubés toute la nuit avec du tampon de lyse à 55°C. Le lendemain, nous procédons comme indiqué précédemment pour récupérer l'ADN en utilisant une extraction phénol : chloroforme : alcool isoamylique.

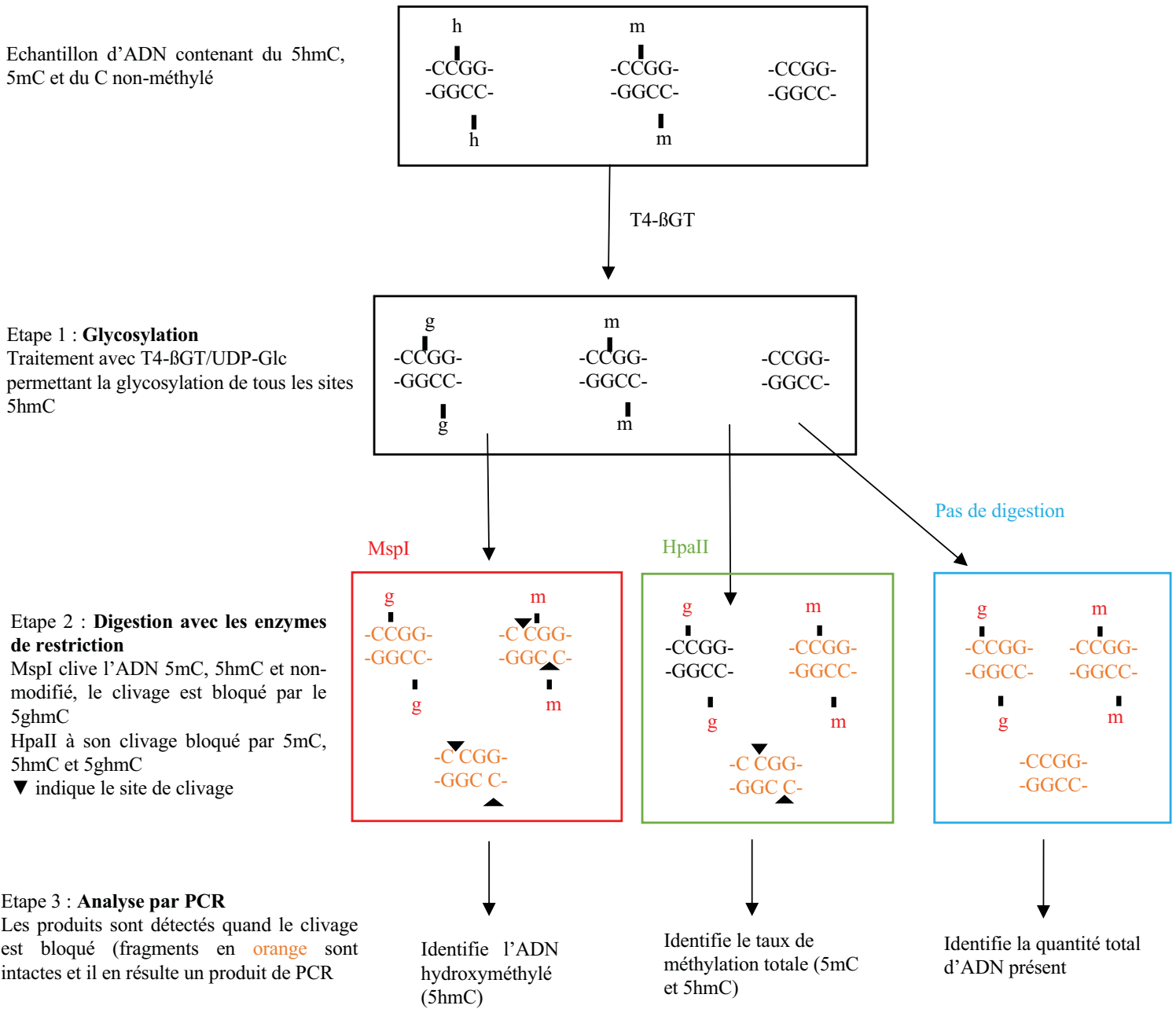


Figure 53 : Description du protocole d'Epimark® permettant d'identifier les régions méthylées 5mC et 5hmC.

PCR : *Polymerase chain reaction* (d'après NEB, *EpiMark® 5-hmC and 5-mC Analysis Kit*, #E3317S).

d. Immunoblot

L'ADN purifié est dénaturé 5min à 95°C et est déposé sur une membrane de nylon chargée positivement Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare Life Sciences). Chaque dépôt est à quantité égale d'ADN (100 ng, 50 ng et 10 ng). La membrane est alors séchée à l'air libre, puis l'ADN est hybridé de façon covalente à la membrane par une exposition de 1 min aux UV. La membrane est réhydratée dans une solution saline de tampon TBS (*Tris-buffered saline*, Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 150 mM) pendant 5 min puis lavée 10 min avec du TBS-Tween 0.05%. Elle est saturée pendant 1h à TA dans du tampon de saturation (TBS 1X, 0,05% Tween 20, 5 % Régilait™). La membrane est ensuite incubée pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire (tableau 4) dilué dans le tampon de saturation. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 5 min dans le tampon de saturation, puis elle est incubée pendant 1h à TA avec l'anticorps secondaire anti-IgG (tableau 4) couplé à une *horseradish peroxidase* (HRP) dilué dans le tampon de saturation. La membrane est lavée 3 fois pendant 10 min, dans le tampon TBS 1X – 0,05% Tween 20 et une fois dans le tampon TBS 1X. La membrane est révélée grâce au kit immobilon Western (Millipore) selon les instructions du fabricant et photographiée dans l'imageur MF-ChemiBIS 3.2 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd.). L'immunoblot a été réalisé sur trois expériences différentes avec des lots différents d'ADN afin d'établir des quantifications de chacune des marques. L'image est une image représentative d'un immunoblot et la quantification a été réalisée sur les trois expériences et représentée en *fold* par rapport au WT.

e. Kit EpiMark®

Pour analyser les régions génomiques potentiellement touchées par l'oxydation de la méthylcytosine dans le génome spermatique, nous avons utilisé le kit EpiMark® 5hmC et 5mC (NEB, #E3317S, Angleterre). Ce kit permet de convertir la 5hmC en 5hmC glycosylée (ou 5-glucose-hydrométhylcytosine, 5ghmC) ce qui empêche la digestion du site CCGG dans le génome par les enzymes MspI et HpaII (figure 53). 10 µg d'ADN spermatique de chaque génotype de souris, est complété avec 80 µM d'UDP-glucose, NEBuffer4 1X et *qsp* 310 µl avec de l'eau bidistillée sans nucléases. La solution est ensuite divisée en deux tubes distincts, l'un ayant l'ajout de 3 µl d'eau bidistillée (contrôle) et un où nous ajoutons 30U de T4 β-glycosyltransférase. Les deux tubes sont incubés de 12 à 18h à 37°C. Chacun des deux tubes de 155 µl est ensuite divisé en trois tubes contenant 50 µl. Les tubes numérotés 1 à 3 sont issus du tube ayant reçu la T4 β-glycosyltransférase et les tubes numérotés 4 à 6 sont issus du contrôle. Dans chaque tube 1 et 4 nous ajoutons 100U de l'enzyme MspI, dans les tubes 2 et 5

Gène cible	Chromosome	Séquence des amorces de 5' en 3'	Taille (en pb)	T _a
<i>Rasgr1</i>	Chr9	F-CCG-TGG-AGA-ATG-CCA-TTA-GC	107pb	60°C
		R-GCT-TGT-GCT-CAC-AGG-TTA-GA		
<i>Dlk1</i>	Chr12	F-TTC-CTT-CAG-CCA-CAG-TTC-CC	101pb	62°C
		R-GGC-TAC-AGC-AGG-GAG-ACA-AG		
<i>H19</i>	Chr7	F-GGC-ATA-GGT-GTC-CTG-CCT-TC	175pb	62°C
		R-GGC-AGC-TGA-GGA-ATC-CTA-CA		
<i>Kenq1</i>	Chr7	F-CAC-TCA-CCT-TGG-GAC-TCG-AC	206pb	62°C
		R-CTC-CAT-CTT-CGT-TTT-GCC-GC		
<i>Snrpn</i>	Chr7	F-AGG-TTG-TGA-CTG-GGA-ATC-CTG	228pb	50°C
		R-TGC-AGC-GGC-AAC-AGA-ACT-TCT		
<i>Plagl1</i>	Chr10	F-CGA-GGG-TGG-ATC-ATC-TCT-GTG	290pb	52°C
		R-CCC-AGC-CCA-AGC-TGA-GTG-ACA-A		
<i>Igf2R</i>	Chr17	F-TAT-CGG-CCC-TCG-TGT-AGT-TC	238pb	62°C
		R-GAG-GAT-TCC-ACG-CGT-TAG-AG		
<i>Impact</i>	Chr18	F-TGT-CAC-TCA-GCG-TTG-TCA-CAC-A	205pb	65°C
		R-CTG-GGC-CTG-CTA-CGT-AGT-G		
<i>Tsix</i>	ChrX	F-GTC-CAT-GCT-CTG-TTC-CCC-TGG-GC	178pb	60°C
		R-GTG-TGT-AGC-GCT-TGC-AGG-TAC		
<i>Xist</i>	ChrX	F-ATC-GTT-TGG-TGC-TGT-GTG-AG	496pb	60°C
		R-ACA-AAG-ATT-GGG-CTG-TCG-AG		
<i>Igf2</i>	Chr7	F-TTG-GCT-AGA-AGG-CGA-AAG-AA	243pb	60°C
		R-AAG-TTC-CTC-GGG-TTG-TAG-GGG		
<i>Pwer1</i>	Chr7	F-ATG-CAG-GCT-GCT-GGT-AGA-GT	189pb	62°C
		R-AAA-CTG-ACC-CGT-GAG-GTG-AC		
<i>Nespas</i>	Chr2	F-CCC-TCC-TCC-TTC-TGT-TGT-GA	229pb	60°C
		R-ACC-CTG-CCC-AGG-AAT-AAT-CT		
<i>Grb10</i>	Chr11	F-TGA-GTG-AGG-GAG-AAG-AAG-GA	337pb	60°C
		R-TTT-CTC-AGC-CTC-AGT-TTC-GC		
<i>SINE</i>	Chr19	F-TTT-GAC-TGG-CCT-TTC-TTT-CC	164pb	65°C
		R-AGG-TAG-GTG-CCC-AGG-ACT-GG		
<i>SINE</i>	ChrX	F-GAC-CAC-TTA-ACT-CAG-GGC-CAC-C	153pb	52°C
		R-TAC-AGC-CTG-TGA-GAA-GCA-GAC-G		
<i>SINE</i>	Chr7	F-CAC-ACA-CCC-CAA-GGA-GAG-ATT-GG	365pb	65°C
		R-CCT-CTT-ACA-CGC-GTT-CTC-GC		
<i>SINE</i>	Chr18	F-CTT-CAC-GCA-GTC-GCT-GAT-TA	334pb	60°C
		R-CGC-CAT-CTT-GTG-TTG-TAG-CC		
<i>Line1</i>	Chr4	F-CTT-AGA-GAA-TTT-GAT-AGT-TTT-TGG-AAT-AGG	254pb	56°C
		R-CCA-AAA-CAA-AAC-CTT-TCT-CAA-ACA-CTA-TAT		
<i>Line1 Bis</i>	Chr4	F-TAG-GAA-ATT-AGT-TTG-AAT-AGG-TGA-GAG-GT	254pb	56°C
		R-TCA-AAC-ACT-ATA-TTA-CTT-TAA-CAA-TTC-CCA		
<i>Igf2/H19</i>	Chr7	F-TGA-ATC-AGT-TGT-GGG-GTT-TAT	500pb	58°C
		R-TAG-CTA-TAC-TTC-AAT-TTT-CAC-ACA-ATA		
<i>Igf2/H19 bis</i>	Chr7	F-TGC-AAC-AAG-GGA-ACG-GAT-GAT-G	606pb	55°C
		R-ACC-ATT-CCG-TAA-GTG-CAC-AA		

Tableau 5 : Liste des *primers* utilisés pour l'Epimark®.

Pb : paires de bases ; Ta : température d'hybridation ; F : *forward* ; R : *reverse*.

SINE : *Short Interspersed Nuclear Element* ; *LINE*: *Long Interspersed Nuclear Element*.

nous ajoutons HpaII et les tubes 3 et 6 serviront de contrôle (sans enzyme de restriction). Chaque tube est incubé 16h à 37°C. Le lendemain, 0,4 mg/ml de protéinase K sont ajoutés dans les tubes et incubés 30 min à 40°C et à 95°C pendant 10 min afin d'inhiber la protéinase K.

f. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour les différentes PCR, nous procédons comme décrit précédemment dans le paragraphe I animaux, génotypage.

Afin de quantifier le taux de 5-hydroxyméthylation sur le site ciblé, nous procédons à une PCR quantitative avec l'ADN spermatique obtenu après le protocole d'Epimark®. Pour chaque tube issu du protocole d'Epimark®, 2 µl d'ADN sont additionnés de 5 µl de TAKARA SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara Bio, Japon) et de 0,5 µM de chaque amorce (tableau 5) pour les régions génomiques choisis. Chaque point est réalisé en double sur une plaque 96 puits. La Q-PCR est réalisée dans un thermocycleur LightCycler® (Roche) selon les températures d'hybridation spécifiques de chaque couple d'amorces (tableau 5). La courbe de fusion de chaque couple d'amorce est réalisée de façon à vérifier la spécificité des amorces. Le taux de 5-hydroxyméthylation est calculé pour chaque gène en comparant au tube contrôle d'ADN n'ayant pas subi ni la réaction de conversion ni la digestion enzymatique.

g. Sensibilité de la chromatine spermatique au dithiothréitol (DTT)

Pour tester si le Fertilix® a un effet sur le niveau de condensation de la chromatine spermatique, les spermatozoïdes ont été soumis à un traitement réducteur en utilisant le tampon de décondensation (PBS 1X+Triton X-100 0,1% ; 0,5M DTT) durant 45 min à température ambiante (TA). Une centrifugation des spermatozoïdes à 700xg pendant 5 min permet de reprendre le culot spermatique dans du PBS 1X et d'éliminer le DTT. Des frottis de 200 000 spermatozoïdes ont été réalisés sur lames Superfrost® et séchés à TA. Les lames ont ensuite été colorées suivant le protocole de Shorr décrit dans le tableau 6 afin d'observer la morphologie générale des spermatozoïdes, ainsi que d'apprécier la décondensation du noyau spermatique. Les spermatozoïdes ont été observés et comptés à l'aide d'un microscope, Axiovision® (Carl Zeiss, Allemagne) en lumière blanche.





Etapes	Durée d'incubation
Ethanol 70°	1 min
Eau courante	2 min
Hématoxyline de Mayer	3 min
Eau courante	3 min
Alcool Ammoniacal (95% d'alcool à 70°/5% d'ammoniaque à 25%).	Passage
Eau courante	3 min
Ethanol 70°	Passage
Ethanol 95°	Passage
Colorant de Shorr	1 min
Ethanol 95°	Passage
Ethanol absolu	Passage
Ethanol absolu (bain différent)	Passage
Histoclear	Passage
Histoclear	Passage

Tableau 6 : Coloration de Shorr

La coloration de Shorr permet de visualiser la morphologie des spermatozoïdes. Le réactif de Shorr donne un fond vert et colore les spermatozoïdes en rose/mauve.

III. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®] 6. Les données sont représentées sous forme d'histogrammes représentant la moyenne avec la somme des écarts à la moyenne (SEM). Étant donné le petit nombre d'individus dans les groupes comparés ($3 < n < 9$), les données ont été analysées par des tests non paramétriques (Mann-Whitney), pour déterminer si les différences observées entre les groupes étudiés sont significatives ou non. Les données sont considérées comme significativement différentes si la valeur de p est inférieure à 0,05. Sur les graphiques, les résultats des tests statistiques sont indiqués par des étoiles selon les critères suivants :

-  Aucune étoile : $p > 0,05$; N.S.
-  1 étoile (*) : $p < 0,05$;
-  2 étoiles (**) : $p < 0,01$;
-  3 étoiles (***) : $p < 0,001$.

Résultats

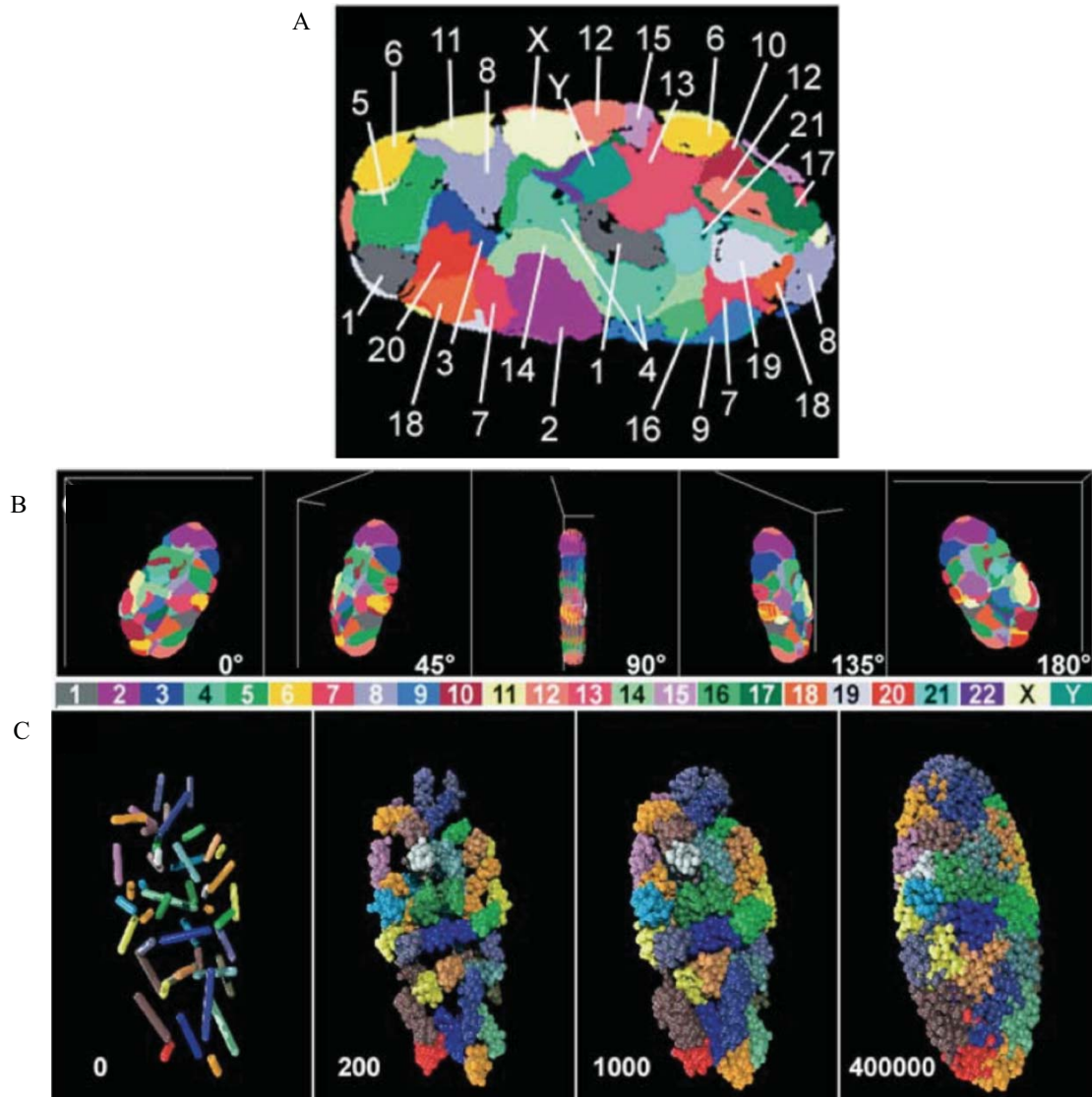


Figure 54 : Représentation des chromosomes dans une cellule somatique humaine en interphase par une approche d'hybridation *in situ* en fluorescence en 3D.

A. Représentation des différents territoires chromosomiques dans le noyau d'une cellule somatique humaine.

B. Reconstruction 3D de l'ensemble des territoires chromosomiques dans le noyau sous différents angles.

C. Simulation d'un modèle nucléaire. La première image montre les 46 chromatides humaines. Les trois images suivantes simulent le processus de condensation montrant l'arrangement des territoires chromosomiques.

(Modifiée d'après Bolzer et al., 2005).

I. L'organisation chromatinienne spermatique murine.

Au sein du noyau d'une cellule somatique, le dernier niveau d'organisation de la chromatine est celui des chromosomes notamment dans les cellules en métaphase où nous pouvons observer ces derniers plus facilement car les fibres de 300 nm (*cf.* Introduction Bibliographique) s'enroulent sur elles-mêmes et l'ADN linéaire est compacté environ 10 000 fois. De nombreuses études ont montré que les chromosomes sont localisés à des positions bien définies dans le noyau d'une cellule et non au hasard. Ces positions ont permis de définir les territoires chromosomiques (Cremer and Cremer, 2010 ; Meaburn and Misteli, 2007). Ainsi, deux hypothèses non exclusives ont émergé pour expliquer ce positionnement. La première est basée sur la taille des chromosomes où les petits chromosomes se positionneraient au centre du noyau cellulaire (Foster et al., 2005 ; Sun et al., 2000). La seconde est liée à la densité en gènes, les chromosomes riches en gènes seraient au centre du noyau tandis que les chromosomes pauvres en gènes s'orienteraient à la périphérie (Boyle et al., 2001 ; Croft et al., 1999). Pour localiser les chromosomes au sein du noyau, une approche d'hybridation *in situ* en fluorescence (ou FISH) est employée, il s'agit de recourir à de petites sondes fluorescentes ciblant une région de l'ADN (Nagele et al., 1995). Au départ, les sondes utilisées ne ciblaient que des régions spécifiques du chromosome, les centromères ou les télomères, composées de séquences répétées d'ADN (Prades et al., 1996). Par la suite, une approche de « *chromosome painting* » a été développée permettant de localiser le chromosome en entier (Tucker et al., 1995). Bolzer *et al.* ont cartographié en trois dimensions (3D) tous les chromosomes d'un noyau d'un fibroblaste humain selon leur taille et non selon la densité en gène (figure 54 ; Bolzer et al., 2005). Il semblerait que dans des situations pathologiques ou des situations de stress cellulaire, cette organisation des chromosomes dans le noyau puisse être affectée (Cremer et al., 2003 ; Ioannou et al., 2015). En effet, Ioannou et collègues montrent en particulier que certains chromosomes se retrouvent délocalisés du centre vers la périphérie lors d'un stress oxydant (exposition au peroxyde d'hydrogène ; figure 55 ; Ioannou et al., 2015).

Comment s'organisent les chromosomes dans une cellule hautement différenciée telle que le spermatozoïde ?

Les études menées sur la position des chromosomes dans un noyau spermatique ont été principalement réalisées sur spermatozoïdes humains. Tout d'abord, la position des chromosomes a été établie en étudiant des régions particulières des chromosomes telles que les télomères et les centromères en utilisant des sondes FISH spécifiques de ces régions

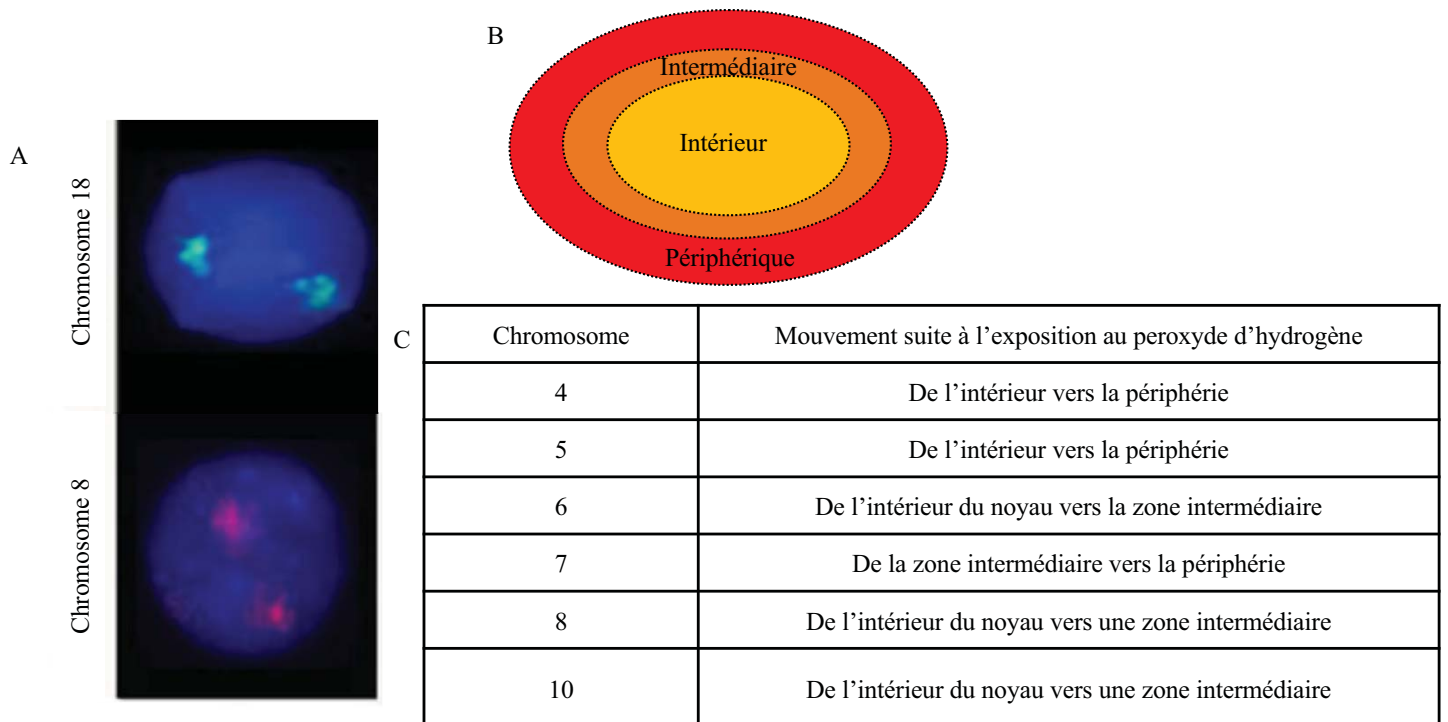


Figure 55 : Relocalisation des chromosomes dans un noyau d'un lymphocyte lors d'un stress oxydant.

- A. Représentation radiale de deux chromosomes (8 en rouge et 18 en vert), dans le noyau d'un lymphocyte ne subissant aucun traitement, localisés par une approche d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).
- B. Schéma représentant les trois zones établies dans un noyau d'un lymphocyte afin de faciliter le positionnement des chromosomes.
- C. Relocalisation de certains chromosomes dans le noyau suite à une exposition au peroxyde d'hydrogène.

(Modifiée d'après Ioannou et al., 2015)

(Zalenskaya and Zalensky, 2004). Ces études montrent que les télomères s'orientent vers l'extérieur. Tandis que les centromères s'organisent au centre du noyau spermatique, en s'accolant pour former ce qui est appelé le chromocentre (Zalenskaya and Zalensky, 2004 ; Zalensky et al., 1995). Par la suite, grâce à la technique de « *chromosome painting* », certains des chromosomes spermatiques ont été positionnés. Par exemple, Foster et son équipe montrent que les chromosomes des spermatozoïdes de verrat s'organisent selon leur taille dans le noyau avec une particularité pour les chromosomes sexuels, qui se retrouvent internalisés dans le spermatozoïde par rapport à ce que nous pouvons observer chez d'autres espèces (figure 56 ; Foster et al., 2005). Depuis 2012, dans le spermatozoïde humain, certains chromosomes impliqués dans des aneuploïdes ont été positionnés (figure 57). Ainsi, si nous prenons un spermatozoïde humain, les chromosomes X, 19, Y, 22, 21 et 18 s'orientent, dans cet ordre, depuis l'acrosome (vésicule localisée au-dessus de la tête spermatique) vers la pièce intermédiaire (zone d'attache entre la tête et le flagelle ; Millan et al., 2012 ; Mudrak et al., 2012 ; Zalensky and Zalenskaya, 2007). De plus, l'observation des chromosomes de quelques rares spermatozoïdes diploïdes a permis de montrer que les deux chromosomes identiques se localisent dans la même région et que la position est également identique entre les spermatozoïdes haploïdes et diploïdes. Ceci suggère que l'organisation des chromosomes dans le noyau spermatique est bien définie dès la méiose des cellules germinales durant la spermatogenèse (Mudrak et al., 2012).

Récemment, de nouvelles études utilisant des outils d'imagerie tridimensionnelle plus performante ont permis de montrer que les centromères et les télomères s'organisent en *clusters* au sein du noyau spermatique humain et non pas en une seule position (chromocentre pour les centromères ; figure 58 ; Ioannou et al., 2017). Une autre étude a pu montrer que dans un noyau spermatique humain, un haut niveau de dommage à l'ADN (fragmentation) peut perturber la position des centromères de différents chromosomes (Wiland et al., 2016) ; postulant ainsi que des dommages au noyau spermatique peuvent altérer l'organisation 3D des chromosomes.

In fine, une organisation aberrante des chromosomes dans le noyau spermatique peut avoir des effets délétères dans la fertilité, la fécondation et le développement embryonnaire (défaut de condensation de la chromatine spermatique, transcription des gènes, réplication aneuploïdies ... ; Harton and Tempest, 2012 ; Shi and Martin, 2000 ; Tempest and Griffin, 2004 ; Templado et al., 2013). A titre d'exemple, l'apport d'un chromosome sexuel X supplémentaire par un spermatozoïde conduit à une aneuploïdie embryonnaire (47 chromosomes, XXY) induisant un syndrome de Klinefelter (Templado et al., 2013). Des patients présentant des

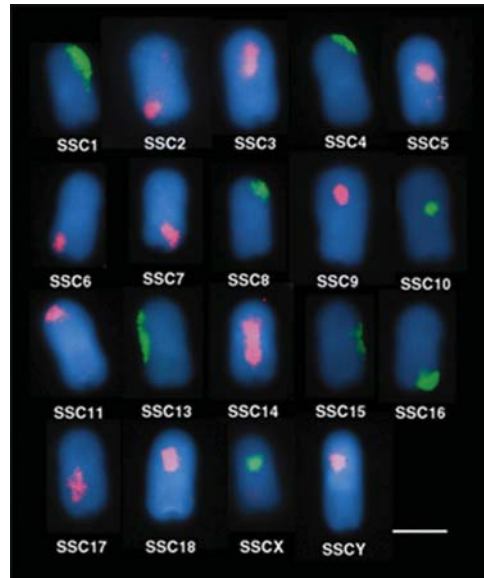


Figure 56 : « Chromosome painting » montrant les différents territoires chromosomiques dans le spermatozoïde de verrat.

« Chromosome painting » (rouge ou vert) des chromosomes et les noyaux des spermatozoïdes sont marqués avec le DAPI (bleu). La barre blanche représente l'échelle (5µm). (Modifiée d'après Foster *et al.*, 2005).

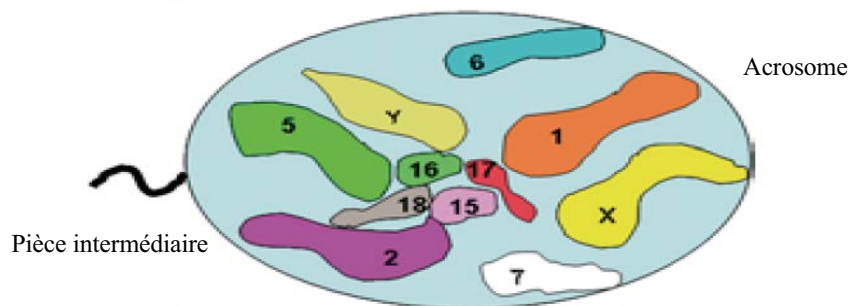


Figure 57 : Modèle de la position de certains chromosomes dans le noyau spermatique humain.

Représentation schématique de la position préférentielle de 11 chromosomes humains basée sur la localisation radiale/longitudinale et les distances inter-chromosomiques. (Modifiée d'après Zalensky and Zalenskaya, 2007, revue).

vacuoles dans le noyau spermatique, entraînant une modification de la position spatiale des centromères des chromosomes sexuels et du chromosome 18, sont tératozoospermiques (Perdrix et al., 2013). Des patients présentant une position altérée des centromères des chromosomes 15, 18 et X dans le noyau spermatique sont infertiles (Olszewska et al., 2008).

A ce jour, chez la souris, aucune donnée précise n'est disponible concernant la position des chromosomes dans le noyau spermatique, étant donnée sa forte compaction et sa forme particulière en crochet.

Qu'en est-il de l'organisation des chromosomes dans le noyau spermatique murin et quel peut être l'impact d'un stress oxydant post-testiculaire sur cette organisation ont été les questions centrales auxquelles j'ai tenté de répondre ?

Le but de l'étude présentée dans l'article (actuellement en cours d'évaluation) ci-dessous était de localiser les chromosomes spermatiques murins de souris sauvages et transgéniques, en trois dimensions afin de confirmer si la position des chromosomes pouvait permettre d'expliquer la différence d'oxydation entre les chromosomes observées dans nos études précédentes (Kocer et al., 2015). Nous voulions également évaluer si un stress oxydant épидидymaire pouvait altérer la position des chromosomes.

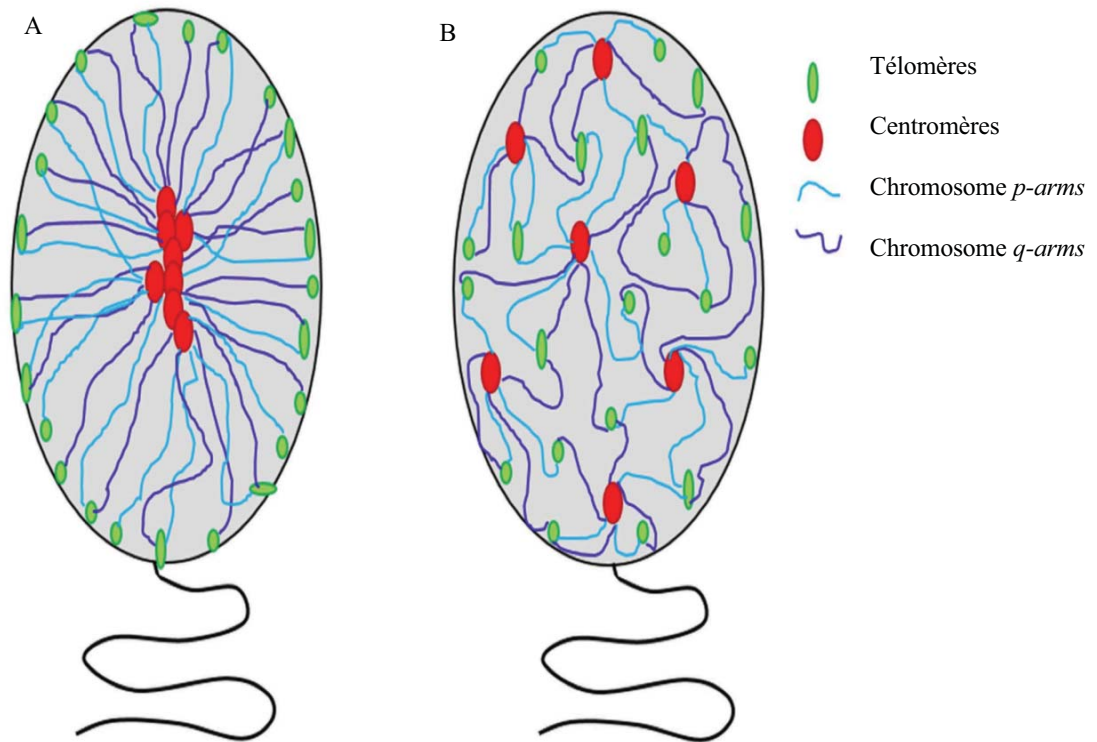


Figure 58 : Modèles de l'organisation des télomères et des centromères dans le spermatozoïde humain.

A. Modèle présentant les centromères qui se regroupent au centre du noyau spermatique pour former le chromocentre et les télomères en périphérie (Zalensky and Zalenskaya, 2007, revue).

B. Nouveau modèle proposé avec des *clusters* de centromères et de télomères réparties dans le noyau spermatique humain.

(Modifiée d'après Ioannou *et al.*, 2017).

Title: Does oxidative DNA damage affect the topology of the mouse sperm nuclear organization?

Soumis à *Scientific Reports* (2018)

Champroux A., Damon-Soubeyrand C., Goubely C., Henry-Berger J., Guiton R., Saez F., Drevet J.#, Kocer A.#,

Corresponding authors: joel.drevet@uca.fr and ayhan.kocer@uca.fr

GReD Laboratoire “Génétique, Reproduction et Développement”, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, 28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand, France

Mots-clés : Stress oxydant, organisation tridimensionnelle (3D) des chromosomes, noyau spermatique murin.

Résumé :

Chez de nombreux Mammifères, la position des chromosomes dans le noyau spermatique a été définie pour être non aléatoire, notamment chez l’homme, mettant en avant la notion de territoires chromosomiques. Le but de ce travail était : (1) d’étudier dans le spermatozoïde murin, la topologie d’un nombre choisi de chromosomes ; (2) d’évaluer si une situation très commune de dommages à l’ADN spermatique (c’est-à-dire l’oxydation de l’ADN) a une quelconque conséquence sur l’architecture du noyau du spermatozoïde. En utilisant une combinaison d’hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), de microscopie confocale et de techniques de reconstruction 3D, nous montrons que le positionnement des chromosomes dans le noyau du spermatozoïde murin n’est pas aléatoire. Certains chromosomes ont tendance à occuper des positions préférentielles tandis que d’autres semblent se positionner de manière plus aléatoire. À cet égard, le chromosome 2 dans le noyau du spermatozoïde de la souris est plutôt particulier. En effet, il se localise de manière équivalente dans les quatre régions du noyau spermatique murin, que nous avons définies arbitrairement. En utilisant un modèle transgénique bien établi d’oxydation nucléaire des spermatozoïdes chez la souris (souris *Gpx5^{-/-}*), nous montrons que les dommages oxydants à l’ADN ne perturbent pas l’organisation chromosomique hautement ordonnée. Cependant, en examinant des paramètres tridimensionnels (3D) nucléaires spécifiques, comprenant le volume et la superficie nucléaire, nous observons que les paramètres 3D sont significativement affectés chez les souris transgéniques par rapport aux

animaux sauvages. Ces données suggèrent que l'oxydation de l'ADN spermatique affecte la compaction de la chromatine qui est un critère important de la qualité du spermatozoïde lors de la fécondation.

Does oxidative DNA damage affect the topology of the mouse sperm nuclear organization?

Champroux A., Damon-Soubeyrand C., Goubely C., Henry-Berger J., Guiton R., Saez F., Drevet JR[&], Kocer A[&].

GReD “Genetics, Reproduction & Development” Laboratory, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, 28 Place Dunant, Clermont-Ferrand, France

[&]Corresponding authors: joel.drevet@uca.fr ; ayhan.kocer@uca.fr

Abstract

Recent studies have partially revealed the peculiar organization of the human sperm chromatin bringing forward the notion of chromosome territories. The purpose of this work was: first to investigate in the mouse sperm the topology of a selected number of chromosomes in order to compare it with the human data; second, to evaluate whether a very common situation of sperm DNA damage (*i.e.* sperm DNA oxidation) has any consequence on the architecture of the sperm nucleus. Using a combination of Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), confocal microscopy and 3D-reconstruction techniques we show that chromosome positioning in the mouse sperm nucleus is not random and, that it is distinct from that of the human model. Some chromosomes tend to occupy preferentially discrete positions while others seem to behave not as strictly. In that respect, chromosome 2 in the mouse sperm nucleus is rather peculiar. Using a well-established mouse transgenic model of sperm nuclear oxidation, we show that oxidative DNA damage does not disrupt the highly ordered chromosome organization. However, when looking at specific nuclear 3D-parameters including nuclear volume and nuclear surface area we observed that they were significantly affected in the transgenic sperm when compared to the wild-type animals. Mild reductive DNA challenge confirmed the fragility of the organization of the oxidized sperm nucleus that may have unforeseen consequences post-fertilization. These data suggest that beside sperm DNA fragmentation that is already known to modify the sperm nucleus organization, the more frequent and, to date, not highly regarded situation of sperm DNA oxidation also affects sperm chromatin packaging.

Introduction

The mammalian spermatozoon is a highly-differentiated cell produced by the testis during a long and complex process called spermatogenesis. Following successive steps that lead to the multiplication and the production of a haploid germ cells through the meiotic programme, spermatids undergo a long phase of cyto-differentiation (the so-called spermiogenesis phase) to form highly polarized spermatozoa. The unique characteristics of these cells is featured by the quasi complete loss of the cytoplasmic content, the appearance of the flagella apparatus and, the drastic size reduction of the nuclear compartment. These major cytological changes give rise to the tiniest mammalian cell type, having the ability to move in order to fulfil its function that is to bring in its target, the oocyte, the compacted and, consequently, protected paternal genomic moiety. Sperm nuclear condensation during spermiogenesis is by itself a long and highly regulated process in which one assists in a progressive complete remodelling of the sperm chromatin that will be unique to this cell type. Up to the spermatid stage the germ cell chromatin presents a somatic organization consisting in short segment of DNA (147bp) wrapped around a histone octamer to form a nucleosome¹. During spermiogenesis, most (but not all) canonical histone core proteins (H3, H4, H2A and H2B) are replaced by testis-specific histone variants such as TH2B, H3t, H2AL2 & 5²⁻⁵. It is assumed that the inclusion of such variants allows a more dynamic chromatin structure that permit the upcoming changes. Subsequently, histones, both canonical and testicular variants are massively replaced (but once again not totally) by small basic proteins called Tnps for transition nuclear proteins *in fine* themselves replaced by even smaller and more basic proteins called protamines^{6,7}. Protamines and DNA organize themselves into a ring-shaped structure called a toroid

containing up to 100kb of DNA that ultimately are piled-up along the chromosomes greatly increasing the level of DNA compaction. This sequence of events allows a strong nuclear and cell size reduction when compared to any somatic cell. Together with the fact that these modifications serve the cell ability to move in an optimal way they also contribute to the passive protection of the paternal sperm genome in prevision of its long post-testicular journey up to the site of fertilization.

What is also unique to this reshaping of the mammalian sperm chromatin is that the supra-organization of the chromatin in chromosomes is also tightly ordered and conserved from one sperm cell to another one. This has led to the observation that chromosomes are not randomly distributed in the sperm nucleus and that they occupy domains called chromosome territories (CTs)⁸⁻¹⁰. Few species have been investigated so far and for those that were analysed (mainly the human) not all chromosomes were mapped in the sperm nucleus. The position of specific chromosomal regions such as telomeres and centromeres were also looked at in the sperm nucleus¹⁰⁻¹³. As is the case in somatic cells, in sperm cells chromosomes are attached to a nuclear protein scaffold called the sperm nuclear matrix that consolidates the structure¹⁴⁻¹⁶. Here too, the way chromosomes are attached to the sperm nuclear matrix is unique to that cell lineage and is not similar to the somatic situation^{14,17}. It is thought that this ordered organization of the paternal chromosomes in the sperm nucleus is essential after fertilization during the sequential decondensation phase of the male nucleus into the male pronucleus¹⁰. Two non-exclusive theories have been brought forward to explain the positioning of chromosomes in the human sperm nucleus. One is “gene density” with the assumption that gene-poor chromosomes orient themselves toward the nuclear periphery while gene-rich chromosomes are located toward the nuclear interior^{18,19}. The second theory which appear more pertinent to us takes into account the chromosome sizes since, at least in the human sperm it seems that small chromosomes were located in the centre of the nucleus while larger chromosomes located at the periphery^{20,21}. Whether the human sperm nuclear organization reflects that of other mammals is a matter of debate.

For many years it was reported that mature spermatozoa do contain residual histones and that the quantity of so-called persisting histones was species specific. Indeed, it was estimated that about 1% to 2% of the mouse, hamster and bull sperm DNA was associated with histones²²⁻²⁴ while it goes up to 15% in human sperm²⁵⁻²⁹. First, attributed to an uncomplete, therefore deficient, spermiogenesis programme, it lately appeared that persisting histones in the sperm nucleus were not random and that they have escaped the histone to protamine exchange on purpose. Although, there is a controversy as to the extent and the quality of sequences still in nucleosomal arrangement in mammalian spermatozoa it is however clear that histones were found in large domains punctuating the protamine-toroidal stacks along the chromosomes and, in addition, nucleosomes persist at each small string of DNA (1 to 2kb-long) connecting adjacent toroids¹⁵. The consensual explanation for that situation is that these particular paternal regions that maintain a somatic-like organization will be more prone to be reactivated early after fertilization at the onset of the developmental programme. In support of this hypothesis were the observations that genes important for the early developmental programme were found located in such histone-containing regions²⁵⁻²⁷, and that the origins of the paternal DNA replication necessary prior to the first division of segmentation were located in the short histone-containing DNA segments connecting the toroids and attached to the nuclear matrix^{14,30-33}. It is thought that this ordered organization of the paternal chromosomes in the sperm nucleus is essential after fertilization during the sequential decondensation phase of the male nucleus into the male pronucleus^{10,34}.

These last years, we contributed to show in the mouse model that these histone-rich regions, particularly those that are attached to the nuclear matrix were mainly localized at the sperm nuclear periphery and at the basis of the sperm nucleus towards the so-called annulus domain^{30,35}. In agreement with the lower level of condensation and the peripheral easy access of these histone-associated DNA domains we also demonstrated that these regions were particularly susceptible to DNA damage and especially to oxidative DNA damage³⁰. In that same last study, we also reported that in the mouse sperm nucleus the smaller the chromosomes were the higher they were susceptible to DNA oxidation³⁶. We demonstrated that this was not related to their content in persisting histones but rather to the more peripheral and basal position of small chromosomes. These observations led to the conclusion that contrarily to the human sperm chromosomal organization which, as said above, showed small chromosomes more in the central axis of the sperm nucleus, the situation was different in the mouse. This prompted us to analyse more

precisely the architecture of the mouse sperm nucleus. In the present study, we have used three-dimensional Fluorescence *in situ* hybridization (3D-FISH), confocal microscopy and computational analysis of 3D structures to analyse the topology of at least 12 mouse sperm chromosomes. This has allowed us to propose the largest map of chromosome territories in the mouse sperm available to date. Thanks to the disposal of the *Gpx5*^{-/-} transgenic mouse, in addition to the wild-type situation we conducted an analysis of the chromatin organisation in what appears now to be a very frequent situation of sperm nuclear damage, *i.e.* nuclear oxidation³⁷. Indeed, we demonstrated lately that two-third of the male patients from couple entering an infertility programme did show mild to severe sperm DNA oxidation. Our aims were to investigate whether chromosomal 3D parameters including volume and surface area could be affected by DNA oxidation.

Results

Localization of chromosome territories in mice spermatozoa.

Previously, we hypothesized that the localization of chromosomes in the mouse sperm nucleus could explain their different susceptibility to oxidative damage as revealed after immunoprecipitation of the oxidized DNA regions followed by high throughput sequencing approaches³⁶. This statement was supported by the fact that we were able to co-localize the smallest mouse chromosome (chromosome 19) with a focal point of oxidative DNA damage in the *Gpx5*^{-/-} sperm nucleus³⁶. To strengthen this statement, we here have looked at the nuclear distribution of a total of 12 chromosomes (both long and short chromosomes) using FISH in a whole chromosome painting approach in both WT and *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei. Figure 1 shows for each chromosome investigated representative confocal microscopy photographs going through the middle of the sperm head volume. To facilitate the analysis, we have arbitrarily divided the mouse sperm head in 4 distinct areas as schematized in Figure 1. For each selected chromosome, a minimum of 350 sperm cells were analyzed and preferential positions determined. It is clear that small chromosomes including chromosomes 17, 18 and 19 localized to the basal part of the sperm nucleus whereas a long chromosome such as chromosome 1 localized preferentially to the ventral area (see Fig. 1). Sexual chromosomes X and Y and chromosome 15 as well clearly localized to the dorsal area (Fig. 1). For these chromosomes assignment of a preferential domain was easy because they were clearly preferentially found in these particular locations (see Table 1). On the contrary for some chromosomes assignment of a preferential area was more difficult. For example, two chromosomes (3 and 12) were statistically equally assigned to 2 sperm head areas, namely basal and ventral for chromosomes 3 and basal and apical for chromosome 12 (Table 1). Chromosome 2 was peculiar as it was equally localized to the four distinct areas (Table 1). When the same analysis was carried out using *Gpx5*^{-/-} oxidized sperm nucleus it was clear that no difference was recorded (see Table 1).

Taking advantage of the 3D-reconstructed images we have looked at two topological parameters (volume and surface area) for each chromosome in the WT genetic context. As shown in supplemental Table 1 and supplemental Figure 1, it is clear that there is a linear relation between the size of a given chromosome and the volume/surface it occupies in the mouse sperm nucleus. Only chromosome 2 behaved in a peculiar way since the linear relation was validated in solely 1/4th of the analyzed sperm, those in which the chromosome 2 localized to the basal area (B in supplemental Table 1 and supplemental Fig. 1). Strikingly, when chromosome 2 localized to different areas of the sperm nucleus the linear relations (volume *vs* size and surface *vs* size) were lost (supplemental Fig. 1). This was particularly true when chromosome 2 was located in the ventral (V) and apical (A) areas and to a lesser extent when it was in the dorsal (D) area. Interestingly, opposite effects were recorded in these two situations revealing that when chromosome 2 localized to the ventral and apical areas of the sperm nucleus its footprint (volume/surface) in the sperm nucleus is different than its footprint when it localized to the basal area.

Centromeres, telomeres and histone-rich domains clustered in the mouse sperm nucleus.

Using immunocytochemistry, we further investigated the localization of particular chromosomal subdomains namely centromeres and telomeres. To do so, we used a pan-centromere specific H3 variant (CENP-A) antibody to detect this ubiquitous centromeric protein (Fig. 2A). 3D reconstructions using the *Imaris* software showed that centromeres aligned and clustered along the dorsal and basal ridge of the sperm head (Fig. 2B). A similar localization was seen when looking at telomeres (Fig. 2C & 2D) suggesting that in the mouse sperm nucleus centromeres and telomeres co-localize. No difference in the localization of centromeres and telomeres was recorded when *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei were looked at (not shown). To corroborate and complete observations partly reported earlier³⁰ as to the localization of persisting histones in the mouse sperm nucleus we used three specific histone antibodies (1 canonical and 2 testis-specific variants, respectively, H3, TH2B and H2A.Z) in immunofluorescent confocal microscopy approaches associated with *Imaris* 3D reconstruction. We confirm the basal and dorsal peripheral localization of these persisting histones and their rather well overlapping localization (Fig. 3). The 3D *Imaris* reconstructions showed in parallel (right panels) in the same Figure clearly reveal the basal and dorsal ridge localization of these histone-rich domains in what could be designated as a “punch-head” distribution. Topoisomerase 2 β , a protein of the sperm nuclear matrix (Fig. 3) as well as the classical cytoskeleton protein β -tubulin (Fig. 3) also fall in these dorsal peripheral and basal ridge domains as was partly shown earlier³⁰.

Oxidative DNA damage does affect 3D-parameters of the mouse sperm nucleus

Taking advantage of the confocal images and the power of the *Imaris* software analysis we looked into more details at sperm nuclear 3D-parameters including volume and surface area comparing WT and *Gpx5*^{-/-} spermatozoa. An average value for each parameter (volume and surface area) was obtained from each sample and each condition tested (untreated, NaOH or DTT treated) by looking at a pool of 30 spermatozoa. Table 2 presents the data collected. Untreated WT spermatozoa showed a mean nuclear volume at 66 μm^3 and a mean nuclear surface area at 93.9 μm^2 . When looking at *Gpx5*^{-/-} spermatozoa these parameters were significantly different with a mean nuclear volume at 54,8 μm^3 ($p < 0.001$) and a mean surface area at 80.2 μm^2 ($p < 0.001$) revealing a greater state of nuclear condensation. When looking at the detailed shape of the 3D-reconstructed sperm nuclei we also repeatedly noticed differences between WT and *Gpx5*^{-/-} animals. As shown in Figure 5 with representative photographs of 3D-reconstructed nuclei, *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei present a smoother surface when compared to the more irregular aspect of the WT sperm nuclei. The use of different mild denaturing treatments namely DTT (2mM) or NaOH (1.5N) revealed distinct reactions when WT sperm were compared to *Gpx5*^{-/-} sperm and confirmed the specific effect of oxidation on the sperm nucleus. As presented in Table 2, when NaOH was used to mildly denature the sperm chromatin (by its classical breakage effect on the hydrogen bonds linking DNA base pairs) we recorded a significant increase of sperm nuclear volume and surface area in both genetic backgrounds (WT and *Gpx5*^{-/-}). However, with this alkaline treatment *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei remained more condensed than WT. On the contrary, when DTT (a non-ionic detergent that specifically reduces disulfide bonds to free thiols) was used we recorded a very significant effect on both sperm nuclear volume and surface area in the *Gpx5*^{-/-} situation when compared to the WT (Table 2). This is in agreement with the idea that although *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei do look more condensed they also appear to be significantly less solid when facing a mild reducing environment. These differences in the nuclear reactivity of oxidized or non-oxidized sperm nuclei when facing mild denaturing conditions can be visualized as shown in Figure 4. In panel C, when no denaturing treatment was performed *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei present the smooth aspect as presented already above. When NaOH was used as a mild denaturing treatment there was no significant change regarding the fine shape of the sperm nuclei in both genetic backgrounds (Fig 4B). However, when a DTT mild denaturation was carried out it is obvious that now the *Gpx5*^{-/-} sperm nuclei present a dense granular aspect (Fig. 4C) while it was not the case for the WT.

Discussion

In recent years, it became apparent that the mammalian sperm nucleus organization has implications for fertilization and early embryogenesis^{8,9,38-42}. It was shown mainly in the human spermatozoa that most chromosomes occupy discrete and well-defined territories in a polar/radial distribution that could be partly related with their size, the shape/volume of the mature sperm cell and the kinetics of the oocyte-driven decondensation programme of the paternal nucleus post-fertilization. How this highly ordered organization of the sperm chromatin is achieved, controlled and maintained in each sperm-cell throughout spermiogenesis and onward is still largely unknown. Whether the human sperm chromatin organization applies to the mouse sperm and how susceptible this organization is to mild nuclear and DNA damage as represented by the common situation of sperm DNA oxidative damage are questions we intended to address here.

Using FISH experiments we positioned a total of 12 chromosomes in the mouse sperm nucleus. Both short and long autosomes and the two sexual chromosomes were looked at. As it was reported for the human sperm nucleus, and suggested for other species including the mouse, bovine, pig, rat and horse each time using a smaller subset of chromosome probes when compared to the present work^{10,11,38,43-50} chromosome positions in the mouse sperm nucleus were not random⁸⁻¹⁰. This situation seems to be confined to mammals since a tandem head to tail organization of sperm chromosomes in a defined order was observed in monotremes and marsupials^{51,52} while no particular organization was detected in non-mammals including chicken and planarian spermatozoa^{53,54}.

Because of the peculiar asymmetric hook-shape morphology of the mouse sperm head it was difficult to use a polar/radial axis to map the mouse sperm head as it was done in other species⁹. Arbitrarily, we choose to separate the mouse sperm head in 4 compartments apical/basal/dorsal/ventral still permitting comparative analyses with other species. In the mouse, smaller chromosomes were found to occupy a basal localization while longer chromosomes including sexual chromosomes were preferentially found in the ventral and dorsal areas of the sperm nucleus. This appears to be distinct from the human situation since it was shown that small autosomes as well as sexual chromosomes occupy a rather central position in the human sperm¹⁰. Although for most of the chromosomes looked at a preferential position could be assigned, it was not the case for all chromosomes. Four chromosomes (chr 3, 7, 9 and 12) were equally assigned to two distinct areas while one chromosome (chr 2) was very plastic and was found evenly distributed in the 4 arbitrarily defined nuclear areas. For those chromosomes that were equally distributed in two distinct nuclear domains, one explanation could come from the fact that statistically 1 out of 2 spermatozoa looked at was either a Y-spermatozoa or a X-spermatozoa. The size difference between the sexual chromosomes (both localized in the dorsal area) could explain the alternate positions of these autosomes. This hypothesis is strengthened by the observation that overall Y-sperm and X-sperm show a similar nuclear volume (not shown here) suggesting that the necessary adjustment to accommodate the X or Y chromosome size difference does not rely on nuclear volume variation. Furthermore, when looking at individual chromosome 3D-parameters (*i.e.* volume and surface area) we observed that chromosomes 3 and 12 (two chromosomes that equally occupy two distinct locations, basal or ventral for chromosome 2 and basal or apical for chromosome 13) have the same footprint, irrespective of their location. This suggests that the nuclear room adjustment necessary to accommodate the X or the Y chromosome does not rely on a different folding of individual chromosome but rather on a different organization of the chromosomes. These hypotheses would have to be verified using a triad detection system with probes targeting a chosen autosome together with probes targeting sexual chromosomes. Chromosome 2 is rather intriguing as it is equally found in any of the four arbitrarily defined nuclear areas. This observation is not unique to the mouse sperm since in human sperm chromosome 13 was shown to behave identically³⁸. Although a rather long autosome it seems that chromosome 2 is considered as an adjustment variable in the mouse sperm nucleus. In addition, we and others have data that let us think that the mouse chromosome 2 is an accessible chromosome in the mouse sperm nucleus since it was observed at several occasion that when purifying mouse sperm DNA

for high throughput sequencing strategies one systematically obtain a large excess of chromosome 2 sequences when compared to other chromosomes^{36,55,56}. This suggests a peripheral localization of this chromosome in the mouse sperm nucleus as it does not appear to be less condensed than other autosomes³⁶.

Telomeres have been recently assigned a chromosome stabilizing function that is important for reproduction⁵⁷ and it is proposed that telomeres are the first chromosomal regions to respond to oocyte decondensing factors that lead to the formation of the male pronucleus³⁹. As it was suggested earlier for the human sperm nucleus^{11,46,47} and recently confirmed⁵⁸ we show here that in the mouse sperm telomeres are also organized in clusters located at the periphery of the sperm nucleus in an edge-like/ridge-like manner starting from the basis of the nucleus and going-up on the dorsal side in close proximity with the peripheral nuclear matrix. When looking at centromeres, another characteristic domain of chromosomes rich in repeated sequences, we found that in the mouse sperm nucleus they were located too at the periphery in that same edge-like/ridge-like organization. This is rather different from the human sperm situation in which centromeres were placed at the centre of the nucleus where they form a chromocenter^{13,59}. The localization of centromeres in mouse sperm *via* the use of the histone H3 variant CENP-A is in agreement with previous data reporting that histones in mature mouse sperm are rather preferentially located in the basal and dorsal peripheral areas of the nucleus (present study)³⁰. In the mouse, it thus appears that both telomeres and centromeres are closely located at these dorsal peripheral and basal nuclear domains that were also shown elsewhere (as well as here) to be domains rich in nuclear matrix attachment components (present work)¹⁵. It is interesting to note that the paternal DNA associated to these nuclear regions was shown to be important both for the male pronucleus formation and for the first round of DNA replication^{14,32} which are early events of the developmental programme.

Concerning the susceptibility of the sperm chromatin organization to oxidative alteration we show here that grossly the nuclear topology of the chromosomes (at least for those that were looked at) is not affected by a mild oxidative environment as the one present in the *Gpx5*^{-/-} transgenic mouse strain³⁷. This is supported by the fact that we did not record significant differences in the distribution of the chromosomes in the four arbitrarily defined regions. However, when looking at nuclear 3D-parameters such as nuclear volume and surface area we confirmed as expected the susceptibility of the nucleus to oxidative alterations. This is evidenced by the observations that both the nuclear volume and the nuclear surface area are significantly diminished in *Gpx5*^{-/-} spermatozoa when compared to WT sperm. This is in line with the idea that when the epididymis-secreted GPx5 protein is absent it provides more luminal H₂O₂ that is used by the sperm-nucleus GPx4 acting as a disulphide isomerase which generates disulphide bridges between the sperm nuclear protamines leading to a greater state of nuclear condensation. The observation after 3D-reconstruction that *Gpx5*^{-/-} sperm show a smoother nuclear surface when compared to WT sperm which has a “goose-bumps” aspect is interesting as it distinguishes nuclear domains responding differentially to this oxidation-mediated increased condensation. The use of different mild denaturing treatments (alkaline *versus* reductive denaturation) stressed in particular the point that even though a mildly oxidized sperm nucleus may appear well condensed (as it is the case with the *Gpx5*^{-/-} spermatozoa) it is highly susceptible to mild reductive conditions. This is important in clinical practice as clinicians may be misled when using assays that will appreciate the level of sperm nuclear condensation such as anilin blue or toluidin blue assays as an indicator of sperm nuclear integrity. The type of mild denaturation technique chosen will therefore be critical to correctly appreciate the level of sperm nuclear solidity/integrity. These considerations support our credo that a solid evaluation of sperm nuclear integrity/solidity prior to assisted reproductive technology (ART) should include several additional tests addressing the issue of DNA fragmentation, DNA oxidation and nuclear solidity.

Materials and methods

Animals

Ethic statement: The present study was approved by the Regional Ethic Committee in Animal Experimentation (CEMEA-Auvergne; Authorization CE99-12) and adhered to the current legislation on

animal experimentation in France. Mice (9-month-old) were culled by cervical dislocation and spermatozoa were collected from the caudal segment of the epididymis. Mice strains used in this study are in the C57BL/6 genetic background.

Immunocytochemistry and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays

All immunofluorescent procedures were performed as previously described³⁷. For FISH assays, spermatozoa were recovered as described previously³⁷. A fraction aliquot of 10.10⁶ spz/ml was centrifuged at 560g, 5min and re-suspended in 1.25 ml fresh Carnoy's fixative (3:1 ethanol: acid acetic). This solution containing the spermatozoa is spread on the slides up to 25,000 spermatozoa/slide and after the slides are dried during 1 hour at room temperature (RT) and stored at -20°C (Superfrost[®] slides, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). After 24 h, slides were defrosted at RT and placed in a coplin jar with Saline-Sodium Citrate solution 2X (SSC 2X) for 15 min at 37°C. Slides were dried 5 min at RT and were denatured using NaOH 1.5N (1 min). Slides were then incubated in coplin jar with SSC 2X for 30 min at 70°C (^{+/-}1). The coplin jar was left at RT. Slides were successively incubated for 1 min in SSC 0.1X at RT, NaOH 0.07N at RT, SSC 0.1X at 4°C and SSC 2X at 4°C. Slides were transferred through a series of ethanol washes for 1 min each starting with 70%, 95% and at last 100% ethanol. Slides were left to dry at RT. DNA probes were filed on sterile coverslip pre-warmed at 37°C and sealed using paraffin. Slides were incubated in a dark damp chamber at 37°C for 48 h.

Mouse chromosome painting probes (Metasystems, Germany) and telomeres probes (Panagene, South Korea) were prepared according to the manufacturer's instructions. After 48h of incubation, the slides were washed with SSC 0.4X for 2 min at 70°C (^{+/-}1) and 30sec in SSC 2X with Tween 0.05% and two successive water baths. Vectashield[®] with DAPI (Vector Laboratories) was added on each slide to counterstain the sperm cell nucleus. Finally, coverslips were mounted, sealed and slides were stored at -20°C in the dark until observation.

Microscopy

Confocal z-stacks were captured using a Leica SPE confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) and oil immersion objective with a magnification of 40x is used for all acquisitions. The chromosome positioning is determined by counting 350 spermatozoa per chromosome and percentage of spermatozoa presenting studied chromosome at given position is established by using Zeiss microscope Axioplan2 (Carl Zeiss, Germany).

Image analysis measurements of 3D parameters.

All the images were deconvoluted by using Huygens software (Scientific Volume Imaging, The Netherlands) before the analysis. Spermatozoa volume and surface area were measured by using Imaris Version 7.6 software (Bitplane AG, Switzerland). The mean of each parameter is calculated with at least 30 spermatozoa.

Statistics

Mann-Whitney and Spearman correlation analyses were performed using the GraphPad Prism[®] software. The difference was considered significant when $p < 0.001$ (**).

References

1. Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J. R. & Kocer, A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin. Androl.* **26**, 17 (2016).
2. Montellier, E. *et al.* Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* **27**, 1680–1692 (2013).

3. González-Romero, R., Méndez, J., Ausió, J. & Eirín-López, J. M. Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd. *Gene* **413**, 1–7 (2008).
4. Govin, J. *et al.* Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* **176**, 283–294 (2007).
5. Houghoughi, N., Barral, S., Vargas, A., Rousseaux, S. & Khochbin, S. Histone variants: essential actors in the male genome programming. *J. Biochem. (Tokyo)* (2017). doi:10.1093/jb/mvx079
6. Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227 (2007).
7. Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. & Renkawitz-Pohl, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 155–168 (2014).
8. Foster, H. A., Abeydeera, L. R., Griffin, D. K. & Bridger, J. M. Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J. Cell Sci.* **118**, 1811–1820 (2005).
9. Millan, N. M. *et al.* Hierarchical radial and polar organisation of chromosomes in human sperm. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **20**, 875–887 (2012).
10. Zalensky, A. & Zalenskaya, I. Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 609–611 (2007).
11. Hazzouri, M. *et al.* Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* **55**, 307–315 (2000).
12. Ioannou, D. & Griffin, D. K. Male fertility, chromosome abnormalities, and nuclear organization. *Cytogenet. Genome Res.* **133**, 269–279 (2011).
13. Zalensky, A. O., Breneman, J. W., Zalenskaya, I. A., Brinkley, B. R. & Bradbury, E. M. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma* **102**, 509–518 (1993).
14. Shaman, J. A., Yamauchi, Y. & Ward, W. S. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch. Androl.* **53**, 135–140 (2007).
15. Ward, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* **16**, 30–36 (2010).
16. Gawecka, J. E., Ribas-Maynou, J., Benet, J. & Ward, W. S. A model for the control of DNA integrity by the sperm nuclear matrix. *Asian J. Androl.* (2015).
17. Yamauchi, Y., Shaman, J. A. & Ward, W. S. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J. Androl.* **13**, 31–35 (2011).
18. Boyle, S. *et al.* The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 211–219 (2001).
19. Croft, J. A. *et al.* Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* **145**, 1119–1131 (1999).
20. Bolzer, A. *et al.* Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* **3**, e157 (2005).
21. Sun, H. B., Shen, J. & Yokota, H. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* **79**, 184–190 (2000).
22. Bench, G. S., Friz, A. M., Corzett, M. H., Morse, D. H. & Balhorn, R. DNA and total protamine

- masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* **23**, 263–271 (1996).
23. Balhorn, R., Gledhill, B. L. & Wyrobek, A. J. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry (Mosc.)* **16**, 4074–4080 (1977).
 24. Tovich, P. R. & Oko, R. J. Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **278**, 32431–32438 (2003).
 25. Arpanahi, A. *et al.* Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* **19**, 1338–1349 (2009).
 26. Erkek, S. *et al.* Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 868–875 (2013).
 27. Hammoud, S. S. *et al.* Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* **460**, 473–478 (2009).
 28. Gatewood, J. M., Cook, G. R., Balhorn, R., Schmid, C. W. & Bradbury, E. M. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.* **265**, 20662–20666 (1990).
 29. Brykczynska, U. *et al.* Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 679–687 (2010).
 30. Noblanc, A. *et al.* DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 719–723 (2013).
 31. Zalensky, A. O. *et al.* Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 43474–43480 (2002).
 32. Shaman, J. A., Yamauchi, Y. & Ward, W. S. The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J. Cell. Biochem.* **102**, 680–688 (2007).
 33. Anachkova, B., Djeliova, V. & Russev, G. Nuclear matrix support of DNA replication. *J. Cell. Biochem.* **96**, 951–961 (2005).
 34. Solov'eva, L., Svetlova, M., Bodinski, D. & Zalensky, A. O. Nature of telomere dimers and chromosome looping in human spermatozoa. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **12**, 817–823 (2004).
 35. Ward, W. S. & Coffey, D. S. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol. Reprod.* **41**, 361–370 (1989).
 36. Kocer, A. *et al.* Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: Size matters. *Free Radic. Biol. Med.* (2015). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.419
 37. Chabory, E. *et al.* Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2074–2085 (2009).
 38. Zalenskaya, I. A. & Zalensky, A. O. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **12**, 163–173 (2004).
 39. Zalenskaya, I. A., Bradbury, E. M. & Zalensky, A. O. Chromatin Structure of Telomere Domain in Human Sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 213–218 (2000).
 40. Miller, D., Brinkworth, M. & Iles, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reprod. Camb. Engl.* **139**, 287–301 (2010).
 41. Mudrak, O. S., Nazarov, I. B., Jones, E. L. & Zalensky, A. O. Positioning of chromosomes in

human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement. *PLoS One* **7**, e52944 (2012).

42. Ioannou, D., Miller, D., Griffin, D. K. & Tempest, H. G. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**, 157–166 (2016).
43. Powell, D., Cran, D. G., Jennings, C. & Jones, R. Spatial organization of repetitive DNA sequences in the bovine sperm nucleus. *J. Cell Sci.* **97 (Pt 1)**, 185–191 (1990).
44. Haaf, T. & Ward, D. C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp. Cell Res.* **219**, 604–611 (1995).
45. Jennings, C. & Powell, D. Genome organisation in the murine sperm nucleus. *Zygote Camb. Engl.* **3**, 123–131 (1995).
46. Zalensky, A. O., Tomilin, N. V., Zalenskaya, I. A., Teplitz, R. L. & Bradbury, E. M. Telomere-telomere interactions and candidate telomere binding protein(s) in mammalian sperm cells. *Exp. Cell Res.* **232**, 29–41 (1997).
47. Meyer-Ficca, M., Müller-Navia, J. & Scherthan, H. Clustering of pericentromeres initiates in step 9 of spermiogenesis of the rat (*Rattus norvegicus*) and contributes to a well defined genome architecture in the sperm nucleus. *J. Cell Sci.* **111 (Pt 10)**, 1363–1370 (1998).
48. Luetjens, C. M., Payne, C. & Schatten, G. Non-random chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet Lond. Engl.* **353**, 1240 (1999).
49. Tilgen, N., Guttenbach, M. & Schmid, M. Heterochromatin is not an adequate explanation for close proximity of interphase chromosomes 1--Y, 9--Y, and 16--Y in human spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **265**, 283–287 (2001).
50. Sbracia, M. *et al.* Preferential location of sex chromosomes, their aneuploidy in human sperm, and their role in determining sex chromosome aneuploidy in embryos after ICSI. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **17**, 320–324 (2002).
51. Watson, J. M., Meyne, J. & Graves, J. A. Ordered tandem arrangement of chromosomes in the sperm heads of monotreme mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10200–10205 (1996).
52. Greaves, I. K., Rens, W., Ferguson-Smith, M. A., Griffin, D. & Marshall Graves, J. A. Conservation of chromosome arrangement and position of the X in mammalian sperm suggests functional significance. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **11**, 503–512 (2003).
53. Solovei, I. V. *et al.* Unordered arrangement of chromosomes in the nuclei of chicken spermatozoa. *Chromosoma* **107**, 184–188 (1998).
54. Joffe, B. I., Solovei, I. V. & Macgregor, H. C. Ordered arrangement and rearrangement of chromosomes during spermatogenesis in two species of planarians (Plathelminthes). *Chromosoma* **107**, 173–183 (1998).
55. Li, Y., Lalancette, C., Miller, D. & Krawetz, S. A. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J. Androl.* **10**, 535–541 (2008).
56. Nelson, J. E. & Krawetz, S. A. Computer assisted promoter analysis of a human sperm specific nucleoprotein gene cluster. *DNA Seq. J. DNA Seq. Mapp.* **5**, 329–337 (1995).
57. Thilagavathi, J., Venkatesh, S. & Dada, R. Telomere length in reproduction. *Andrologia* **45**, 289–304 (2013).

58. Ioannou, D., Millan, N. M., Jordan, E. & Tempest, H. G. A new model of sperm nuclear architecture following assessment of the organization of centromeres and telomeres in three-dimensions. *Sci. Rep.* **7**, 41585 (2017).
59. Hoyer-Fender, S., Singh, P. B. & Motzkus, D. The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **254**, 72–79 (2000).

Acknowledgements

The authors would like to thank the CNRS, INSERM and UCA for their financial support as well as the Région Auvergne Rhone Alpes for contribution to this research.

Author Contributions

Author CA, KA was involved in the conception and design of the experimental manipulations, assisted with the molecular techniques, and wrote the manuscript. DSC and GC had contributed to the experimental manipulations. DJR drafted and critically reviewed the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Abbreviations

ART: Assisted Reproductive Technology

Chr: Chromosome

CT: Chromosome Territories

FISH: Fluorescence *In Situ* Hybridization

WT: Wild-Type

Figures Legends

Figure 1: Chromosome mapping in WT mouse sperm nucleus.

Schematic representation of a wild-type (WT) mouse sperm nucleus arbitrarily divided in four regions (apical, dorsal, ventral and basal). The position of each selected chromosome was detected by using fluorescence in situ hybridization (FISH). Green (FITC) staining represents the position of chromosome (n= 350 spermatozoa). Nuclei were stained in blue with DAPI. Nuclei were captured in Z-stacks by using confocal microscopy and subjected to deconvolution (Huygens software, Netherlands). Scale bar represents 5µm (white line). Chr: Chromosome.

Table 1: Regional mapping of chromosomes in WT and *Gpx5*^{-/-} mouse sperm nuclei.

The position of chromosomes was determined in WT and *Gpx5*^{-/-} mouse sperm nucleus using FISH. Spermatozoa (n=350) were counted for each tested chromosome and *per* genotype. Chr: Chromosome. N.D. not-determined.

Figure 2: Representative image of telomeres and centromeres positions in WT mouse sperm nucleus.

The centromere-specific histone H3 variant (CENP-A, red [A]) and telomeric probes ([B], red) were used in immunofluorescent or FISH approaches, respectively. Nuclei were stained in blue with DAPI. Nuclei were captured in Z-stacks by using confocal microscopy and subjected to deconvolution (Huygens software, Netherlands). The 3D models were obtained with Imaris software (Bitplane, Switzerland). The set of views *per* staining represented is a representative nucleus from a pool of 30 spermatozoa. Scale bar in confocal images represents 5 μ m (white line).

Figure 3: Representative image of chromatin components in WT mouse sperm nucleus.

Representative confocal and different views are shown for each component of sperm chromatin in mouse sperm nucleus: histone H3, histone variant H2A.Z, testis-specific histone variant TH2B, nuclear matrix protein Topoisomerase-II and β -tubulin in WT mouse sperm nucleus. Nuclei are captured in Z-stacks by using confocal microscopy and subjected to deconvolution (Huygens software, Netherlands). The 3D models are obtained with Imaris software (Bitplane, Switzerland). The set of views *per* component is a representative nucleus of 30 spermatozoa.

Figure 4: NaOH-mediated or DTT-mediated mild denaturation provokes distinct effects on WT and *Gpx5*^{-/-} nuclei.

Nuclei were captured in Z-stacks by using confocal microscopy and subjected to deconvolution (Huygens software, Netherlands). The 3D models were obtained with Imaris software (Bitplane, Switzerland). Each group of images is a representative nucleus out of 30 spermatozoa analysed *per* condition (A=without treatment; B=with NaOH treatment and C=with DTT treatment) for each genotype (WT, *Gpx5*^{-/-}). Nuclei were stained blue with DAPI. DTT: Dithiothreitol; NaOH: sodium hydroxide.

Table 2: Three-dimensional parameters of sperm nuclei according to the treatment and genotype.

Volume and surface area of nuclei were calculated from 3D photographs obtained of Z-stack of images generated with Imaris software (Bitplane, Switzerland). Nuclei were captured in Z-stacks by using confocal microscopy and subjected to deconvolution (Huygens software, Netherlands). The resulting distribution of the different parameters are shown in the table for each genotype (WT and *Gpx5*^{-/-}). The mean is calculated on 30 spermatozoa *per* condition. DTT: Dithiothreitol; NaOH: sodium hydroxide. a: $p < 0.001$ vs WT no treatment; b: $p < 0.001$ vs WT NaOH; c: $p < 0.001$ vs WT DTT; d $p < 0.001$ vs no treatment/genotype.

Supplemental

Supplemental Table 1: Three-dimensional parameters of sperm chromosomes in WT mouse sperm nucleus.

Volume and surface area of sperm chromosomes are calculated from 3D obtained of Z-stack of images generated with Imaris software (Bitplane, Switzerland). Chromosomes are captured in Z-stacks by using confocal microscopy and subjected to deconvolution (Huygens software, Netherlands). The resulting distribution of the different parameters are shown in the table. The mean is calculated on 30 spermatozoa *per* condition. The size of chromosome in base pairs (bp) and position are noted. NaOH: hydroxide sodium

Supplemental Figure 1: Correlation of volume/surface area and size.

The Spearman correlation graphs showing the linear relations existing between WT sperm chromosome volume (μm^3) or surface area (μm^2) and chromosome size in base pairs (bp). A: Apical; B: Basal; V: Ventral and D: Dorsal

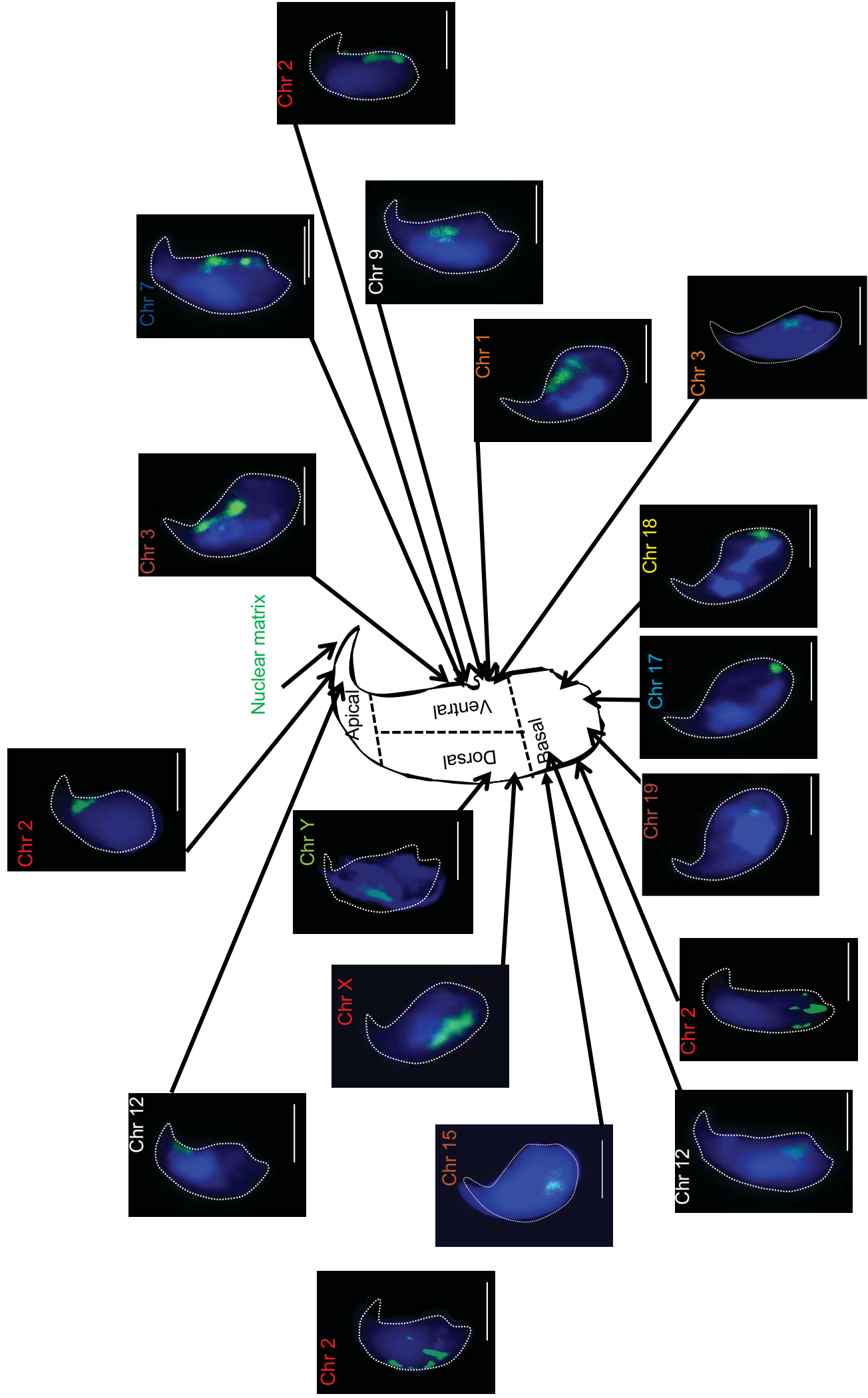


Figure 1

%	WT				<i>Gpx5</i> ^{-/-}			
	Basal	Apical	Ventral	Dorsal	Basal	Apical	Ventral	Dorsal
Chr 1	27.9	3.4	49.7	19	29.4	8.2	46.3	16.1
Chr 2	25.1	20.2	28.4	26.3	25.5	21	27.5	26
Chr 3	35.9	13.8	31.8	18.5	N.D.			
Chr 7	32.5	9.8	40.3	17.4	29	7.5	47.5	16
Chr 9	29.5	9.8	49	11.7	30	3.8	44.6	21.6
Chr 12	36.8	32.9	13.1	17.2	34.2	27.1	18.9	19.8
Chr 15	21.8	2.8	22.8	52.6	19	7	24	50
Chr 17	57.2	14.1	13.2	15.5	53.8	15.8	16.2	14.2
Chr 18	58.2	22.4	11.2	8.2	57.2	24.3	11.1	7.4
Chr 19	67.2	17	13.6	2.2	61.5	18.4	13.4	6.7
Chr X	7.7	20.7	7.5	64.1	5.3	30.3	4.1	60.3
Chr Y	3.8	29.9	7.2	59.1	4.5	25.4	5.3	64.8

Table 1

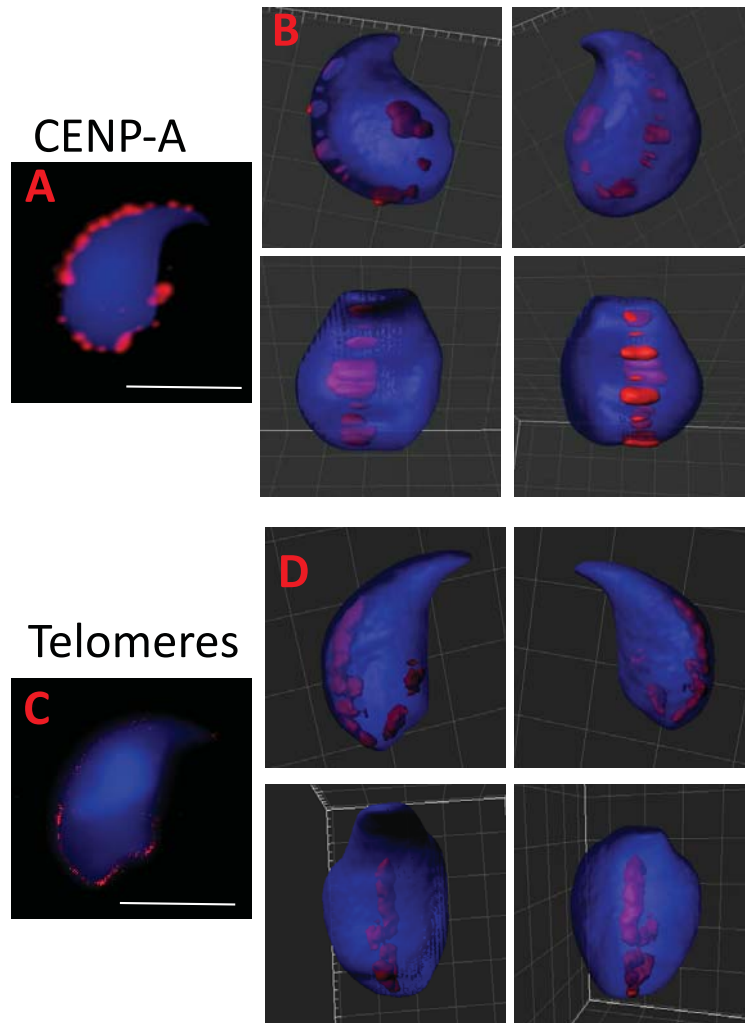


Figure 2

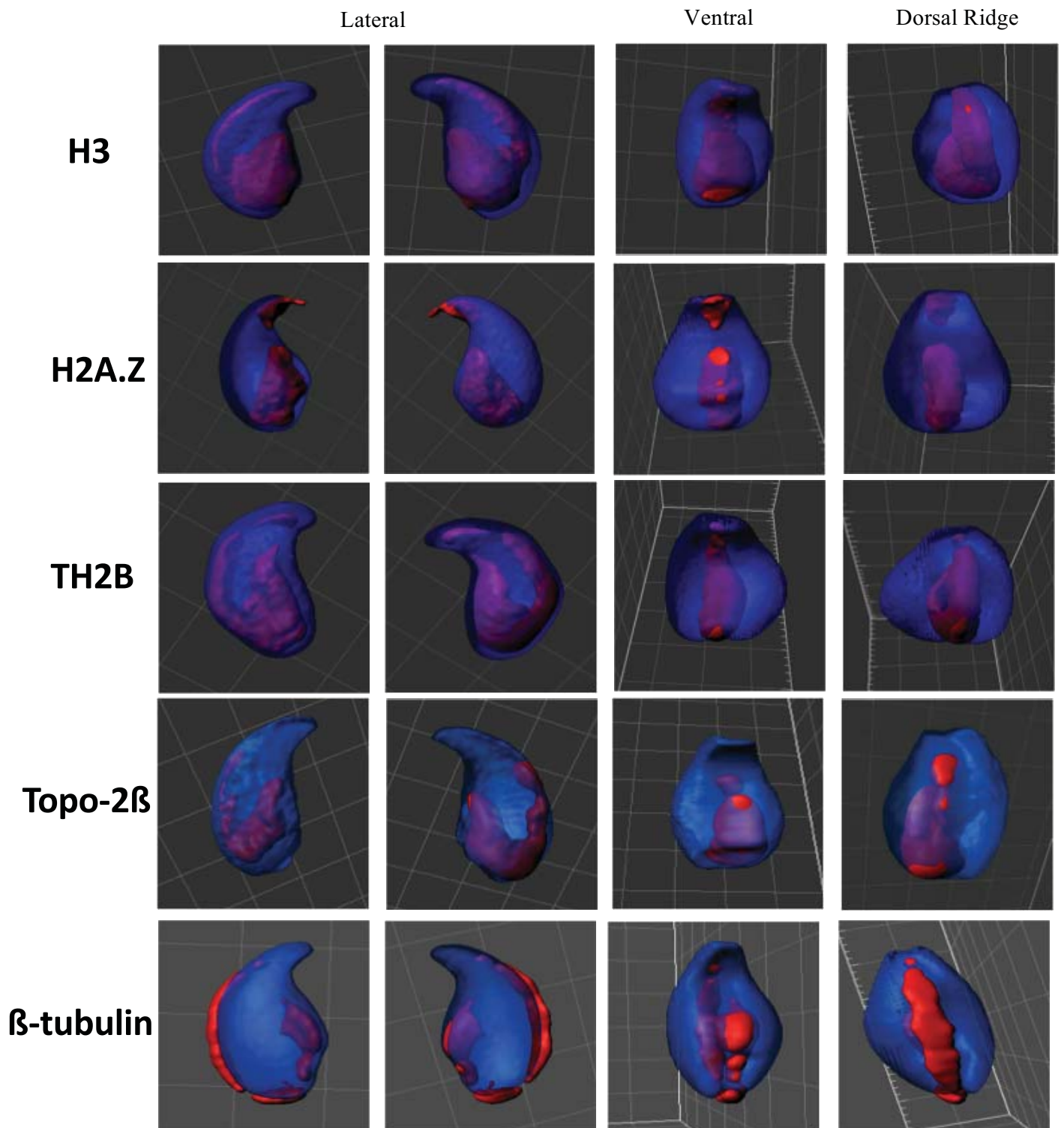


Figure 3

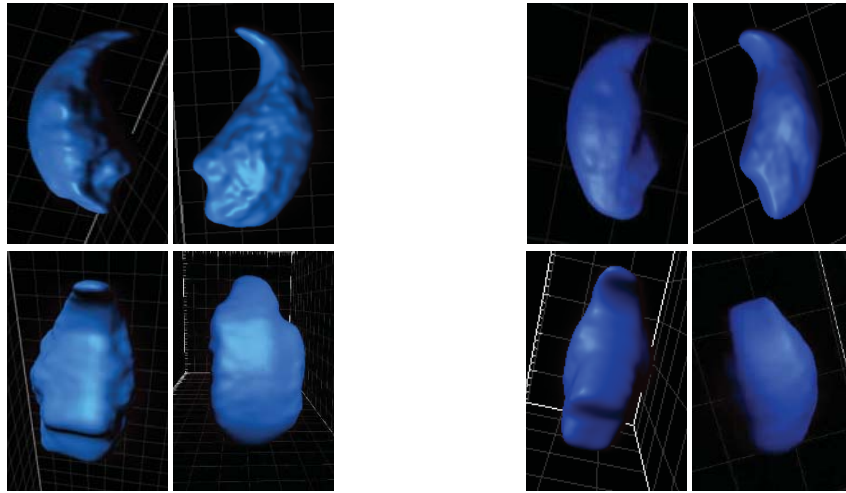
Nucleus no treatment	WT	<i>Gpx5</i> ^{-/-}
Average volume (μm^3)	66	54.8 ^a
Average Area (μm^2)	93.9	80.2 ^a
Nucleus with NaOH 1.5N treatment	WT	<i>Gpx5</i> ^{-/-}
Average volume (μm^3)	109 ^d	93.5 ^{b,d}
Average Area (μm^2)	138 ^d	113.5 ^{b,d}
Nucleus with DTT treatment (2mM, 45min)	WT	<i>Gpx5</i> ^{-/-}
Average volume (μm^3)	85.3 ^d	130.4 ^{c,d}
Average Area (μm^2)	108.4 ^d	143.3 ^{c,d}

Table 2

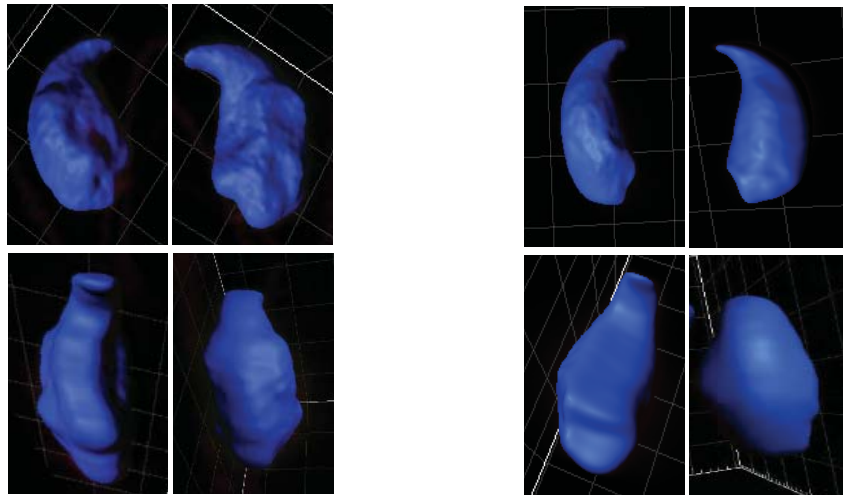
WT

Gpx5^{-/-}

A) No treatment



B) With NaoH 1.5N treatment



C) With DTT treatment (2mM 45min)

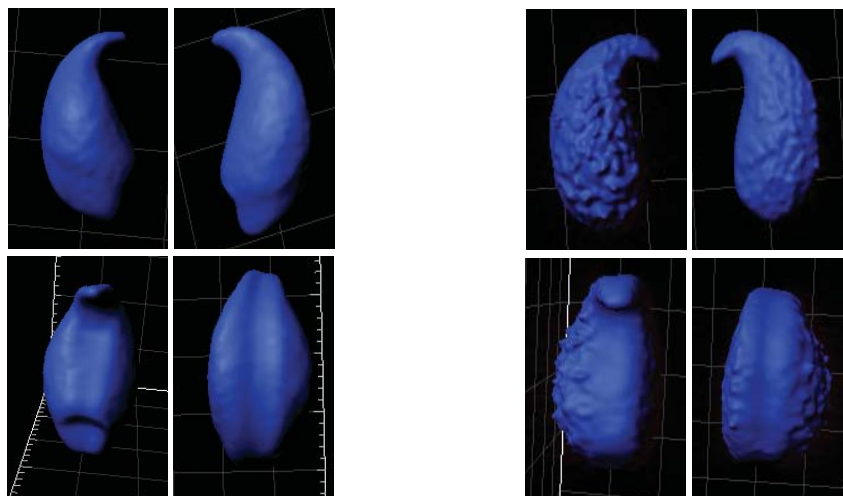
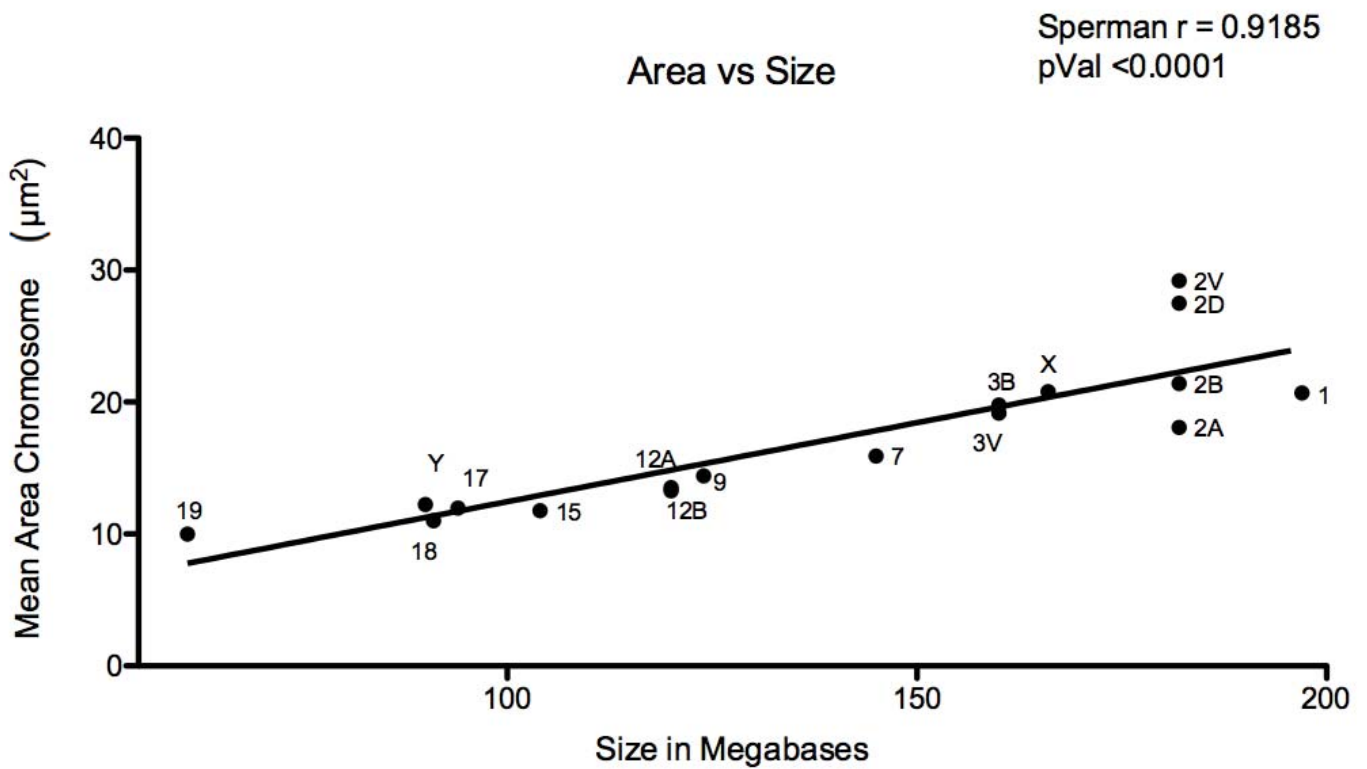
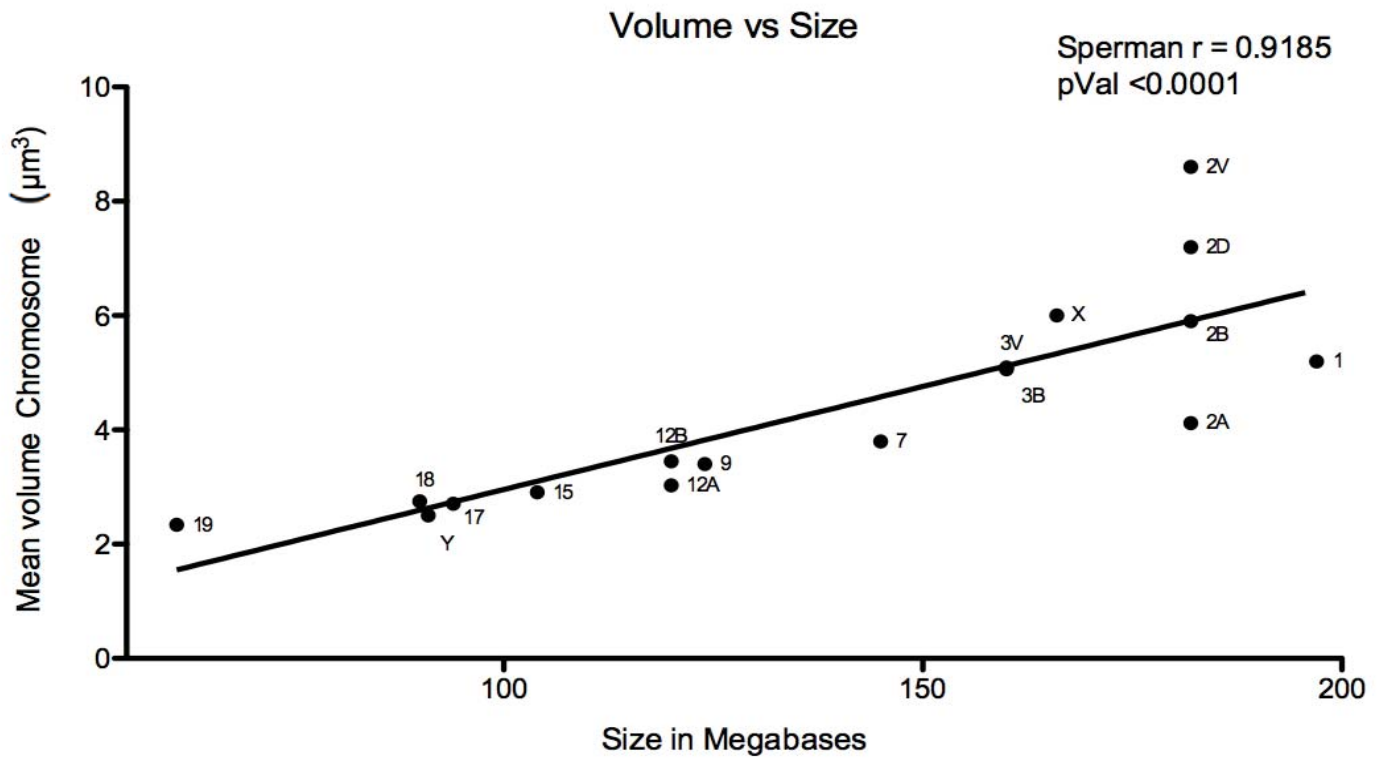


Figure 4

Chromosome with NaOH 1.5N treatment	WT			
n= 30	Size in bp (ENSEMBL)	Position	Average Volume (μm^3)	Average Area (μm^2)
Chromosome 1	197,195,432	Ventral	5.2	20.7
Chromosome 2	182,113,224	Apical	4.12	18.08
		Dorsal	7.2	27.5
		Ventral	8.6	29.2
		Basal	5.9	21.4
Chromosome 3	160,039,680	Basal	5.09	19.77
		Ventral	5.06	19.15
Chromosome 7	145,441,459	Ventral	3.8	15.9
Chromosome 9	124,076,172	Ventral	3.4	14.4
Chromosome 12	120,129,022	Basal	3.45	13.53
		Apical	3.03	13.28
Chromosome 15	104,043,685	Dorsal	2.91	11.77
Chromosome 17	94,987,271	Basal	2.71	11.96
Chromosome 18	90,772,031	Basal	2.75	12.23
Chromosome 19	61,342,430	Basal	2.34	10
Chromosome X	171,031,299	Dorsal	6	20.8
Chromosome Y	91,744,698	Dorsal	2.5	11

Supplemental Table 1



Supplemental Figure 1

II. L'appréciation des séquences liées aux histones persistantes attachées à la matrice nucléaire.

Le spermatozoïde qui est une cellule hautement différenciée, possède une chromatine particulière établie par le remplacement des histones par des protéines encore plus basiques, les protamines. En effet, lors de la spermatogenèse, il y a un remplacement des histones canoniques par des variants d'histones puis au cours de la spermiogenèse les histones vont être à leur tour remplacées par les protamines. Ces dernières vont permettre la formation d'un tore contenant 50 à 100 kb d'ADN autorisant une compaction extrême du noyau spermatique (environ sept fois plus petit que celui d'une cellule somatique en interphase ; Ward and Coffey, 1991). Néanmoins, il a été montré qu'il persistait des histones dans le noyau du spermatozoïde avec une large variabilité entre les espèces (Balhorn et al., 1991 ; Bench et al., 1996 ; Erkek et al., 2013 ; Gatewood et al., 1990 ; Hammoud et al., 2009 ; Tovich and Oko, 2003).

En utilisant des approches d'analyse globale du génome (immunoprécipitation de la chromatine, séquençage à haut débit), il a été déterminé que les histones persistantes (canoniques ou variants) dans le noyau spermatique ne sont pas distribuées au hasard et ne sont donc pas le résultat d'un défaut de leur remplacement par les protamines (Arpanahi et al., 2009 ; Hammoud et al., 2009, 2011).

Les histones persistantes se retrouvent dans deux structures :

- Au niveau de courtes séquences ADN entre deux tores de protamines, attachées à la matrice, révélées par le fait que ces régions sont sensibles à la DNase I (figure 19 ; Noblanc et al., 2013 ; Sotolongo et al., 2005).
- Dans des solénoïdes, structures retrouvées également dans les cellules somatiques, en forme d'hélice, à intervalle plus ou moins régulier (figure 19 ; pour revue voir Ward, 2010).

Par ces approches, il a été montré que les histones persistantes sont significativement enrichies au niveau des promoteurs de gènes codants pour des microARN, des gènes impliqués dans le développement embryonnaire précoce (facteurs de transcription, gènes HOX, protéines de signalisation tels que *Bmp4*, *Foxd3*, *Gata6* et *Hoxa9*,), de gènes soumis à l'empreinte parentale et de gènes impliqués dans la spermatogenèse (Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009). D'autres travaux ont révélé que les histones persistantes étaient aussi associées à des séquences intergéniques en dehors des régions régulatrices (Erkek et al., 2013 ; Kocer et al., 2015 ; Samans et al., 2014). En utilisant une approche d'analyse différentielle, Carone *et al.*, ont

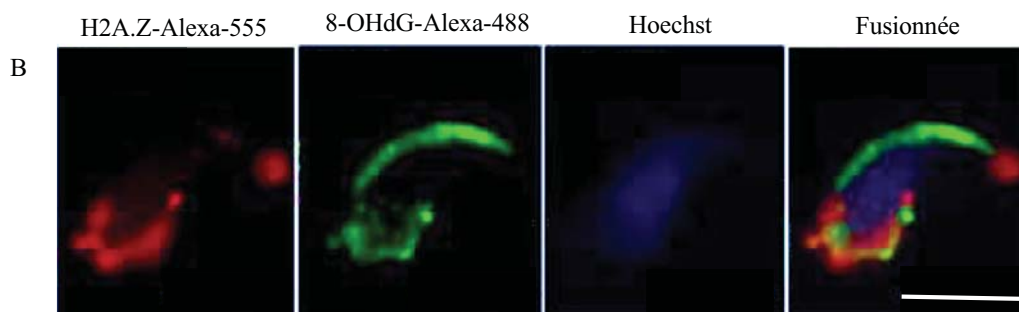
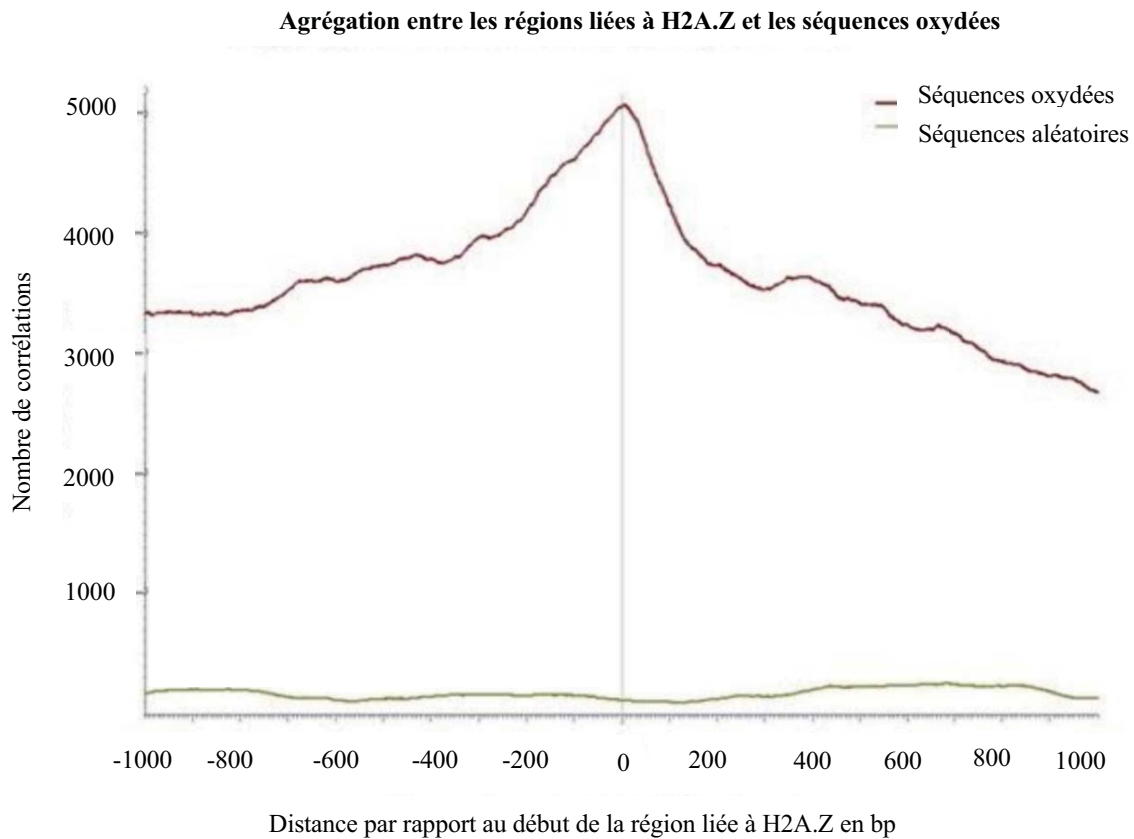


Figure 59 : Corrélation des séquences oxydées avec celles liées à H2A.Z

- A. Diagramme d'agrégation montrant l'enrichissement autour des séquences génomiques connues pour être associées au variant d'histone H2A.Z (Creyghton *et al.*, 2008). Des pics uniques obtenus par analyse *CISTER* pour toutes les histones ont été utilisés pour les analyses. La courbe rouge représente les séquences oxydées tandis que la courbe verte représente les séquences aléatoires.
- B. Co-localisation des régions liées à H2A.Z et celles oxydées dans le noyau spermatique murin. L'image confocale représentative montre la localisation du variant de l'histone H2A, H2A.Z (rouge, Alexa-555), l'oxydation de la guanine (vert, Alexa-488), le noyau (Hoechst) spermatique de souris *Gpx5^{-/-}*. Les images sont capturées en utilisant un microscope confocale (en *Z-stack*). La barre d'échelle sur l'image confocale fusionnée représente 5 μm (ligne blanche).

montré que les nucléosomes dans le noyau spermatique murin étaient principalement distribués dans des régions pauvres en gènes (Carone et al., 2014). De même, Samans *et al.*, ont montré dans les spermatozoïdes humains et bovins, un enrichissement en nucléosomes au sein de régions intergéniques distales et introniques, dans les séquences répétées centromériques et dans des rétrotransposons incluant les *LINE* et *SINE* (Samans et al., 2014). Toutefois, en utilisant une autre stratégie de bioanalyse adaptée pour analyser la similarité entre les séquences répétées, une équipe concurrente n'a pas été capable de reproduire ces résultats (Royo et al., 2016). Ces données plutôt contradictoires peuvent s'expliquer en partie par des approches de bioanalyses différentes ainsi que par les techniques de purification de l'ADN spermatique employées. A ce jour, il n'y a donc pas de véritable consensus sur les séquences ADN des spermatozoïdes de Mammifères qui restent associées aux histones. Nos travaux ont, en particulier, mis en avant que les régions d'attachement de la chromatine spermatique à la matrice nucléaire sont elles aussi riches en histones (figures 23 et 47 ; Kocer et al., 2015). Ces régions sont écartées lors des protocoles classiques de purification de l'ADN car solidement associées à la matrice nucléaire.

Ainsi, afin d'identifier ces séquences enrichies en histones et liées à la matrice nucléaire nous avons mis au point une approche de *chromatin immunoprecipitation* (*ChIP-seq*) sur chromatine spermatique murine. Ce protocole vise à séparer l'ADN associé aux histones persistantes liées ou non à la matrice afin d'identifier les gènes retrouvés dans chacune des fractions (liés ou non à la matrice nucléaire). Nous espérons que cette étude apportera une meilleure connaissance sur la distribution des histones dans le noyau spermatique murin.

La chromatine spermatique a été obtenue à partir de spermatozoïdes de souris sauvages (WT) et *Gpx5*^{-/-}, puis immunoprécipitée en utilisant les anticorps dirigés contre l'histone H3 (contrôle positif), le variant d'histones TH2B et l'IgG (contrôle négatif). Par ailleurs, nous souhaitons confirmer la corrélation que nous avons observée entre les séquences oxydées et celles liées à H2A.Z, c'est pourquoi nous avons aussi utilisé un anticorps dirigé contre le variant H2A.Z (figure 59 ; Creighton et al., 2008 ; Kocer et al., 2015 ; données non publiées). Le protocole de *ChIP* sur la chromatine spermatique permettant de séparer les régions histones liées ou non à la matrice nucléaire (figure 52) a été réalisé en triplicats.

Dans une analyse préliminaire des immunoprécipitations, nous constatons la présence de séquences d'intérêts dans les différentes fractions récupérées avant l'immunoprécipitation. L'étape de sonication permet de récupérer des séquences comprises entre 200 et 1000 pb, observables au niveau des surnageants (*smears*). Les *smears* ne sont pas visibles en gel

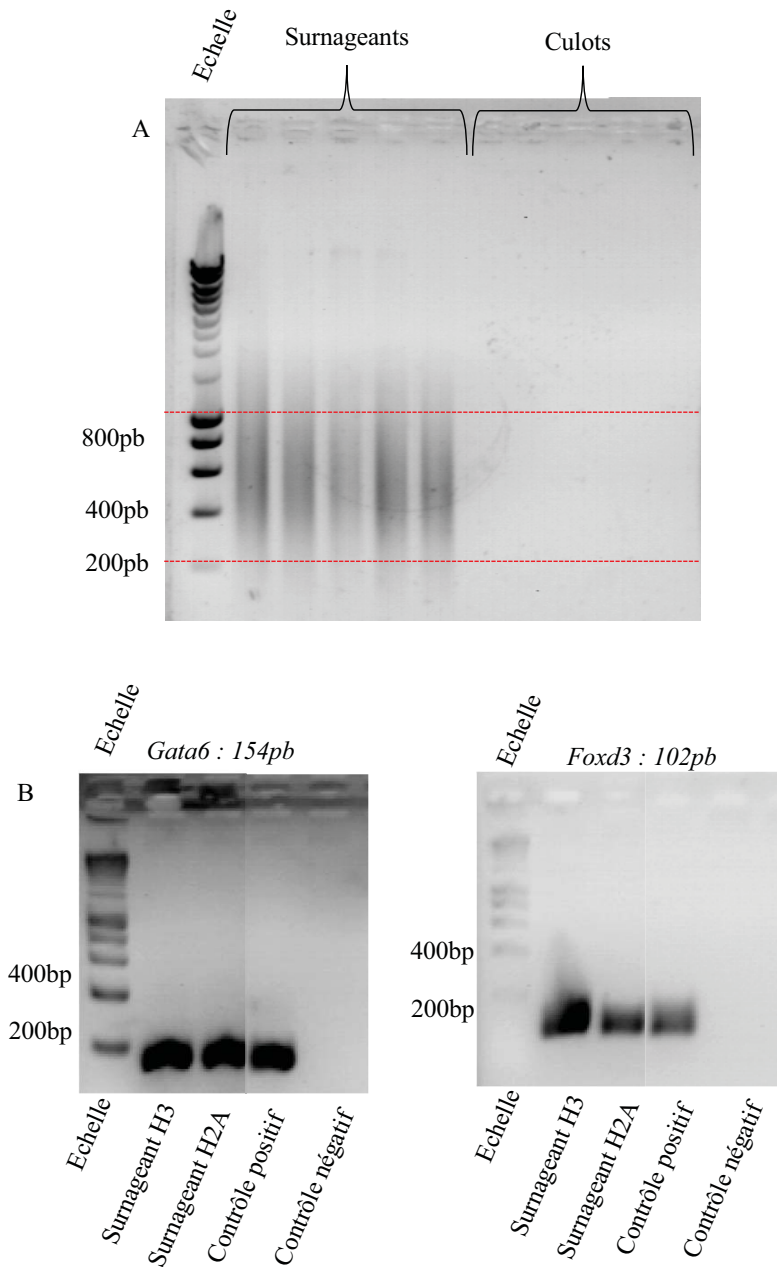


Figure 60 : Contrôle des séquences récupérées au niveau surnageant.

- A. L'ADN spermatique extrait est purifié et soniqué afin de le fragmenter. La taille des fragments d'ADN est analysée par électrophorèse, en présence de bromure d'éthidium (BET), présence de *smears* entre 200 et 1000 pb dans les surnageants. Absence de *smears* dans la fraction nucléaire (culot) car la quantité d'ADN récupéré est faible.
- B. Contrôle de la présence dans le surnageant de gènes connus pour être liés aux histones persistantes H3 et H2A.Z (*Gata6* et *Foxd3* ; Brykczynska *et al.*, 2010).

d'agarose dans la fraction culot car l'ADN récupéré est en trop faible quantité (Figure 60A). Les résultats de RT-PCR quantitative avec les gènes identifiés comme liés aux histones H3 et H2A.Z montrent que l'immunoprécipitation a bien fonctionné (figure 60B ; Brykczynska et al., 2010). La suite des données sera obtenue par le séquençage de l'ADN immunoprécipité (budget en attente) qui devrait nous permettre de discriminer les séquences liées aux histones persistantes et attachées à la matrice nucléaire, de celles liées aux histones et non-attachées à la matrice nucléaire. Par la suite, en utilisant la même approche analytique que nous avons employé précédemment (Kocer et al., 2015), nous analyserons les séquences ainsi récupérées. Il sera intéressant de confronter nos futures données à celles des différentes études publiées (Brykczynska et al., 2010 ; Carone et al., 2014 ; Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009 ; Royo et al., 2016 ; Samans et al., 2014). Nous pourrons aussi comparer les séquences obtenues avec celles oxydées obtenues par notre équipe en 2015 et voir si nous avons une relation entre les séquences liées aux histones persistantes, attachées à la matrice nucléaire et l'oxydation de l'ADN (Kocer et al., 2015).

Avec cette analyse, nous espérons répondre aux questions suivantes :

- ✚ Les nucléosomes sont-ils retenus principalement dans les îlots CpG (Erkek et al., 2013) ?
- ✚ Les nucléosomes sont-ils retenus principalement dans les régions intergéniques pauvres en gènes (Carone et al., 2014 ; Kocer et al., 2015) ?
- ✚ Quelles sont les séquences préférentiellement associées aux régions histone-liées et matrice nucléaire associées ?

En parallèle, des approches expérimentales telles que l'immuno-FISH permettront de confirmer les données ainsi obtenues. A terme, cette analyse d'immunoprécipitation de la chromatine spermatique permettra d'apporter une meilleure connaissance concernant le rôle des nucléosomes spermatiques lors de la formation du *pronucleus* mâle et le développement embryonnaire. Ces dernières années, il a été montré que la matrice nucléaire spermatique était impliquée dans la formation du *pronucleus* mâle et la réplication de l'ADN après la fécondation (Linnemann et al., 2009 ; Shaman et al., 2007a, 2007b). Ainsi, l'injection intracytoplasmique d'ADN spermatique nu seul ou co-injecté avec une matrice nucléaire spermatique isolée dans un ovocyte ne permet ni la formation du *pronucleus* mâle ni la réplication de ce dernier. Tandis que l'injection de matrice nucléaire spermatique uniquement associée aux courts fragments d'ADN à la base des tores (c'est-à-dire des fragments d'ADN associés aux *matrix attachment*

regions [ou MAR] spermatiques et donc contenant des histones persistantes), autorise la formation du *pronucleus* mâle et sa réplication, malgré une dégradation de l'ADN spermatique allant de 20% à 50% (Shaman et al., 2007a, 2007b). Nous pouvons donc nous demander si les histones persistantes qui sont liées à la matrice nucléaire peuvent avoir également un rôle dans ces processus. Des données évoquent la transmission et le rôle des histones persistantes spermatiques dans le développement précoce post-fécondation et la formation du *pronucleus* mâle (van der Heijden et al., 2006 ; Yamauchi et al., 2011). Par exemple, le variant de l'histone H3, H3.3 joue un rôle essentiel dans le zygote pendant la phase S lors de la transcription des domaines péri-centromériques déclenchant leur inhibition après le premier cycle cellulaire par l'acquisition de la méthylation H3K27 dans le *pronucleus* mâle (Santenard et al., 2010). Par ailleurs, le spermatozoïde porte également des modifications des histones. Par exemple la méthylation sur l'histone H3, H3K4me2 a été retrouvée au niveau des promoteurs des gènes des facteurs de transcription impliqués dans le développement, tandis que H3K9me3 est retrouvée dans les régions péri-centromériques. De plus, H3K4me3 sont associées aux promoteurs de gènes du développement, ie. les promoteurs des *clusters* de gènes HOX, alors que les marques H3K27me3 sont enrichies sur les promoteurs de gènes du développement qui sont réprimés dans l'embryon au stade précoce incluant les promoteurs bivalents, H3K4me3/H3K27me3 (Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009). Ainsi, ces histones canoniques et les variants qui persistent dans le génome paternel après la spermatogenèse semblent jouer un rôle essentiel dans le développement précoce de l'embryon et la formation du *pronucleus* mâle en lien avec la matrice nucléaire.

III. Impact du stress oxydant sur l'intégrité de l'épigénome spermatique

Ces dernières années, il a été montré que le spermatozoïde, une cellule transcriptionnellement et traductionnellement inactive (Bhatnagar et al., 1983 ; Gatewood et al., 1990), ne transmet pas uniquement le génome paternel à l'ovocyte lors de la fécondation mais aussi une information épigénétique (pour revue voir annexes Champroux et al., 2018). Outre le génome haploïde et les différentes marques épigénétiques portées par l'ADN lui-même (méthylation) et par les protéines qui constituent la chromatine (histones persistantes et leurs modifications post-traductionnelles), les spermatozoïdes apportent également un ensemble d'ARN (codants et non-codants).

D'une façon générale, la méthylation de l'ADN qui correspond à l'ajout d'un groupement méthyl sur le cinquième carbone de la cytosine, permet d'organiser la chromatine ainsi que la régulation de l'expression des gènes (Jones, 2012). La méthylation de l'ADN a un rôle d'inhibition de la transcription en conduisant à un encombrement stérique du grand sillon de l'hélice d'ADN et inhibant le recrutement des facteurs de transcription (Iguchi-Ariga and Schaffner, 1989 ; Nan et al., 1998 ; Prendergast and Ziff, 1991 ; Sasai and Defossez, 2009). La méthylation est retrouvée principalement au niveau des séquences répétées (rétrotransposons *LINE* et *SINE*, régions péri-centromériques), qui représentent près de la moitié du génome (Yoder et al., 1997). Cette méthylation de l'ADN est assurée par des ADN méthyltransférases (DNMT) classées en deux catégories selon qu'elles agissent *de novo* ou pour la maintenance des marques (Chen and Li, 2004 ; Holliday and Pugh, 1975). Selon le type cellulaire et la période de développement, le génome est plus ou moins méthylé (Bird, 1986 ; Bogdanović and Veenstra, 2009). Après la fécondation, le noyau spermatique va subir une déméthylation, cruciale pour établir la pluripotence des cellules embryonnaires. Ainsi, avant la réplication, le méthylome du noyau paternel va être reprogrammé principalement par un processus enzymatique. La cytosine méthylée va être reconnue et oxydée par des enzymes *ten-eleven translocation* (TET) conduisant à la formation de la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) ; elle-même transformée en 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxycytosine (5caC ; Tahiliani et al., 2009). Après la mise en place de ces dérivés oxydés de la cytosine méthylée (5hmC, 5fC et 5caC), ces marques seront finalement transformées en cytosine non méthylée par la voie de réparation de l'ADN, TDG-BER (pour *thymidine DNA glycosylase-base excision repair*) indépendante de la réplication (Kohli and Zhang, 2013). En accord avec la déméthylation massive du *pronucleus* mâle après la fécondation une accumulation de 5hmC a été observée (Amouroux et al., 2016 ; Gu et al., 2011 ; Iqbal et al., 2011). Néanmoins, certaines

régions ne seront pas déméthylées dans le *pronucleus* mâle telles que les régions contenant les éléments transposables, les gènes à empreinte parentale comme *Igf2/H19*, *Kcnq1*, *etc.* et les séquences répétées types *LINE* et *SINE* (Lane et al., 2003). L'absence de déméthylation de ces régions est assurée par des protéines telles que Stella (ou PGC7), *Zfp57* ou *Trim28* retenues au niveau de ces régions (Nakamura et al., 2007 ; Quenneville et al., 2011 ; Zuo et al., 2012). Des études récentes ont montré que l'inactivation de l'une de ces protéines conduit à une létalité embryonnaire due en partie à des défauts d'expression de gènes à empreinte (Messerschmidt et al., 2012) ou à une levée de la répression des rétrotransposons (Kim et al., 2016).

Des erreurs dans l'établissement de la méthylation du génome paternel *via* les DNMT lors de la spermatogenèse ou lors de l'effacement de celle-ci après la fécondation sont à l'origine d'infertilités ou de défauts de développement embryonnaire. La perte de la méthylation résulte soit d'une délétion ou d'une mutation dans la séquence génique (Horsthemke, 2014), d'une disomie parentale (Yamazawa et al., 2010) ou encore d'une épimutation qui correspond à une altération de la méthylation (Delaval et al., 2006). D'autres facteurs peuvent affecter le méthylome spermatique tels que les facteurs environnementaux (pour revue voir : Pacchierotti and Spanò, 2015).

De façon similaire, l'utilisation des procédures de procréation médicalement assistée (PMA) peuvent altérer les marques épigénétiques de *loci* à empreinte parentale en affectant leur expression (pour revue voir : Canovas et al., 2017). Plusieurs études ont rapporté un lien entre la PMA et des défauts d'empreintes parentales. L'incidence d'obtenir des enfants avec un syndrome de type Angelman, Prader-Willi, Beckwith-Wiedmann (Chang et al., 2005), Silver-Russell (Chopra et al., 2010) ainsi que des rétinoblastomes (Marees et al., 2009) est plus élevée chez les enfants conçus par PMA comparés à ceux nés de fécondations naturelles (Amor and Halliday, 2008 ; Iliadou et al., 2011 ; Kelley-Quon et al., 2013). Les études montrent en particulier que des enfants conçus par ICSI présentant un syndrome de Beckwith-Wiedmann ou de Silver-Russell ont une hypométhylation de la région *Igf2/H19* (Chang et al., 2005 ; Chopra et al., 2010).

Comme pour la méthylation (5mC), des études récentes montrent que la marque 5hmC est présente au sein du noyau des cellules somatiques telles que les cellules neurales et n'interviendrait donc pas uniquement dans le processus de déméthylation. Il est proposé qu'elle serait aussi un acteur du contrôle de l'expression génique (Almeida et al., 2012) qui pourrait

être impliqué dans le développement de maladies si cette marque était dérégulée. En effet, des analyses de séquençage à haut débit montrent que la 5hmC est enrichie sur des promoteurs bivalents de gènes et de régions enhanceurs (Branco et al., 2011 ; Pastor et al., 2011). De plus, de nombreuses études ont montré que la dérégulation de la 5hmC est liée à des troubles neurologiques et psychiatriques. Un certain nombre de situations tel le syndrome de Rett (Szulwach et al., 2011), le vieillissement et la maladie d'Alzheimer (Chouliaras et al., 2013 ; López et al., 2017 ; Shu et al., 2016), les mélanomes (Fu et al., 2017 ; Papale et al., 2017), la maladie de Huntington (Villar-Menéndez et al., 2013 ; Wang et al., 2013), les syndromes de tremblement/ataxie associés à la fragilité du chromosome X (FXTAS ; Yao et al., 2014), l'ataxie-télangiectasie (Li and Jiang, 2015), la schizophrénie, les troubles bipolaires et la dépression (Matrisciano et al., 2013 ; Tseng et al., 2013), l'autisme (Peñagarikano et al., 2011) sont associés à des changements significatifs du profil de 5hmC que ce soit en termes de distribution altérée de la 5hmC soit du ratio 5hmC/5mC perturbé.

Néanmoins, même si des erreurs des protéines TET peuvent en partie expliquer ces défauts, les causes sous-jacentes de la variation de la quantité de 5hmC au sein du noyau des cellules restent à être explorées. Des modèles murins invalidés pour une, voire les trois enzymes TET ont été créés pour étudier les variations de 5hmC au sein de l'organisme (pour revue voir : Wu and Zhang, 2017). Par exemple, les souris invalidées pour *Tet1* présentent des défauts au niveau de l'hippocampe (Dawlaty et al., 2011 ; Moran-Crusio et al., 2011 ; Rudenko et al., 2013 ; Zhang et al., 2013) ; tandis que l'invalidation de *Tet3* cause un arrêt de développement des embryons (Dawlaty et al., 2014 ; Gu et al., 2011). Des mutations du gène *Tet2* entraînent des lymphomes ou des cancers myéloïdes chez l'homme et la souris (Langemeijer et al., 2009). Dans ces modèles murins ou dans les cellules cancéreuses, la baisse de l'activité des TET est associée à une diminution de la marque 5hmC (Haffner et al., 2011 ; Yang et al., 2013). Malgré cela, les rôles et les mécanismes associés à la 5hmC restent peu documentés.

Quelques études montrent déjà que le profil 5hmC peut varier en réponse à certaines situations. Chez la souris, un changement du profil de la marque 5hmC sur des gènes impliqués notamment dans la neurotransmission (canal potassium *Kcnx*) ou dans la voie Notch, a été rapporté dans l'hippocampe après un stress aigu (test de nage en continu sur 30 min ; Li et al., 2016). De même, une augmentation des marques 5hmC est observée au sein de cellules pancréatiques cancéreuses conduisant à une régulation positive de gènes oncogéniques tels que *Myc* impliqué dans la néoplasie (Bhattacharyya et al., 2017). De façon étonnante en contexte

de stress oxydant suite à l'inactivation des enzymes *Gpx1/2* chez la souris il a été montré, après analyse globale du génome, une baisse des marques 5hmC (Delatte et al., 2015). Néanmoins, les auteurs notent que quelques régions du génome présentent au contraire une augmentation de l'hydroxyméthylation en réponse au stress oxydant. Cette augmentation de l'hydroxyméthylation est notamment retrouvée dans des séquences codant pour des micro-ARN impliqués dans la réponse au stress oxydant (Delatte et al., 2015). Les auteurs notent que l'activité des enzymes TET est affectée en réponse au stress oxydant ce qui conduit à un changement dans le profil de la 5hmC (Chia et al., 2011 ; Delatte et al., 2015). Malgré ces observations contradictoires, il a néanmoins été proposé que l'augmentation avec l'âge du stress oxydant (en raison de l'installation d'un déséquilibre dans le recyclage/génération des espèces oxygénées réactives) pouvait modifier les profils de 5mC en 5hmC (pour revue voir : Rang and Boonstra, 2014). Plus récemment, une augmentation du profil 5hmC a été montrée associée à des infertilités (Efimova et al., 2017 ; Wang et al., 2015) mais les mécanismes qui conduisent à cette augmentation chez ces patients infertiles sont encore obscurs.

Ainsi plusieurs questions émergent de ces situations :

- ✚ L'activité des enzymes TET est-elle perturbée par les situations de stress oxydant ?
- ✚ La 5-méthylcytosine peut-elle être oxydée de façon spontanée, en contexte pro-oxydant sans intervention enzymatique (Madugundu et al., 2014), comme c'est le cas pour d'autres bases de l'ADN telle que la guanine (pour revue voir : Kino et al., 2017).

Étant donné la susceptibilité particulière du spermatozoïde vis-à-vis du stress oxydant et les impacts développementaux que nous (et d'autres auteurs) avons observés lorsque des fécondations sont réalisées avec des spermatozoïdes dont les noyaux présentent des altérations oxydantes (Chabory et al., 2009 ; Sabeti et al., 2016) nous pouvons nous poser la question de savoir si l'altération des profils de 5mC en 5hmC est en partie en cause ? Cette question, outre son importance fondamentale, est particulièrement pertinente en clinique où les techniques de procréation médicalement assistée (PMA) exposent éventuellement les gamètes mâles à des situations d'oxydation lors des phases de sélection et de cryopréservation des gamètes. A ce titre, les modèles murins transgéniques que nous avons développés dans l'équipe, s'avèrent être très pertinents pour tester l'impact d'un stress oxydant post-testiculaire sur l'intégrité du méthylome spermatique. Par extension, si le profil 5hmC des spermatozoïdes est altéré dans une situation de stress oxydant, quelles peuvent être les conséquences sur la descendance ? En particulier, nous pouvons faire l'hypothèse qu'une perturbation du profil de 5hmC pourrait

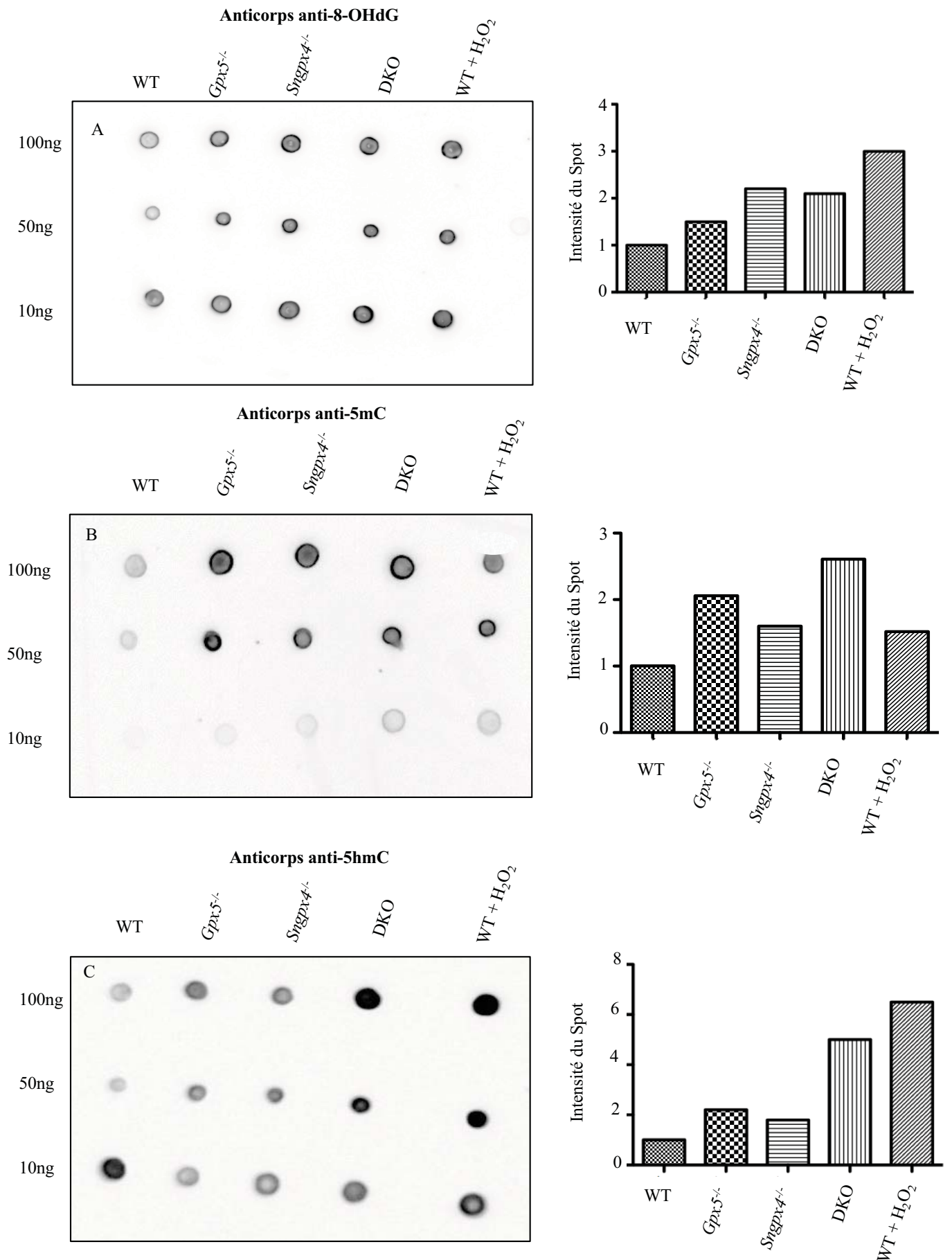


Figure 61 : Immunoblot sur l'ADN spermatique de souris sauvages vs transgéniques.

Une approche d'immunoblot a permis de quantifier la présence de l'oxydation de la guanine (A), de la méthylation de la cytosine (B) et de l'hydroxyméthylation (C) dans le noyau spermatique de souris sauvages et invalidées pour *Gpx5*, *Sngpx4* et les deux.

Le graphe représente une quantification des immunoblots pour la quantité 100 ng d'ADN (n=3).

DKO : *Sngpx4*; *Gpx5*^{-/-}

perturber la reprogrammation épigénétique du *pronucleus* mâle après la fécondation (c'est-à-dire provoquer la déméthylation anormale de certaines régions qui normalement devraient rester méthylées).

A. Quantification de la méthylation de l'ADN spermatique

Afin de quantifier la 5mC et la 5hmC dans le noyau spermatique des individus WT et transgéniques (*Gpx5*^{-/-}, *Sngpx4*^{-/-} et *Sngpx4;Gpx5*^{-/-} aussi dénommée DKO), nous avons réalisé un immunoblot sur de l'ADN spermatique en utilisant des anticorps spécifiques de ces résidus méthylés ou hydroxyméthylés (tableau 4). Nous avons également quantifié en parallèle le taux d'oxydation de l'ADN spermatique (marquage 8-OHdG) dans ces différents génotypes. L'immunoblot a été réalisé sur trois expériences différentes avec des lots différents d'ADN afin d'établir des quantifications statistiques minimales de chacune des marques. L'image présentée est représentative d'un immunoblot et la quantification a été réalisée sur les trois expériences et représentée en *fold* par rapport au WT (figure 61).

Concernant le niveau d'oxydation nucléaire spermatique (figure 61A), nous observons une augmentation de l'oxydation de l'ADN chez les souris *Gpx5*^{-/-} et de façon plus importante chez les souris DKO et le contrôle positif dans lequel les spermatozoïdes de souris WT ont été traités avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ceci est en accord avec nos résultats antérieurs déjà publiés (Chabory et al., 2009 ; Noblanc et al., 2013). De façon surprenante, concernant le niveau de 5mC (figure 61B) nous observons une augmentation significative (x2) de la 5mC chez les souris *Gpx5*^{-/-} et DKO et de moindre importance sur l'ADN des spermatozoïdes WT traités avec l'H₂O₂. Ces résultats préliminaires laissent suggérer qu'il y a une augmentation du profil 5mC spermatique chez les animaux transgéniques en contexte de stress oxydant. Concernant le niveau de 5hmC, en accord avec l'hypothèse qu'une situation de stress oxydant post-testiculaire pourrait augmenter le niveau d'oxydation des 5mC, nous observons une augmentation de la 5hmC sur les spermatozoïdes de nos modèles de souris transgéniques *Gpx5*^{-/-} (x2) et DKO (x5). Nous observons également sur l'échantillon WT contrôle traité par l'H₂O₂ une augmentation importante de la 5hmC (figure 61C). Le fait que nous puissions observer dans l'échantillon WT contrôle traité à l'H₂O₂ une augmentation significative des marques 5hmC démontre clairement qu'une situation oxydante post-testiculaire *ex-vivo* peut provoquer spontanément (c'est-à-dire en dehors d'un mécanisme dépendant des TET) une augmentation de l'oxydation de la 5mC du noyau spermatique.

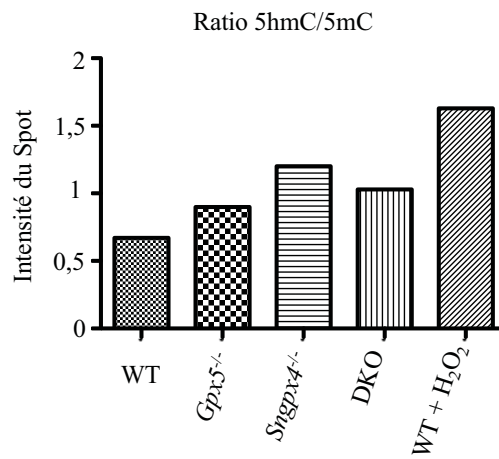


Figure 62 : Augmentation de la 5hmC dans l'ADN spermatique des souris transgéniques.

Afin de quantifier une augmentation de l'oxydation de la 5-méthylcytosine nous établissons le ratio 5hmC/5mC à partir de chaque immunoblot (figure 59). DKO : *Sngpx4*;*Gpx5*^{-/-}.

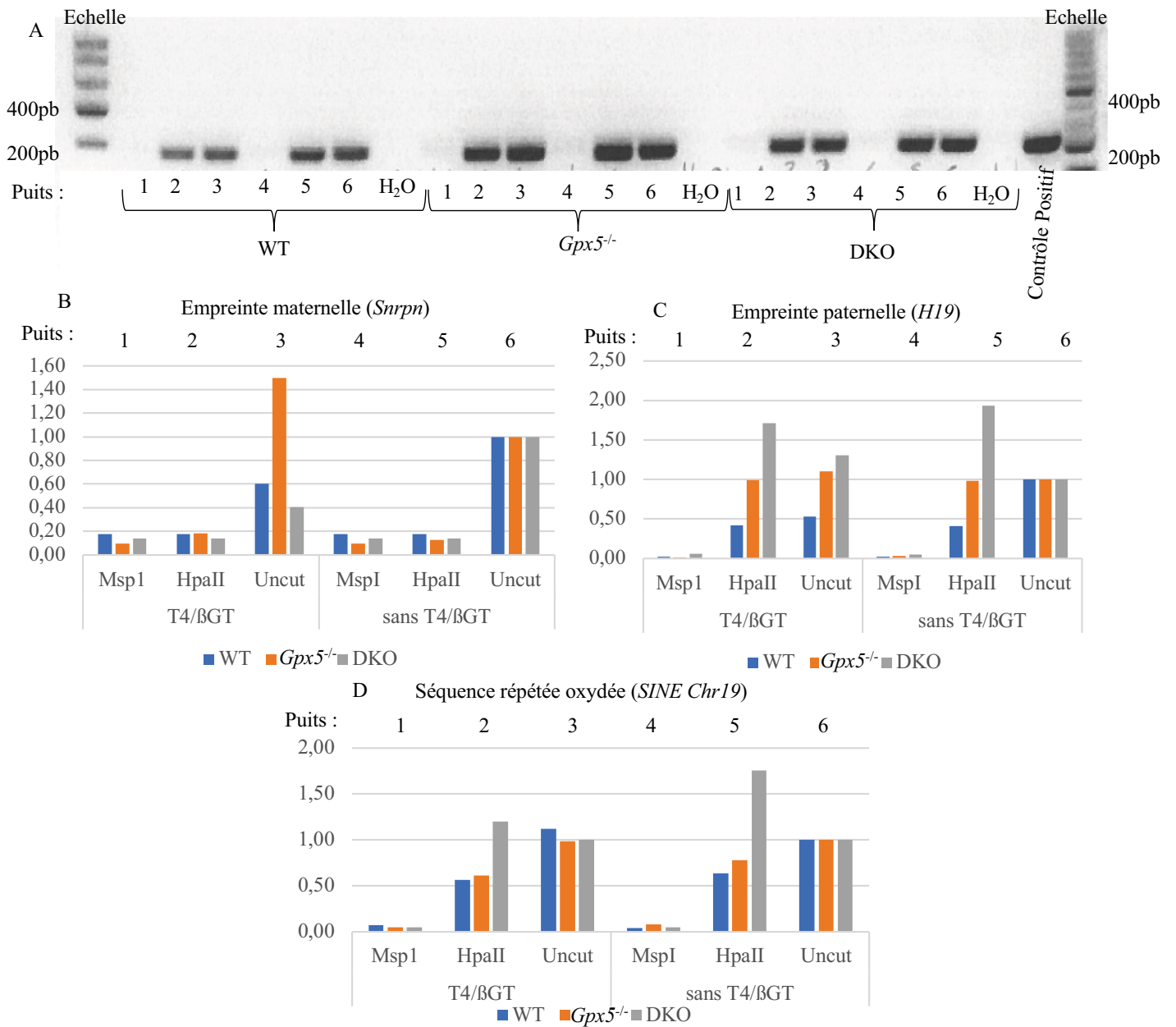


Figure 63 : Identification des régions 5hmC au sein du noyau spermatique

Utilisation du Kit Epimark[®] pour identifier les régions 5hmC/5mC. Validation du protocole après digestion puis amplification par PCR (A). Parmi les séquences à empreinte parentale *Snrpn* correspond à un gène méthylé maternellement (B) et *H19* paternellement (C). Le *SINE* Chr19 correspond à une séquence oxydée dans le noyau spermatique de souris *Gpx5*^{-/-} (D).

WT en bleu, *Gpx5*^{-/-} en orange et DKO en gris. DKO : *Sngpx4*;*Gpx5*^{-/-} ; *SINE* : Short Interspersed Nuclear Element

Si nous comparons les ratios 5hmC/5mC dans chacun des contextes (figure 62), nous constatons que ce ratio augmente chez les souris *Gpx5*^{-/-}, *Sngpx4*^{-/-} et DKO ainsi que pour l'ADN de spermatozoïdes WT soumis à l'H₂O₂ confirmant qu'indépendamment de la stimulation des marques 5mC par la situation pro-oxydante on assiste dans chaque cas à une augmentation de la 5hmC.

2. Identification des régions génomiques associées à la marque 5hmC

Afin d'identifier les régions associées aux marques 5hmC, nous avons utilisé le kit EpiMark[®] qui permet de convertir la 5hmC en 5ghmC. Ce traitement empêche les enzymes de restriction MspI/HpaII de digérer les régions initialement 5hmC. En conséquence, les séquences portant la marque 5hmC restent intactes et amplifiables par PCR (figure 63A). A l'inverse, les régions qui portent des 5mC ou des C non méthylées seront digérées différenciellement par MspI/HpaII et donc non amplifiables par PCR. En effet, MspI coupe les régions méthylées et non méthylées et HpaII ne coupe que les régions non méthylées (figure 53). Nous avons testé ce kit sur l'ADN spermatique des souris WT, *Gpx5*^{-/-} et DKO en ciblant des séquences régulatrices de gènes connus comme étant soumis à l'empreinte parentale paternelle (ou DMR) tel que *H19*. En parallèle, nous avons aussi ciblé un gène non méthylé dans le noyau paternel (*Snrpn*) qui sera un contrôle de l'absence de méthylation dans l'ADN spermatique. Enfin, nous avons testé également une région *SINE* retrouvée oxydée suite à l'analyse bio-informatique des séquences spermatiques oxydées dans le modèle de souris *Gpx5*^{-/-} (figure 50 ; tableau 5 ; Kocer et al., 2015).

Ainsi, si la région est hydroxyméthylée, nous avons une amplification par PCR après la digestion par MspI (puits 1) et si cette région est méthylée, nous attendons une amplification après digestion par HpaII (puits 2). Le gène *Snrpn* n'est pas méthylé dans le spermatozoïde. Nous n'observons pas d'amplification de cette région après digestion par MspI et HpaII (puits 1 et 2) confirmant ainsi l'absence de méthylation mais aussi d'hydroxyméthylation (figure 63B). Le gène *H19* quant-à-lui est connu pour être méthylé dans le spermatozoïde. Nous observons bien qu'après la digestion par HpaII (puits 2), une amplification de cette région est possible particulièrement chez les souris transgéniques démontrant une augmentation de la méthylation de cette région dans ces contextes génétiques pro-oxydant. Néanmoins, il n'y a pas d'amplification après digestion par MspI (puits 1) ce qui indique donc que cette région ne présente pas de 5hmC (figure 63). Les résultats obtenus par cette stratégie montrent une augmentation de la 5mC chez les souris transgéniques et sont en accord avec les résultats

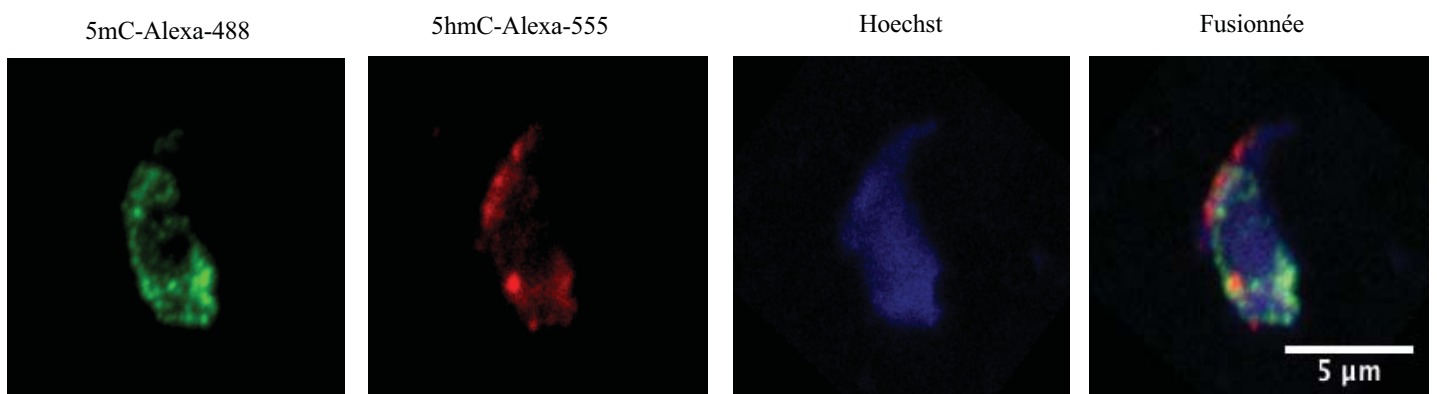


Figure 64 : Co-localisation de la méthylation et de l'hydroxyméthylation dans le noyau spermatique.

L'image confocale représentative montre la méthylation des cytosines (Alexa-488), l'hydroxyméthylation (Alexa 555) dans le noyau de spermatozoïde (Hoechst) murin *wild-type*. La barre blanche sur l'image fusionnée représente l'échelle (5 μm).

immunoblots présentés précédemment (figure 63D). Les régions connues comme étant des régions à empreinte maternelle ne sont pas méthylées dans le génome spermatique (contrôle négatif ; figure 61B ; *Snrpn*) en accord aussi avec ce qui était attendu. Néanmoins, aucune des régions géniques arbitrairement choisies ne présentent la marque 5hmC (figure 63C et D et tableau 5).

C. Immunolocalisation de la méthylation spermatique

Après extraction des spermatozoïdes de la queue d'épididyme de souris *wild-type* (WT), nous procédons à une immunofluorescence en conditions dénaturantes pour localiser la 5-méthylcytosine (5mC) et la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). Nous montrons que la 5-méthylcytosine et la 5-hydroxyméthylcytosine sont localisées dans les régions périphériques et basales du noyau spermatique murin (figure 64).

Les résultats préliminaires que nous présentons ici tendent à confirmer qu'un stress oxydant au niveau épидидymaire, peut modifier le méthylome spermatique. En effet, nous constatons une augmentation de la 5-méthylcytosine (5mC) dans l'ADN des souris transgéniques par deux approches différentes (immunoblot et le kit EpiMark®). Nous constatons également une augmentation de la 5-hydroxyméthylcytosine par l'approche d'immunoblot uniquement.

Nous montrons que par une approche d'immunofluorescence, les régions méthylées (5mC) et hydroxyméthylées (5hmC) semblent co-localiser avec les régions oxydées (figures 47, 64). Néanmoins, nous n'avons pas pu identifier de façon précise les régions hydroxyméthylées (5hmC) chez les souris transgéniques.

Cette approche devra être poursuivie en choisissant dans un premier temps d'autres régions connues pour être méthylées dans le noyau spermatique, voire rapportées pour être hydroxyméthylées dans d'autres types cellulaires. Par exemple les cellules neurales soumises à un stress (Li et al., 2016 ; Popoli et al., 2011) où les gènes intervenant dans la voie Notch et ceux codant pour des canaux potassium (*Kcnx*) ont été montrés hydroxyméthylés (Li et al., 2016 ; Popoli et al., 2011). Il faut cependant garder en mémoire qu'au cours de l'analyse des séquences oxydées rapportées dans notre étude précédente (Kocer et al., 2015), nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les séquences oxydées et des régions méthylées hormis les régions *SINE* (figure 50). Il sera à terme nécessaire d'entreprendre une approche d'analyse globale du génome afin d'identifier les régions méthylées et différentiellement

hydroxyméthylées entre les souris WT, *Gpx5*^{-/-} et DKO (Booth et al., 2013 ; Khoueiry et al., 2017 ; Kirschner et al., 2018) et de les comparer avec celles oxydées analysées précédemment (Kocer et al., 2015).

Ainsi, à ce stade nous avons pu montrer qu'un stress oxydant épидидymaire peut partiellement modifier l'organisation de la chromatine ainsi que l'épigénome spermatique. La suite de mon projet a été de savoir si un apport en antioxydants pouvait corriger les dommages oxydants à l'ADN spermatique.

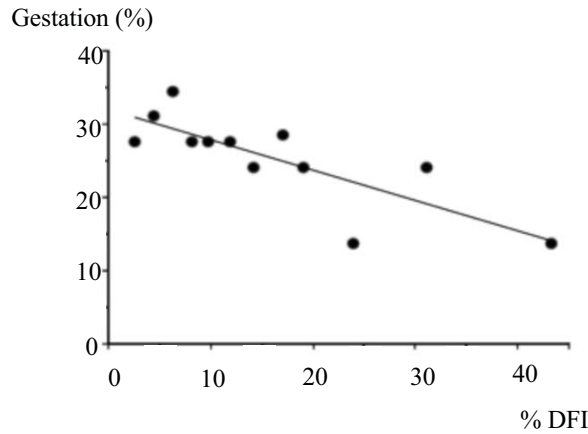
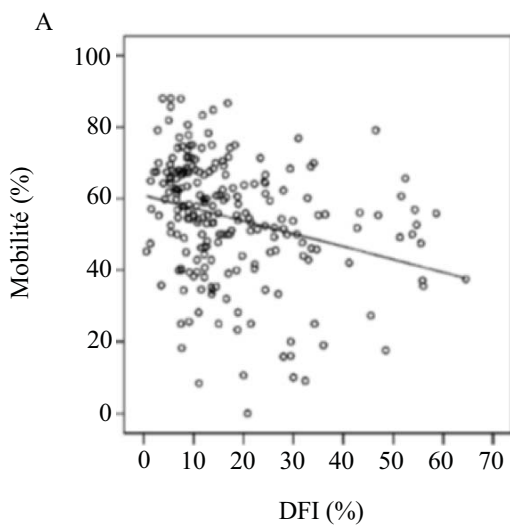


Figure 65 : Taux de gestation en fonction du pourcentage d'ADN spermatique fragmenté.

Le pourcentage d'ADN spermatique a été évalué par la technique de SCSA « *sperm chromatin structure assay* ». Le taux de gestation a été évalué pour chaque couple dont l'infertilité était principalement liée à l'homme, (n= 125 patients regroupés en groupes classés selon le nombre de FIV ou ICSI réalisées).

DFI : *DNA fragmentation index*.

(Modifiée d'après Speyer *et al.*, 2010).



B

	FIV		ICSI	
DFI	<9%	>27%	<9%	>27%
Taux d'avortement (%)	8,7 (2/23)	16,7 (2/12)	9,1 (1/11)	40 (4/10)

Figure 66 : Taux de fragmentation de l'ADN spermatique est corrélé à la diminution de la mobilité spermatique et à une augmentation du taux d'avortements en PMA.

Plus la fragmentation de l'ADN spermatique augmente (DFI) plus la mobilité du spermatozoïde diminue (A). Plus le DFI augmente plus les avortements d'embryons sont fréquents (B).

Mesure du taux de fragmentation de l'ADN spermatique (DFI) par SCSA® (*Sperm chromatin structure assay*); DFI : *DNA fragmentation index*, Fécondation *in vitro* (FIV) ou ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*).

(Modifiée d'après Lin *et al.*, 2008).

IV. Une supplémentation orale antioxydante peut-elle corriger le stress oxydant épididymaire ?

Title: A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models.

P. Gharagozloo^{#1}, A. Gutiérrez-Adan², **A. Champroux³**, A. Noblanc³, A. Kocer³, A. Calle², S. Pérez-Cerezales², E. Pericuesta², A. Polhemus¹, A. Moazamian¹, J.R. Drevet³, and R.J. Aitken^{4,5}

Corresponding authors: parviz.gharagozloo@celloxess.com

¹CellOxess LLC, 15 Roszel Road, Princeton, NJ 08540, USA ; ²INIA, Animal Reproduction, Madrid 28040, Spain ; ³GReD Lab CNRS UMR6293- INSERM U1103 Université Blaise Pascal-Clermont II, Clermont-Ferrand 63001, France ; ⁴Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, NSW 2305, Australia ; ⁵The University of Newcastle, University Drive, Callaghan, NSW 2308, Australia

Mots-clés : Stress oxydant, supplémentation orale antioxydante, spermatozoïdes, fertilité

Introduction

La fécondation et le développement embryonnaire dépendent en grande partie de l'intégrité du génome paternel. Les techniques pour évaluer les dommages à l'ADN spermatique (tableau 1) ne sont pas utilisées couramment par les centres de procréation médicalement assistée (PMA) où seules la mobilité, la morphologie et, éventuellement la numération sont prises en compte. Cependant, 50% des infertilités masculines dites idiopathiques présentent une semence normale après les analyses de routine (pour revue voir : Ray et al., 2012). Une partie de ces infertilités est fortement liée aux dommages à l'ADN spermatique tels que : les défauts de compaction, la fragmentation et l'oxydation. En effet, il est clairement admis par les cliniciens et les chercheurs qu'il existe une corrélation étroite entre les échecs de procréation (en conception naturelle ou en PMA) et les taux de fragmentation de l'ADN (Evenson and Wixon, 2006 ; Zhang et al., 2008) ou les atteintes oxydantes de l'ADN spermatique (Aitken and De Iuliis, 2010 ; Shen et al., 1999). Des approches ont ainsi été mises en place afin de mesurer le taux de fragmentation au sein du noyau spermatique telles que le TUNEL ou le SCSA pour *sperm chromatin structure assay* (Evenson et al., 1999 ; Evgeni et al., 2014). Il a été montré qu'au-delà d'un seuil de 30% de fragmentation de l'ADN (DFI>30),

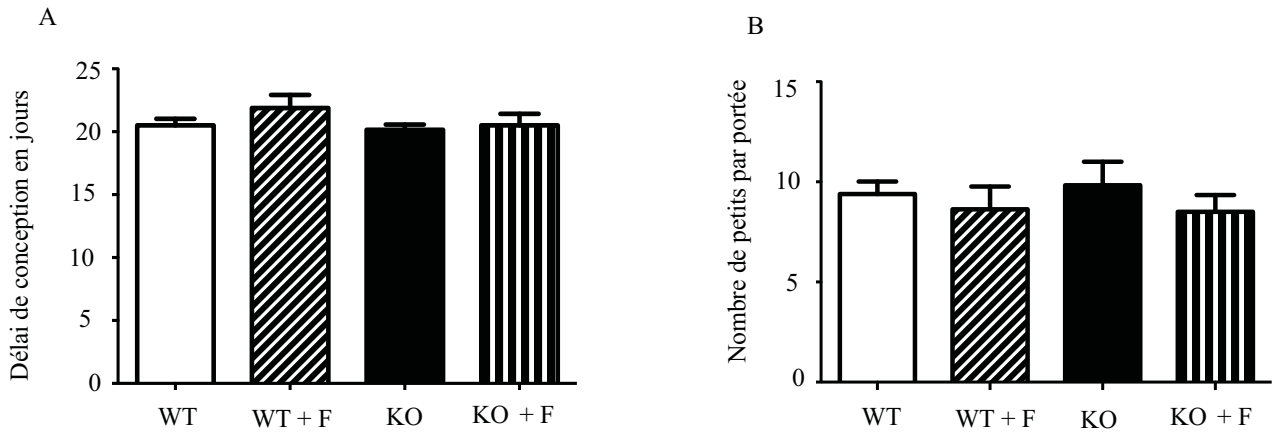


Figure 67 : Le Fertilix® n'améliore pas la fertilité.

Les souris mâles de chaque groupe ont été croisées avec des femelles sauvages CD1 et le délai de conception (A) ainsi que le nombre de petits par portée (B) ont été établis. Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été réalisé.

n=8 pour les souris sauvages traitées et non traitées.

n=6 pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®.

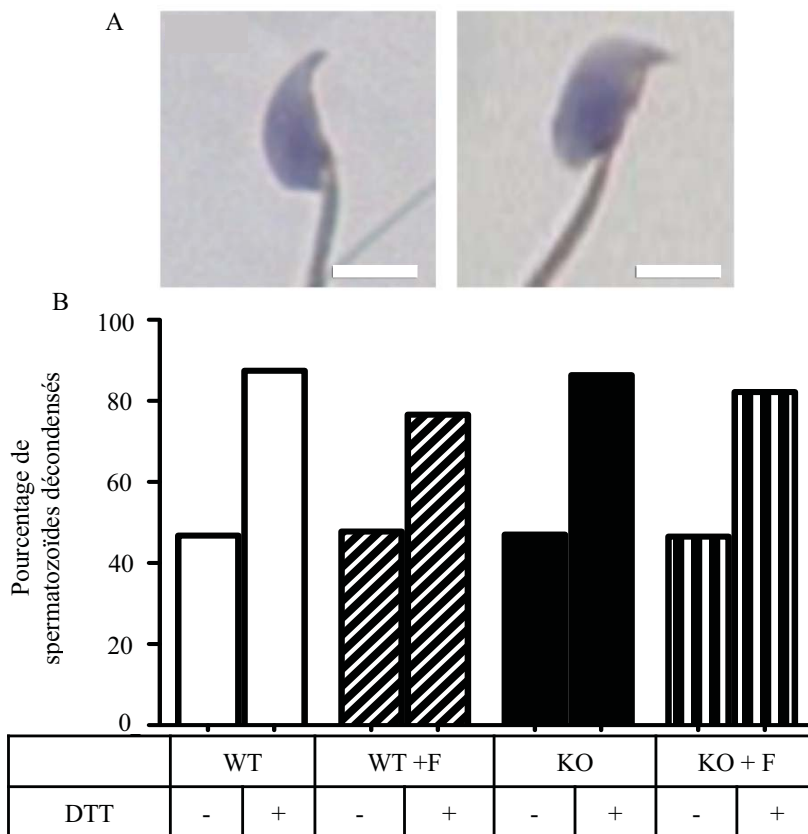


Figure 68: Le Fertilix® n'affecte pas la compaction de la chromatine spermatique.

A) Photos représentant un spermatozoïde ayant une tête non décondensée (à gauche) ou décondensée (à droite). Le trait blanc représente l'échelle (5 µm).

B) Les spermatozoïdes ont subi un traitement de décondensation *via* un agent réducteur, (le dithiothréitol, DTT). Après coloration de Shorr, le pourcentage des spermatozoïdes décondensés a été établi. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour les analyses statistiques.

n=8 pour les souris sauvages traitées et non traitées.

n=6 pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®.

évaluées par ces techniques, les échecs en conception naturelle ou artificielle sont plus importants (Boe-Hansen et al., 2006 ; Evenson et al., 1999 ; Lin et al., 2008 ; Rex et al., 2017 ; Speyer et al., 2010 ; figures 65, 66). Malgré ces observations cliniques, la mesure de la fragmentation de l'ADN spermatique n'est pas inscrite dans l'évaluation des paramètres spermatiques établie par l'OMS de même que les atteintes oxydantes. De manière générale, aucune mesure de l'intégrité du noyau spermatique est réalisée bien que l'importance de ce critère dans la réussite de la fécondation et le développement embryonnaire soit démontré (pour revue voir : Ioannou et al., 2016).

Ainsi, l'évaluation des dommages à l'ADN (fragmentation, oxydation) pourrait permettre une meilleure prise en charge des patients présentant des infertilités. Une première stratégie serait de développer une technique pour isoler les spermatozoïdes présentant peu ou pas de dommages à l'ADN avant leur utilisation en PMA. Certaines techniques de sélection existent déjà, comme les centrifugations sur gradient de densité (Percoll[®]), le « *swim-up* » et le *MSOME* (*Motility sperm organelle morphology examination* qui caractérise les vacuoles), cependant ces techniques permettent de sélectionner les spermatozoïdes mobiles et morphologiquement normaux sans présumer de leur niveau de dommages à l'ADN (Sakkas et al., 2000). De plus, ces techniques, qui imposent une manipulation des spermatozoïdes, sont elles-mêmes sources de dommages oxydants à l'ADN (Agarwal et al., 2006 ; Alvarez and Storey, 1992 ; Arias et al., 2017 ; Goto et al., 1993 ; Rappa et al., 2016 ; Shekarriz et al., 1995 ; Drevet, 2017).

Une autre stratégie serait de traiter les hommes infertiles dont les spermatozoïdes présentent des dommages oxydants, avec des antioxydants. En effet, plusieurs études ont montré une diminution dans le liquide séminal de nombreux antioxydants et/ou une augmentation du niveau des molécules oxydantes chez des hommes infertiles comparés à des hommes fertiles (Ahmadi et al., 2016 ; Aitken and Clarkson, 1987 ; Alvarez and Storey, 1992 ; Fraga et al., 1996). Par exemple, des fumeurs présentent une diminution de la concentration en α -tocophérol dans le liquide séminal conduisant à une augmentation de la guanine oxydée au niveau du noyau spermatique (Fraga et al., 1996). Des patients asténozoospermiques montrent une diminution importante de la concentration en vitamine C dans le liquide séminal (Lewis et al., 1997). En outre, des patients infertiles présentent des diminutions importantes de l'activité d'enzymes antioxydantes dans le liquide séminal telles que la superoxyde dismutase (SOD) ou les glutathione peroxydases (GPx ; Dorostghoal et al., 2017). De plus, ces patients présentent des taux élevés d'un dérivé de la peroxydation lipidique, le malondialdéhyde

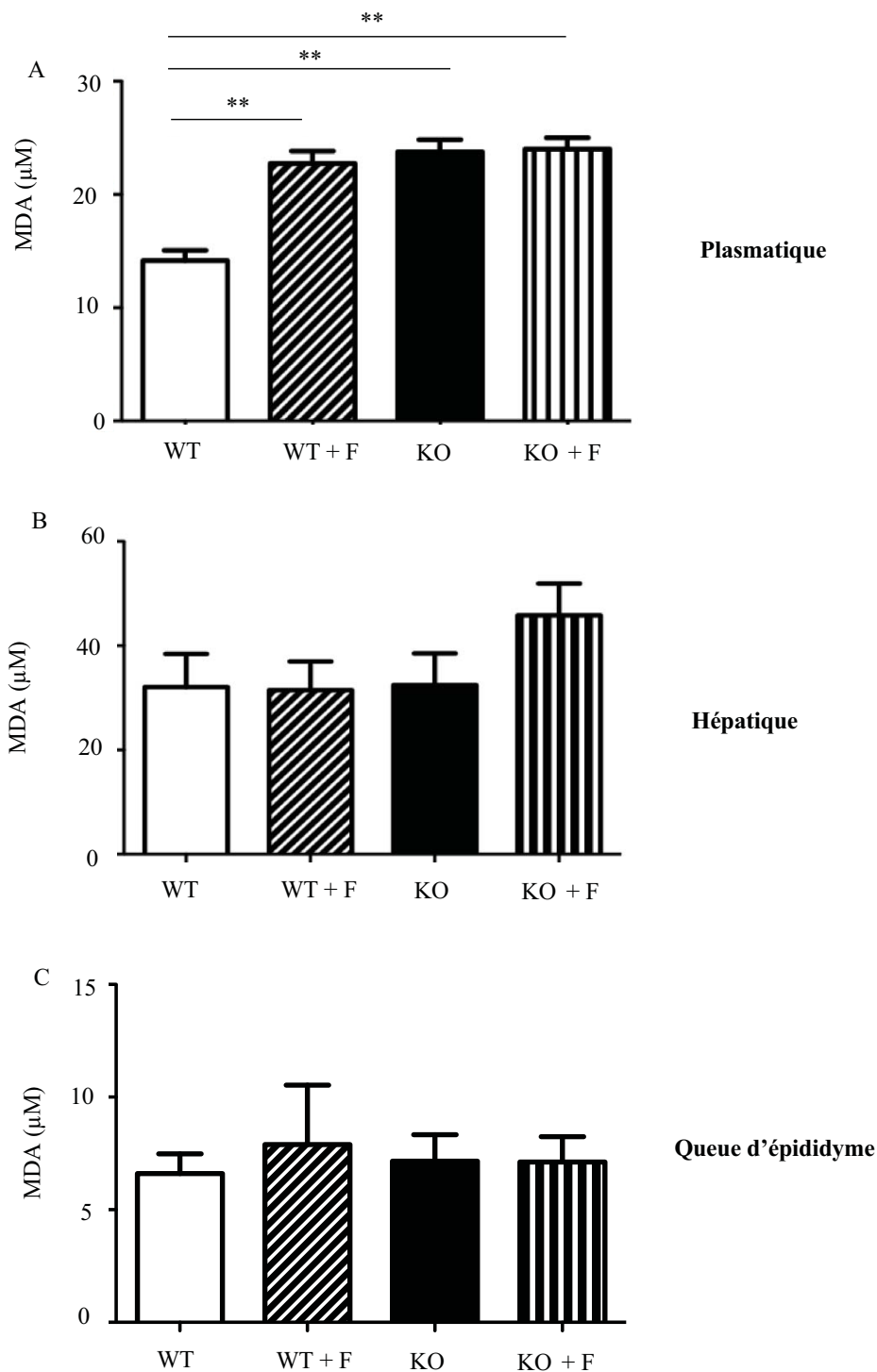


Figure 69 : Mesure de la peroxydation lipidique chez les souris traitées ou non avec le Fertilix®.

Le niveau de peroxydation lipidique est mesuré en évaluant la concentration en malondialdéhyde, exprimée en μM, au sein du plasma (A), des cellules hépatiques (B) et de la queue d'épididyme (C) dans chacun des quatre lots de souris (WT et KO traitées ou non au Fertilix®). Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été effectué entre chaque catégorie : *p < 0,05 ; ** p < 0,01.

n=8 pour les souris sauvages traitées et non traitées.

n=6 pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®.

(MDA), corrélés avec une baisse de la mobilité des spermatozoïdes (Dorostghoal et al., 2017). D'autres études ont montré que des traitements oraux antioxydants chez l'homme auraient un effet bénéfique sur la mobilité des spermatozoïdes et qu'ils contribueraient à baisser le niveau de fragmentation de l'ADN spermatique (Greco et al., 2005 ; Menezo et al., 2014 ; Talevi et al., 2013). Un ensemble d'antioxydants (zinc, aspartate, coenzyme Q10) permet de maintenir la mobilité des spermatozoïdes lors de procédures de PMA (Talevi et al., 2013). De même, un cocktail de vitamines (C et E) conduit à réduire le niveau de fragmentation de l'ADN spermatique (Greco et al., 2005). Un autre composé antioxydant a été étudié chez des patients infertiles, le sélénium qui est nécessaire au fonctionnement optimal d'enzymes comme certains membres de la famille des glutathione peroxydases (Pieczyńska and Grajeta, 2015 ; Ursini et al., 1999). En effet, des déficiences en sélénium conduisent à une réduction de la mobilité des spermatozoïdes (Noack-Füller et al., 1993) et son apport couplé avec d'autres molécules antioxydantes (vitamines, GSH...), contribue à une protection de la mobilité (Keskes-Ammar et al., 2003 ; Vézina et al., 1996) et à une amélioration des paramètres spermatiques tels que la morphologie ou la numération (Safarinejad and Safarinejad, 2009).

Cependant, des études ont aussi rapporté que les antioxydants en excès ou une mauvaise association d'antioxydants peuvent au contraire conduire à des situations néfastes pour les gamètes (Hawkes and Turek, 2001). A titre d'exemple, la vitamine C à haute dose est connue pour provoquer la réduction des ponts disulfures entre les protamines induisant une décondensation de la chromatine et une augmentation de la fragilité du noyau spermatique (Giustarini et al., 2008). A ce jour, l'abondante littérature concernant l'utilisation d'une supplémentation orale antioxydante en correction de l'infertilité mâle ne permet pas de conclure quant à l'efficacité d'une telle approche. Cette situation confuse a de multiples origines : les études ont été réalisées sur des effectifs faibles, sans contrôle placebo la plupart du temps, dans des conditions très variées (populations de patients infertiles, formulations antioxydantes pas comparables, doses et durées de traitement ; pour revues voir Gharagozloo and Aitken, 2011 ; Lombardo et al., 2011 ; Ross et al., 2010). De plus, aucune mesure directe de l'oxydation de l'ADN spermatique n'est réalisée dans ces différentes études.

Pour tenter de diminuer cette confusion, nous avons utilisé la lignée *Gpx5^{-/-}* pour tester dans un contexte contrôlé l'efficacité d'une supplémentation orale antioxydante à corriger le niveau d'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes. Nous avons arbitrairement choisi d'utiliser une supplémentation orale antioxydante, le Fertilix® (CellOxess, New Jersey, Etats-Unis) dont la composition en antioxydants a été élaborée de façon raisonnée avec une approche rigoureuse

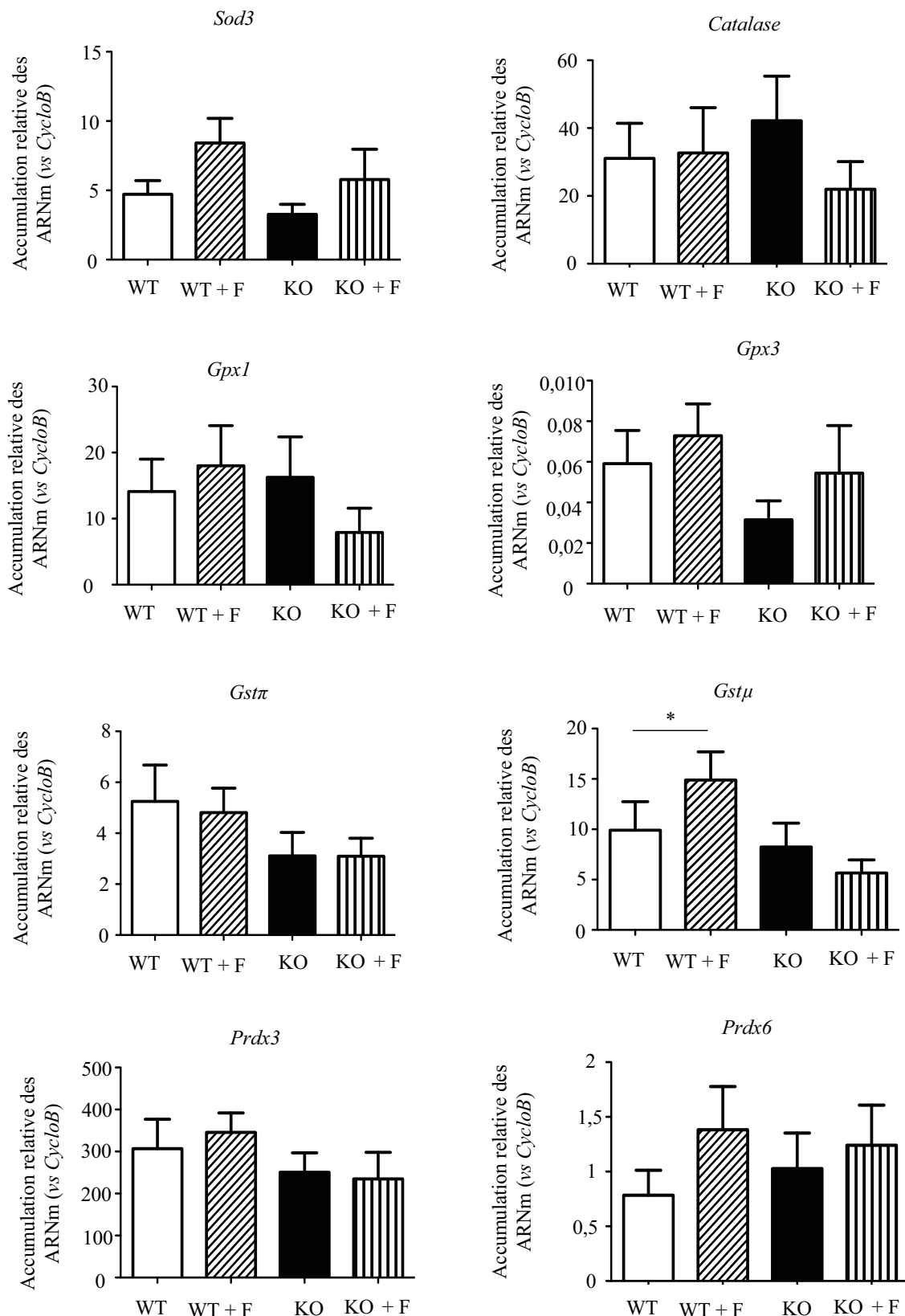


Figure 70 : Expression des enzymes antioxydantes dans le foie.

L'accumulation relative des ARNm des différents gènes codants pour des enzymes antioxydantes a été déterminée par qRT-PCR dans le foie de chaque catégorie. Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été effectué entre chaque catégorie : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

$n=8$ pour les souris sauvages traitées et non traitées.

$n=6$ pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®. *Cyclo B*: *cyclophiline B*

telle que mise en œuvre dans l'industrie pharmaceutique « *drug design process* ». Cette formulation a été développée dans le cadre d'une collaboration scientifique qui associe le Professeur John Aitken (Université de Newcastle, Australie), le Professeur Joël Drevet (Université Clermont Auvergne, France) et le *C.E.O.* (*chief executive officer*) de la société de Biotechnologie (Celloxess) basée aux Etats-Unis, le Dr. Parviz Gharagozloo. Des souris sauvages (WT) et *Gpx5*^{-/-} (KO) ont ainsi été supplémentées ou non en antioxydants, et les spermatozoïdes de ces individus ont été analysés en termes de numération, de condensation nucléaire et de niveau d'oxydation nucléaire. En parallèle, des analyses moléculaires et biochimiques ont été conduites de façon à vérifier si la supplémentation antioxydante pouvait aussi modifier le statut oxydant du tissu épидидymaire dans la région où les spermatozoïdes sont stockés entre deux éjaculations, la queue d'épididyme. Cette approche, à finalité plus appliquée, a pour objet d'apporter des preuves expérimentales précliniques solides quant à la réelle efficacité correctrice des suppléments oraux en antioxydants pour les patients infertiles présentant un ADN spermatique oxydé, en amont de véritables essais cliniques qui restent à faire.

Article et résultats complémentaires

Résultats complémentaires

1. Test de fertilité

Nous avons testé si la supplémentation orale antioxydante, en plus de corriger le niveau d'oxydation de l'ADN spermatique, pouvait améliorer la fertilité *via* la mesure du délai de conception et du nombre de petits par portée. Nous n'observons aucune variation dans ces deux paramètres entre les souris WT et *Gpx5*^{-/-} (KO) traitées ou non avec le Fertilix® (figure 67). Il est à noter que pour les croisements impliquant les mâles *Gpx5*^{-/-} (KO), nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de la mortalité périnatale et les problèmes développementaux contrairement à ce qui avait été décrit précédemment (Chabory et al., 2009). Cette différence pourrait s'expliquer par le choix des femelles de souche CD1 utilisées pour ce test. En effet, ces femelles sont réputées pour être de bonne fécondité par rapport à la souche C57Bl/6 utilisée par Chabory et al., 2009. Il est possible que la capacité de réparation des ovocytes CD1 soit meilleure pour corriger les atteintes oxydantes. Nous pourrions envisager de reconduire ces analyses de fertilité en utilisant des femelles de souche identique aux mâles (C57Bl/6).

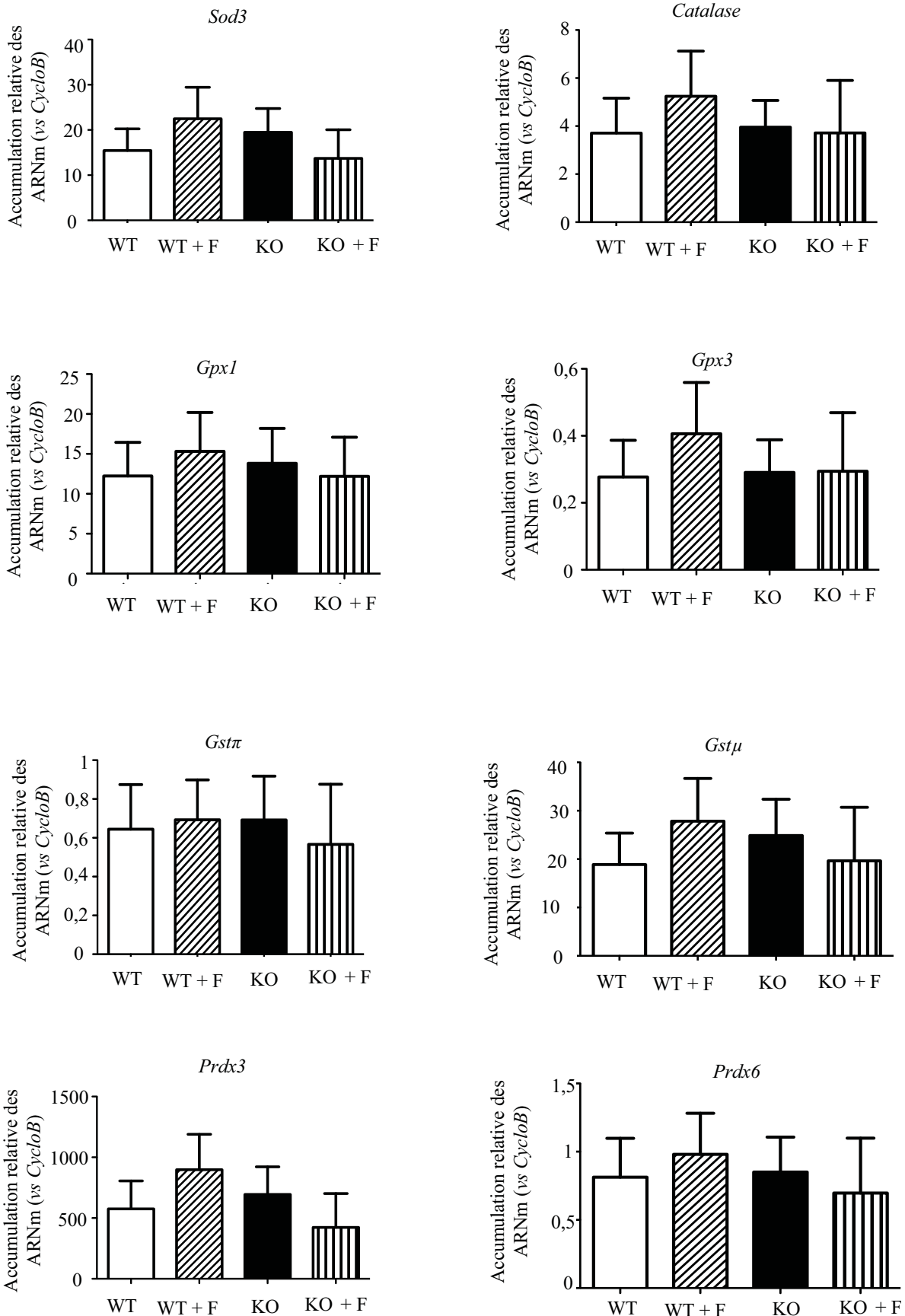


Figure 71 : Expression des enzymes antioxydantes dans le testicule.

L'accumulation relative des ARNm des différents gènes codants pour des enzymes antioxydantes a été déterminée par qRT-PCR dans le testicule des souris de chaque catégorie. Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été effectué entre chaque catégorie : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

$n=8$ pour les souris sauvages traitées et non traitées.

$n=6$ pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®. *Cyclo B*: *cyclophiline B*

2. Sensibilité à la décondensation

Nous avons vu au préalable, qu'un certain niveau d'oxydation est nécessaire pour obtenir une condensation optimale du noyau spermatique *via* la formation de ponts disulfures inter- et intra- protamines (Björndahl and Kvist, 2010). Si le traitement antioxydant est trop fort, il est possible que ces événements de pontage soient diminués, fragilisant ainsi le degré de condensation du noyau spermatique et le rendant plus sensible à la décondensation. Il est donc primordial de traiter avec des doses d'antioxydants adaptées au niveau de dommages mesurés sur le noyau spermatique pour ne pas créer une situation de « stress réducteur » qui serait aussi dommageable que la situation de stress oxydant. Pour évaluer la sensibilité du noyau spermatique à la décondensation, nous avons utilisé un agent réducteur le dithiothréitol (DTT), qui réduit les ponts disulfures établis entre les protamines. Une coloration de Shorr est pratiquée afin d'observer la morphologie des spermatozoïdes et d'apprécier les noyaux spermatiques décondensés ou non (figure 68A). Les observations et les analyses statistiques ne montrent pas de différence entre les souris traitées et les non-traitées. Ceci suggère que le traitement effectué (dose et durée) n'affecte pas la compaction de l'ADN spermatique (figure 68B).

Néanmoins, nous n'avons effectué qu'une mesure indirecte du niveau de condensation nucléaire des spermatozoïdes *via* une appréciation morphologique par la coloration de Shorr. Il serait ainsi intéressant pour confirmer les résultats obtenus, d'évaluer la condensation du noyau de manière plus directe en utilisant une coloration au bleu de toluidine ou au bleu d'aniline, des colorants pénétrant plus ou moins profondément dans le noyau spermatique en fonction de son niveau de condensation (Erenpreiss et al., 2001 ; figure 2 de l'article Gharagozloo et al., 2016) ou d'évaluer ce niveau de compaction par l'approche de microscopie confocale couplée à une modélisation tridimensionnelle (Résultats I. L'organisation chromatinienne spermatique murine ; Article , tableau 1) sur les noyaux des spermatozoïdes de souris sauvages et *Gpx5*^{-/-} traitées ou non. Il existe également une approche biochimique qui consiste à mesurer le taux de « thiols libres » c'est à dire le niveau de groupements thiols portés par les cystéines des protamines comme il avait été réalisé dans les études précédentes de l'équipe (Chabory et al., 2009 ; Noblanc et al., 2012).

3. Dommages lipidique : peroxydation lipidique

Afin d'évaluer le taux de peroxydation lipidique des souris de chacun des quatre lots (WT et *Gpx5*^{-/-} (KO) traitées ou non avec le Fertilix®) nous avons mesuré, le malondialdéhyde (MDA), dérivé lipidique issu principalement de la peroxydation des lipides membranaires.

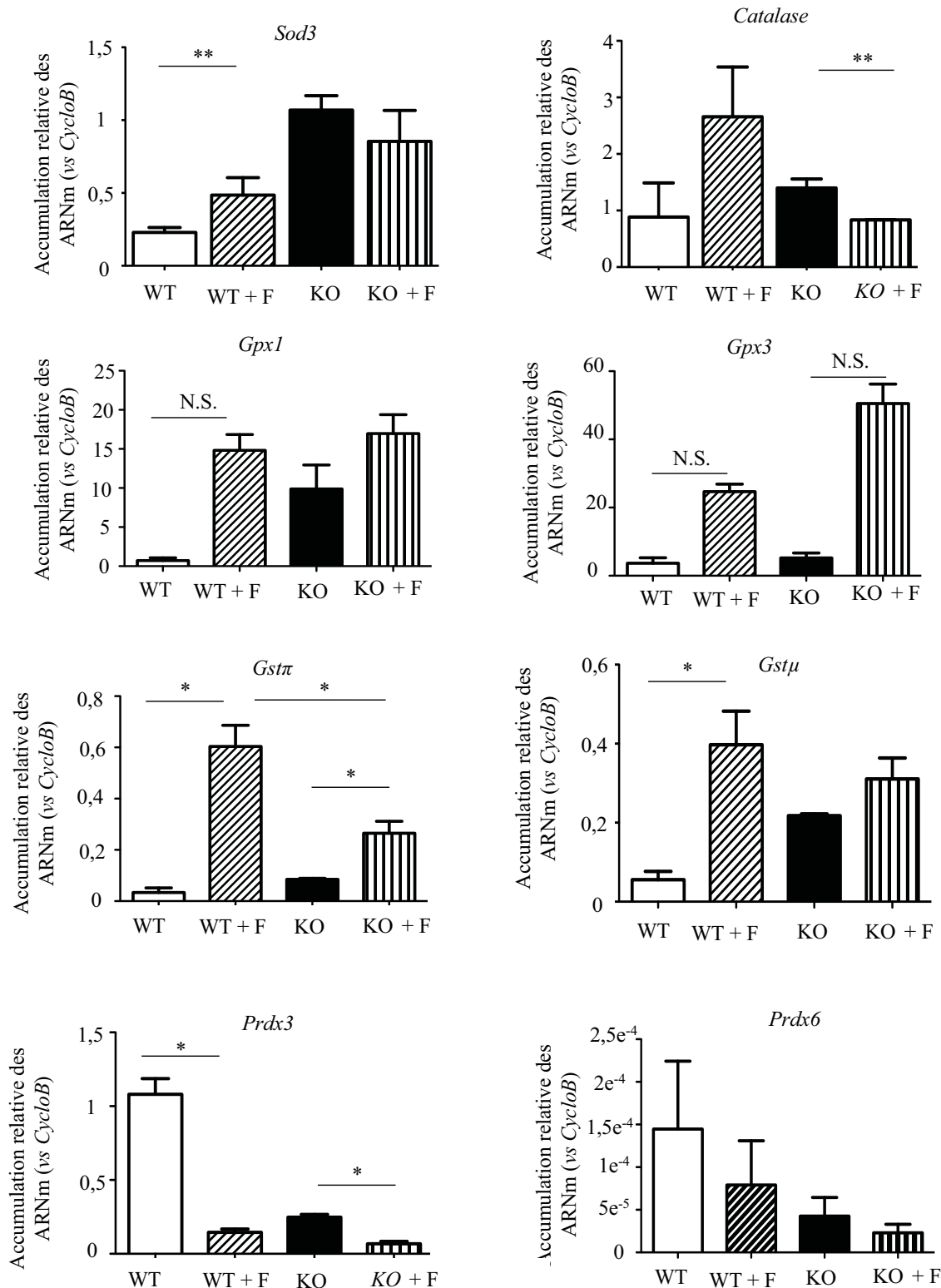


Figure 72: Expression des enzymes antioxydantes dans la tête d'épididyme.

L'accumulation relative des ARNm des différents gènes codants pour des enzymes antioxydantes a été déterminée par qRT-PCR dans la tête d'épididyme des souris de chaque catégorie. Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été effectué entre chaque catégorie : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, N.S. : Non significatif.

$n=8$ pour les souris sauvages traitées et non traitées.

$n=6$ pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®. *Cyclo B*: cyclophiline B

Outre l'épididyme, nous avons testés le foie et le plasma sanguin afin d'évaluer l'effet de la supplémentation orale en antioxydants sur la peroxydation lipidique systémique et hépatique. Les mesures de MDA réalisées au niveau de la queue d'épididyme et du foie ne montrent pas de variation significative entre les différents individus traités ou non (figure 669B, C). De façon étonnante, sur les échantillons de plasma la peroxydation lipidique est augmentée chez les souris WT traitées avec les antioxydants et chez les souris *Gpx5^{-/-}* (KO) comparées aux souris WT (figure 69A). L'augmentation du niveau de peroxydation lipidique systémique chez les souris *Gpx5^{-/-}* (KO) est probablement à rapprocher du phénotype secondaire d'obésité que nous avons observé (résultats non publiés) chez les souris *Gpx5^{-/-}* (KO) probablement lié à une expression discrète de GPx5 dans le tissu adipeux blanc péri-épididymaire (résultats non publiés). En effet, la littérature rapporte que l'obésité est associée à une augmentation de la peroxydation lipidique et notamment du MDA plasmatique (Yesilbursa et al., 2004). L'augmentation du MDA dans les plasmas des souris WT supplémentées en antioxydants est par contre intrigante et suggère que dans un contexte optimal (pas d'oxydation) la prise d'antioxydants est à éviter car elle entraîne une oxydation inattendue.

4. Expression des gènes codants pour des enzymes antioxydantes

Afin de mesurer l'impact de la supplémentation antioxydante *per os* sur l'organisme plus largement, nous avons évalué dans (le foie, le testicule et l'épididyme) le niveau d'expression d'un éventail d'enzymes antioxydantes dont celles présentées dans l'article ci-dessus, à savoir la superoxyde dismutase (ou SOD) qui transforme l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) issu de la respiration mitochondriale en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 , figure 32), la catalase qui transforme le peroxyde d'hydrogène en eau (figure 32), les glutathion-S-transférases (GST), des enzymes qui recyclent les molécules complexes peroxydées (par exemple les lipides peroxydés tel que le MDA) le plus souvent quand les tissus sont soumis à un excès de peroxyde d'hydrogène. Nous avons également évalué des enzymes de la famille des glutathiones peroxydases (GPx1 et GPx3 en particulier) et des peroxyrédoxines (PRDX 3 et 6 en particulier).

En ce qui concerne le foie et le testicule, nous n'observons aucune variation significative dans l'expression des différentes enzymes entre les quatre lots de souris (figures 70, 71) exceptée en ce qui concerne la *Gstu* dans le foie des souris WT traitées (figure 70). Dans la tête de l'épididyme comme dans la queue de l'épididyme (*cf.* article) nous observons une baisse de l'expression de la *Catalase* et de la *Prdx3* chez les souris WT et *Gpx5^{-/-}* traitées. Nous notons

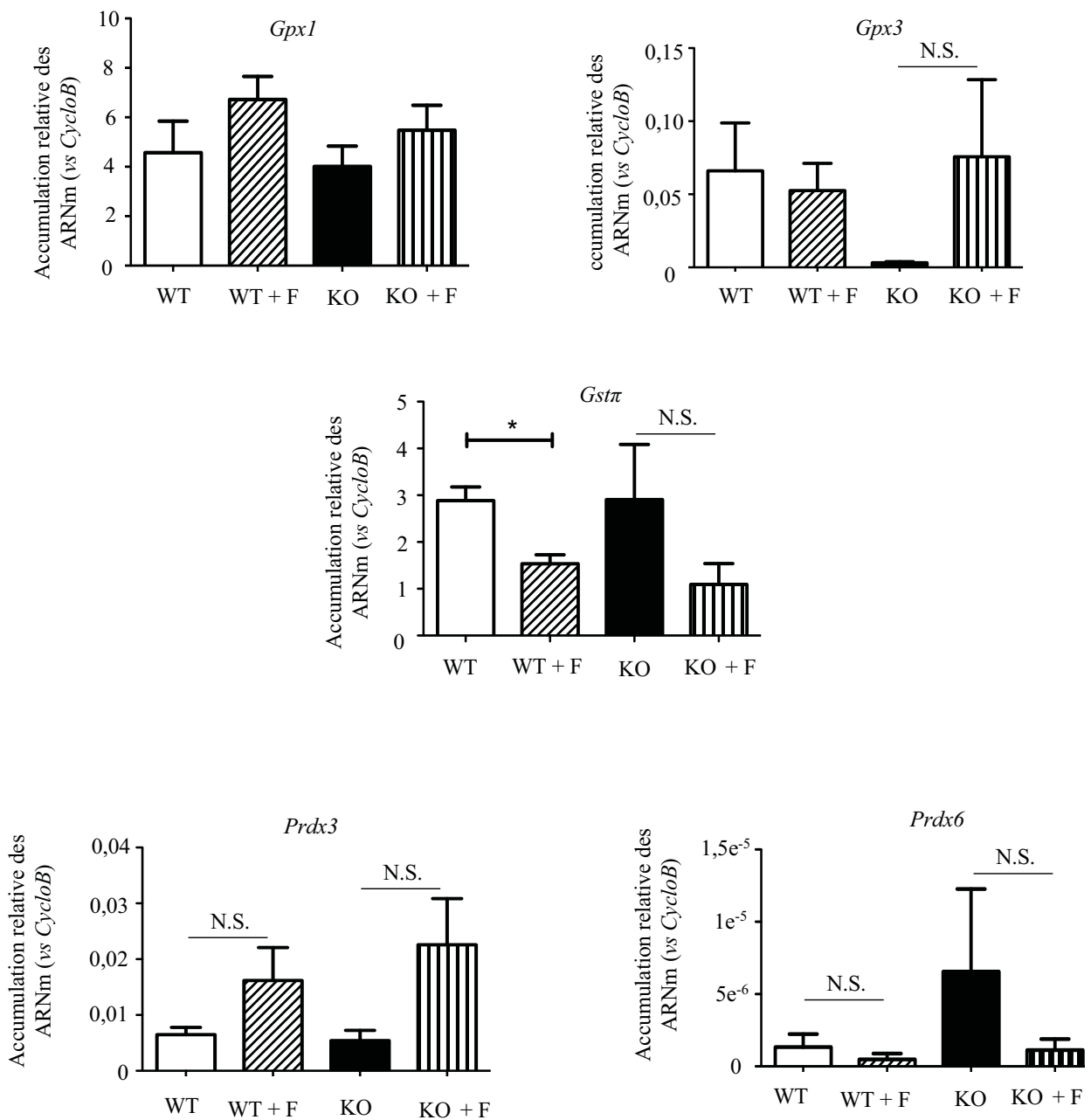


Figure 73 : Expression des enzymes antioxydantes dans la queue d'épididyme.

L'accumulation relative des ARNm des différents gènes codants pour des enzymes antioxydantes a été déterminée par qRT-PCR dans la queue d'épididyme des souris de chaque catégorie. Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été effectué entre chaque catégorie : *p<0,05, **p<0,01, N.S. : Non significatif.

n=8 pour les souris sauvages traitées et non traitées.

n=6 pour les souris KO traitées et non traitées.

+ F : traitées avec le Fertilix®. *Cyclo B*: cyclophiline B

une augmentation de l'expression de la *Sod* chez les souris WT traitées et une tendance à l'augmentation de l'expression de *Gpx 1* chez les souris WT et *Gpx5*^{-/-} traitées dans la tête d'épididyme (figure 72). Nous observons également une augmentation de la *Gstπ* chez les souris WT et *Gpx5*^{-/-} traitées (figure 72). Au niveau de la queue d'épididyme, nous notons une tendance à la baisse de l'expression de la *Prdx6* chez les souris traitées, ainsi qu'une baisse significative de la *Gstπ* (figure 73).

La baisse de l'expression d'enzymes antioxydantes majeures au niveau épидидymaire montre que le niveau de stress oxydant est diminué au sein de cet organe et est confirmé par la diminution de l'oxydation de l'ADN spermatique (*cf.* article). A titre d'exemple, PRDX3 est une enzyme senseur du peroxyde d'hydrogène localisée dans l'organite producteur majeur de ce dernier, la mitochondrie (pour revue voir : Netto and Antunes, 2016). Par ailleurs, l'expression du gène *Prdx3* est sous le contrôle du peroxyde d'hydrogène (Lee et al., 2007). Ainsi, la baisse de la concentration du peroxyde d'hydrogène au sein de la lumière de la tête de l'épididyme conduit à une baisse de l'expression de *Prdx3* dans cet organe semblant indiquer que la formulation antioxydante diminue la concentration épидидymaire de peroxyde d'hydrogène. PRDX3 est également connue comme un régulateur de la survie cellulaire/apoptose (Hampton and O'Connor, 2016). En ce qui concerne les GST, l'augmentation de leurs expressions dans la tête d'épididyme chez les individus traités suppose que certains composés de la formulation agissent sur l'expression de ces gènes (Higgins and Hayes, 2011).

L'ensemble de ces résultats suggère que les tissus essaient de réguler au mieux l'équilibre redox avec les différents acteurs antioxydants disponibles. Il serait intéressant de rechercher les composants du traitement qui influencent ces variations d'expression selon les tissus et les enzymes considérés. Le niveau des protéines codées par ces gènes est-il également modifié selon les tissus ? L'activité de ces enzymes antioxydantes est-elle bouleversée par l'apport de la formulation ?

Conclusions

L'utilisation du modèle murin invalidée pour *Gpx5*, qui présente un stress oxydant au niveau épидидymaire, nous a permis de tester dans un contexte contrôlé l'efficacité d'une supplémentation orale antioxydante, à corriger le niveau d'oxydation de l'ADN des spermatozoïdes. Nous constatons une réelle efficacité de cette supplémentation sur l'oxydation de l'ADN spermatique (diminution) et le contexte enzymatique antioxydant épидидymaire par

une baisse de l'expression d'enzymes antioxydantes montrant que le niveau de stress oxydant est diminué au sein de cet organe. L'absence d'effets notoires au niveau systémique ou délétères pour les spermatozoïdes ou la fertilité, nous encourage à analyser l'effet de cette supplémentation orale antioxydante chez des patients présentant une infertilité et impliqués dans une procédure de PMA. Cette étude permettra d'apporter une meilleure compréhension quant à l'utilisation des suppléments antioxydants dans le cadre d'une infertilité masculine.

A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models

P. Gharagozloo^{1,*}, A. Gutiérrez-Adán², A. Champroux³, A. Noblanc³, A. Kocer³, A. Calle², S. Pérez-Cerezales², E. Pericuesta², A. Polhemus¹, A. Moazamian¹, J.R. Drevet³, and R.J. Aitken^{4,5}

¹CellOxess LLC, 15 Roszel Road, Princeton, NJ 08540, USA ²INIA, Animal Reproduction, Madrid 28040, Spain ³GRoD Lab CNRS UMR6293-INSERM U1103 Université Blaise Pascal-Clermont II, Clermont-Ferrand 63001, France ⁴Hunter Medical Research Institute, New Lambton Heights, NSW 2305, Australia ⁵The University of Newcastle, University Drive, Callaghan, NSW 2308, Australia

*Correspondence address. Tel: +1-609-818-9100; Fax: +1-609-818-9109; E-mail: parviz.gharagozloo@celloxess.com

Submitted on July 25, 2015; resubmitted on September 24, 2015; accepted on November 9, 2015

STUDY QUESTION: Does a novel antioxidant formulation designed to restore redox balance within the male reproductive tract, reduce sperm DNA damage and increase pregnancy rates in mouse models of sperm oxidative stress?

SUMMARY ANSWER: Oral administration of a novel antioxidant formulation significantly reduced sperm DNA damage in glutathione peroxidase 5 (GPX5), knockout mice and restored pregnancy rates to near-normal levels in mice subjected to scrotal heat stress.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Animal and human studies have documented the adverse effect of sperm DNA damage on fertilization rates, embryo quality, miscarriage rates and the transfer of *de novo* mutations to offspring. Semen samples of infertile men are known to be deficient in several key antioxidants relative to their fertile counterparts. Antioxidants alone or in combination have demonstrated limited efficacy against sperm oxidative stress and DNA damage in numerous human clinical trials, however these studies have not been definitive and an optimum combination has remained elusive.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: The efficacy of the antioxidant formulation was evaluated in two well-established mouse models of oxidative stress, scrotal heating and *Gpx5* knockout (KO) mice, ($n = 12$ per experimental group), by two independent laboratories. Mice were provided the antioxidant product in their drinking water for 2–8 weeks and compared with control groups for sperm DNA damage and pregnancy rates.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: In the *Gpx5* KO model, oxidative DNA damage was monitored in spermatozoa by immunocytochemical detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG). In the scrotal heat stress model, male fertility was tested by partnering with three females for 5 days. The percentage of pregnant females, number of vaginal plugs, resorptions per litter, and litter size were recorded.

MAIN RESULTS AND ROLE OF CHANCE: Using immunocytochemical detection of 8OHdG as a biomarker of DNA oxidation, analysis of control mice revealed that around 30% of the sperm population was positively stained. This level increased to about 60% in transgenic mice deficient in the antioxidant enzyme, GPX5. Our results indicate that an 8 week pretreatment of *Gpx5* KO mice with the antioxidant formulation provided complete protection of sperm DNA against oxidative damage. In mouse models of scrotal heat stress, only 35% (19/54) of female mice became pregnant resulting in 169 fetuses with 18% fetal resorption (30/169). This is in contrast to the antioxidant pretreated group where 74% (42/57) of female mice became pregnant, resulting in 427 fetuses with 9% fetal resorption (38/427). In both animal models the protection provided by the novel antioxidant was statistically significant ($P < 0.01$ for the reduction of 8OHdG in the spermatozoa of *Gpx5* KO mice and $P < 0.05$ for increase in fertility in the scrotal heat stress model).

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: It was not possible to determine the exact level of antioxidant consumption for each mouse during the treatment period.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: Recent clinical studies confirm moderate to severe sperm DNA damage in about 60% of all men visiting IVF centers and in about 80% of men diagnosed with idiopathic male infertility. Our results, if confirmed in humans, will impact clinical fertility practice because they support the concept of using an efficacious antioxidant supplementation as a preconception therapy, in order to optimize fertilization rates, help to maintain a healthy pregnancy and limit the mutational load carried by children.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): The study was funded by the Clermont Université and the University of Madrid. P.G. is the Managing Director of CellOxess LLC, which has a commercial interest in the detection and resolution of oxidative stress. A.M. and A.P. are employees of CellOxess, LLC. J.R.D., A.G.-A. and R.J.A. are honorary members of the CellOxess advisory board.

Keywords: sperm DNA damage / reactive oxygen species / oxidative stress / antioxidants / infertility / glutathione peroxidase 5 / scrotal heat stress

Introduction

Sperm DNA damage is a significant determinant of semen quality (Aitken, 1999; Zenzes, 2000; Aitken and Krausz, 2001; Lewis and Aitken, 2005; Fernandez-Gonzalez *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2013) and yet it is not routinely diagnosed or adequately treated in couples receiving infertility treatment in the form of assisted reproductive technology (ART). Men with this condition are likely to experience subfertility or infertility, expose their female partners to a greater risk of miscarriage, and pass on *de novo* genetic and epigenetic changes to their offspring, potentially compromising the health of future generations (Aitken *et al.*, 2013). The present situation is concerning, as clinical studies confirm moderate to severe sperm DNA damage in about 60% of all men visiting IVF centers (Cohen-Bacrie *et al.*, 2009) and in about 80% of men diagnosed with idiopathic male infertility (Simon *et al.*, 2013).

The induction of DNA damage in spermatozoa could theoretically involve enzymatic cleavage of the DNA backbone as a result of enhanced endonuclease activity or fragmentation of the DNA as a consequence of free radical attack. For reasons that have been carefully set out in previous publications, most DNA damage in the male germ line appears to be oxidatively induced (Koppers *et al.*, 2011; Aitken *et al.*, 2013, 2015). Oxidative damage to all cell types, including gametes, results primarily from chemical insult via a surplus of short-lived, highly reactive metabolites designated by their chemically reactive heteroatom, such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) (Halliwell and Whiteman, 2004). These metabolites consist of free radicals such as the hydroxyl radical (OH[•]), ionic species such as superoxide anion (O₂^{•-}) or peroxynitrite (ONOO⁻) and neutral but reactive molecules such as hydrogen peroxide (H₂O₂). Given the molecular diversity of such reactive species, the type of damage sustained by DNA is equally diverse. The most recognized types of sperm oxidative DNA damage are: (i) single and double DNA strand breaks, (ii) abasic site generation, (iii) inter- or intra-strand DNA cross linkage, (iv) DNA-protein cross-linkage and (v) chemical modification of bases including DNA base adduct formation.

Sperm oxidative stress not only disrupts the integrity of sperm DNA but also limits the fertilizing potential of these cells through collateral damage to proteins and lipids in the sperm plasma membrane (Aitken *et al.*, 1989). Spermatozoa are particularly vulnerable to oxidative attack due to a relative deficiency in the availability of intracellular antioxidant enzymes consequent to their lack of cytoplasm. Moreover, unlike many other cell types, sperm lipid membranes contain a particularly high percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as

docosahexaenoic acid (Jones *et al.*, 1978, 1979; Koppers *et al.*, 2010). These highly unsaturated fatty acids give the plasma membrane the fluidity it needs to participate in the membrane fusion events associated with fertilization. However, PUFAs oxidize readily to generate malondialdehyde and a variety of highly reactive α , β -unsaturated hydroxyalkenals, such as 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexanal (Pizzimenti *et al.*, 2013; Spickett, 2013; Moazamian *et al.*, 2015). Once generated, these reactive aldehydes may attack other nearby PUFAs, thus propagating a chain reaction that eventually disrupts membrane fluidity. At high concentrations, these aldehydes also react with amino acids and nucleic acids to form stable protein and DNA adducts, which further disrupt sperm function (Luczaj and Skrzydlewska, 2003; Aitken *et al.*, 2012).

Since many observational studies now confirm decreased levels of seminal antioxidant(s) and/or increased levels of oxidants in infertile versus fertile men (Aitken and Clarkson, 1987; Alvarez *et al.*, 1987; Lewis *et al.*, 1995, 1997; Fraga *et al.*, 1996; Aitken, 1999; Balercia *et al.*, 2000), it should come as no surprise that dietary supplementation with antioxidants has gained much attention in recent years (Lanzafame *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2010; Gharagozloo and Aitken, 2011; Showell *et al.*, 2011, 2014). In this paper, we report the detailed scientific rationale behind the design of a novel antioxidant formulation (Fertilix[®]) and present preliminary *in vivo* data as evidence of its efficacy in reducing sperm oxidative DNA damage and improving pregnancy rates in mouse models of oxidative stress. A detailed explanation of the composition of Fertilix[®] is provided (see Supplementary Data) but the fundamental constituents are: carnitines, folic acid, lycopene, selenium, vitamin C, full-spectrum vitamin E and zinc.

In this study, the efficacy of Fertilix[®] has been examined in two animal models of oxidative stress within the male reproductive tract. The first model employed in this study was the *Gpx5* knockout (KO) (*Gpx5*^{-/-}) mouse (Aitken, 2009; Chabory *et al.*, 2009). In these mice, the H₂O₂-scavenging activity of GPX5 in the epididymis has been nullified, leading to increased exposure of mature spermatozoa to H₂O₂-mediated oxidative stress during epididymal transit and storage (Chabory *et al.*, 2009). Because of the targeted reduction of antioxidant capacity in the reproductive tracts of these mice, sperm nuclei exhibit high levels of oxidative DNA damage as revealed by accumulation of the oxidized guanine residue 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG), a well-known biomarker of oxidative DNA damage (Noblanc *et al.*, 2013). This model was therefore employed to determine the ability of oral antioxidant supplementation to correct oxidative stress within the epididymal lumen. However, in this model, fertilization and pregnancy rates are not statistically different from controls even though the incidence of miscarriages

and developmental defects is elevated (Chabory et al., 2009). Thus in order to study impacts of antioxidant supplementation on fertility, a second model was employed.

The second system used in this study was the scrotal heat stress model, in which male mice are subjected to transient testicular thermal stress, resulting in diminished sperm quality, DNA damage, germ cell apoptosis, and impaired fertility (Jannes et al., 1998; Zhu et al., 2004; Banks et al., 2005; Pérez-Crespo et al., 2008; Paul et al., 2009). These effects are accompanied by changes in testicular architecture as well as reduced populations of spermatids and mature spermatozoa in the seminiferous tubules (Hourcade et al., 2010). Sperm DNA damage is evident as early as 6 h following stress induction and persists for up to 28 days, while female mice mated with heat stressed males exhibit significantly lower pregnancy and higher embryo resorption rates compared with those mated with unstressed controls (Pérez-Crespo et al., 2008). In the present study, this model was used to assess the capacity of Fertilix[®] to protect not only sperm cells but also the testicular architecture from oxidative damage following a transient, acute heat stress. Thus, both of these well-established models were utilized to provide complementary information demonstrating the efficacy of Fertilix[®] against a wide range of biological end-points.

Materials and Methods

Animals

The present study was approved by the Regional Ethic Committee for Animal Experimentation (CEMEA-Auvergne; Authorization CE2-04) and the Animal Care and Ethics Committee (Informe CEEA 2014/025) of the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid, Spain) and adhered to the current legislation on animal experimentation in France and Spain according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals as adopted by the Society for Study of Reproduction. The *Gpx5*^{-/-} mice were derived as described originally from the C57BL/6 genetic line (Chabory et al., 2009) while scrotal heat stress was realized as previously described (Pérez-Crespo et al., 2008) on CD-1 mice (Harlan, Oxford, UK). The doses of the ingredients used for *in vivo* experiments correspond to the upper limit of the dose range given in Table I.

Gpx5 KO

Sexually mature *Gpx5*^{-/-} mice and wild type (WT) controls were administered Fertilix[®], dissolved in water, which was available *ad libitum* for a period of 2 months. Control *Gpx5*^{-/-} and wild type mice were provided unsupplemented water during the 2 month period. Appropriate dosage, corresponding to the highest human dose of Fertilix[®] recommended by the manufacturer (CellOxess, Princeton, NJ, USA), was calculated as previously described (Reagan-Shaw et al., 2007). After 2 months of treatment, supplemented *Gpx5*^{-/-} and WT mice and unsupplemented *Gpx5*^{-/-} and WT controls were sacrificed by CO₂ inhalation and cervical dislocation.

Scrotal heat stress model

After 1 week of Fertilix[®] oral administration in drinking water (or solely water for the control group), adult male CD-1 mice (8–12 weeks old) were anesthetized using xylazine-ketamine (0.1 ml/10 g body weight, *i.p.* injection) and were subjected to transient scrotal heat stress as previously described (Pérez-Crespo et al., 2008). In short, males were suspended on a polystyrene raft such that their testes, which were prevented from retracting to an abdominal position, were immersed in water at 42°C for 30 min. Control mice were immersed in water at standard testicular temperature (33°C) for 30 min. Epididymal mature sperm samples and testes were

Table I Primers used to monitor the accumulation of H₂O₂-recycling enzymes in caudal epididymal extracts of wild type and *Gpx5*^{-/-} mice via quantitative RT-PCR.

Gene transcript	5'–3' primer sequences	Amplicon size (bp)
<i>Catalase</i>	Fw – GCAGATACCTGTGAACTGTC Rv – GTAGAATGTCCGCACCTGAG	229
<i>Gst</i> μ	Fw – GAAGTTCAAGCTGGGCCTGG Rv – GCATGATGAGCTGCATGCCG	194
<i>Sod3</i>	Fw – GCTCTCAGAGAACCCCTCT Rv – GTGCTATGGGGACAGGAAGA	170
<i>Cyclophilin B</i>	Fw – GGAGATGGCACAGGAGGAA Rv – GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	76

Gpx5^{-/-}: glutathione peroxidase 5^{-/-}; *Sod3*: superoxide dismutase; *Gst* μ: glutathione S transferase μ.

obtained from at least 8 animals per treatment and 8 controls at two time points, 6 h and 15 days post heat stress, for analysis of the spermatozoa and histological examination of the testes. Scrotal heat stress and control males were each mated with 3 superovulated virgin female CD-1 mice at 7 days and 14 days post heat stress, a timeframe that corresponded to the period where maximum testicular and sperm damage were recorded (present work and Pérez-Crespo et al., 2008). Females were caged overnight with a single male, and the presence of a vaginal plug was considered indicative of successful mating. Females were sacrificed by cervical dislocation on Day 14 of gestation, and pregnancy rate, as well as fetal number and resorption rate were determined.

Sperm preparation

Epididymides were removed, freed of connective tissues and fat, and were further divided into caput, corpus and caudal regions. Caudal tissues were transferred to a small glass dish containing 1 ml of M2 medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and punctured repeatedly with a 26-gauge needle to recover the spermatozoa. After 5 min incubation, to allow sperm cell dispersion, the suspensions were centrifuged at 500 × g for 5 min and pellets were resuspended into 200 μl of M2. Sperm counts were determined using a Malassez hemocytometer. Sperm motility was determined immediately after collection via computer-aided semen analysis (CASA) during which sperm tracks (300 frames) were captured for each sample using a CEROS sperm analysis system (Hamilton Thorne, Lisieux, France; software version 12).

Sperm DNA integrity

DNA compaction was studied using the modified protocol of Conrad et al. (2005) for toluidine blue (TB) staining, whereby spermatozoa were stained with 1% TB in McIlvaine's buffer (200 mM Na₂HPO₄ and 100 mM citric acid, pH 3.5) for 17 min at room temperature. Slides were dehydrated in ethanol and mounted with Cytoseal[™]60 medium (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Three smears per sample were deposited on glass plates and at least 300 spermatozoa per smear were counted (duplicate slides for each animal). Assessment of sperm DNA fragmentation was carried out using the staining protocol of the Halomax[™] kit (Chromacell, Madrid, Spain), a modified sperm chromatin dispersion assay (Fernández et al., 2003). Four smears per sample were deposited on glass plates and at least 300 spermatozoa per smear were counted (duplicate slides for each animal). Detection of 8OHdG was carried out on spermatozoa as described

previously (Chabory *et al.*, 2009; Noblanc *et al.*, 2013). Cauda spermatozoa were collected as described above and resuspended in a decondensing buffer (2 mM dithiothreitol and 0.5% triton X-100 in 1 × phosphate-buffered saline (PBS)) and incubated for 30 min at room temperature. After centrifugation at 500 × g for 5 min at room temperature, spermatozoa were resuspended in 1 ml 1 × PBS, counted, and deposited onto a glass plate at a density of 30 000 cells per plate. Incubations with the primary antibody (N45.1; Gentaur, Euro-medex) were conducted overnight at 4°C. After two washes in 1 × PBS (5 min each) the secondary antibody was applied for 30 min at room temperature [dilution 1/1000]. Antibody binding was detected using the Vectastain R ABC kit incorporating peroxidase labeled Immunoglobulin G (Vector Laboratories, Abcys, Paris, France). Signal amplification was obtained by the use of the Vector Nova Red substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Abcys, Paris, France). At least 300 spermatozoa *per slide* were counted (duplicate slides for each animal).

Quantitative RT-PCR

Total RNAs were isolated with the NucleoSpin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel, France) and were reverse transcribed by moloney murine leukemia virus Reverse Transcriptase (Promega Corp., France) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR assays were performed using a RealPlex thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). During this procedure 2 µl of diluted cDNA template (1/20) were amplified using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec, France) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences are given in Table I. To ensure no genomic DNA contamination, primers were designed targeting distinct exons so that genomic DNA was unlikely to be amplified. A standard curve of amplification efficiency for each set of primers was generated via serial dilution of plasmids containing DNA of targeted genes. Melting curve analysis was carried out to confirm the specificity of primers. For quantification of transcripts, the relative method was used to calculate mRNA levels relative to the *Cyclophilin or/and 36B4* standard(s); chosen because they exhibited stable expression between the tissues and genotypes.

Microscopic observations

Observations and counts of TB staining and DNA fragmentation assays were made with an Axioskop transmitted light microscope (Carl Zeiss, Germany) at 400 × magnification. Spermatozoa positive for 8OHdG were counted by Axioplan2 imaging (Carl Zeiss, Germany) in transmitted light at 630 × magnification. Observations of fluorescent probes were made by Axioplan2 imaging (Carl Zeiss, Germany) at the following excitation and emission wavelengths: Alexa 488, BP 475/40 and BP 530/50; Hoechst 33342, BP 365/12 and LP 397, respectively (magnification: × 1000).

Histology

Scrotal heat stressed male mice and control mice were sacrificed by cervical dislocation, and the testes were fixed in modified Davidson fluid for 48 h (Latendresse *et al.*, 2002). The testes were then rinsed with PBS and stored in 70% ethanol until the time of analysis. Testes were embedded in paraffin using routine histologic protocols for subsequent light microscopic evaluation. Serial 10 µm sections were cut from the paraffin blocks and selected for staining. All sections were stained with hematoxylin/eosin. Two investigators blinded to the groups interpreted the structural changes. At least eight animals per group were analyzed.

Statistical analyses

Kruskal–Wallis and Mann–Whitney nonparametric tests were performed with GraphPad Prism 5.02 software (GraphPad, CA, USA) to determine the significance of differences between samples. Chi-squared test was used to compare pregnancies and fetuses obtained in the treatment versus

control groups and z test was used to compare pregnancy rates (Microsoft Excel, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). *P*-values of ≤0.05 were regarded as significant.

Results

Sperm parameters

Caudal epididymal spermatozoa from *Gpx5*^{-/-} mice exhibited similar counts and motility to WT spermatozoa as previously reported (Chabory *et al.*, 2009). Fertilix[®] treatment did not significantly alter the total sperm motility of WT or *Gpx5*^{-/-} samples as measured by CASA (Fig. 1A). However, caudal sperm counts were significantly elevated in *Gpx5*^{-/-} animals supplemented with Fertilix[®] while the supplementation had no effect on caudal counts in WT animals (Fig. 1B).

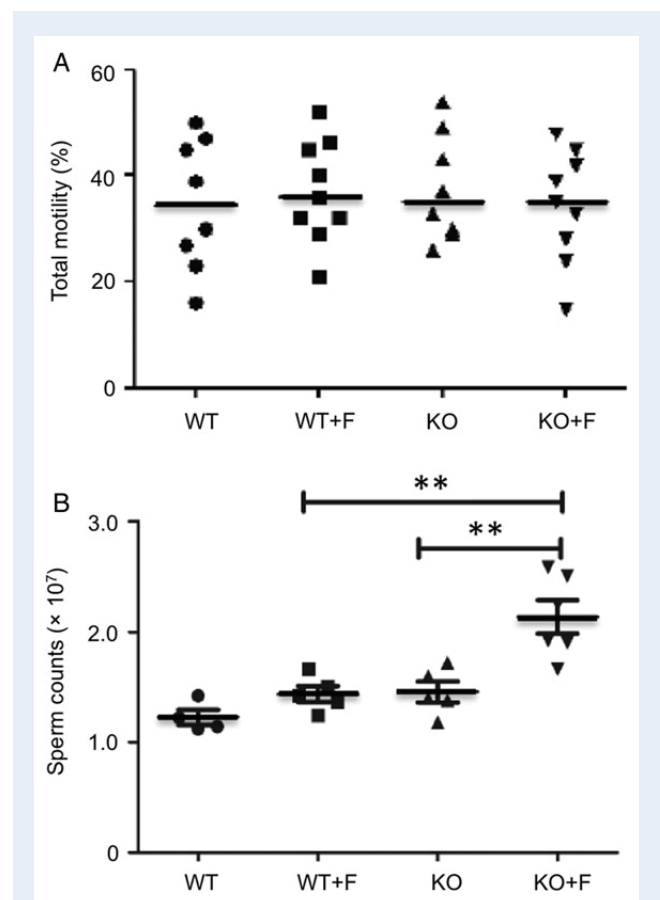


Figure 1 Evaluation of Fertilix[®] impact on mouse cauda sperm motility and counts. **(A)** The effect of Fertilix[®] treatment on total sperm motility as estimated by computer-aided semen analysis in wild-type male mice (WT), wild-type male mice supplemented with Fertilix[®] (WT + F), *Gpx5*^{-/-}: glutathione peroxidase 5 (*Gpx5*^{-/-} male mice (KO) and *Gpx5*^{-/-} male mice supplemented with Fertilix[®] (KO + F). **(B)** The effect of Fertilix[®] treatment on caudal sperm counts given in total number of cells retrieved respectively, in wild-type male mice (WT), wild-type male mice supplemented with Fertilix[®] (WT + F), *Gpx5*^{-/-} male mice (KO) and *Gpx5*^{-/-} male mice supplemented with Fertilix[®] (KO + F). Bars indicate mean values while error bars indicate SEM; **P* ≤ 0.05; ***P* < 0.01 (Mann–Whitney statistical test).

Sperm DNA fragmentation and nuclear compaction

A sperm chromatin dispersion assay was used to estimate the level of sperm DNA fragmentation in each group. Fertilix[®] supplementation did not significantly change the level of DNA fragmentation recorded either in WT and KO samples (Fig. 2A). However, *Gpx5*^{-/-} caudal sperm samples did show significantly more nuclear fragmentation than WT caudal spermatozoa in line with previous findings (Chabory et al., 2009). In addition, TB staining was used to evaluate the level of caudal sperm nuclear compaction in the various groups of mice. No significant differences were observed in the percentage of TB positive spermatozoa, suggesting that nuclear compaction was unaltered in these *Gpx5*^{-/-} mice (Fig. 2B).

8OHdG adduct formation

The prevalence of oxidative attack on DNA was directly measured in caudal spermatozoa through the formation of 8OHdG residues, a well-

established biomarker of DNA oxidation. Fertilix[®] supplementation significantly reduced 8OHdG formation to control levels (Fig. 3). Interestingly, Fertilix[®] treatment of WT animals did not diminish the percentage of caudal spermatozoa positive for 8OHdG, which remained around 30% (Fig. 3).

Impact of Fertilix[®] on the antioxidant status of the cauda epididymis

To investigate whether Fertilix[®] supplementation could protect the mouse epididymis against oxidative stress we monitored using real-time PCR, the accumulation of transcripts of primary antioxidant enzymes in the cauda epididymis, namely epididymal extracellular superoxide dismutase (eSOD3) and peroxide-processing enzymes including catalase and glutathione S transferase μ (GST μ) (Chabory et al., 2009; Noblanc et al., 2012). In Fig. 4, we confirm our previous studies by showing that transcripts for major (catalase) and accessory (GST μ) H₂O₂-recycling enzymes, are increased in *Gpx5*^{-/-} caudal epididymal extracts when compared with WT, while the transcript for the superoxide metabolizing enzyme (SOD3) is not significantly changed. By contrast, Fertilix[®] treatment reduced the accumulation of the antioxidant transcripts for catalase and GST μ , in both WT and *Gpx5*^{-/-} mice (Fig. 4).

Scrotal heat stress model

Representative histological testis sections of control mice or mice supplemented with Fertilix[®] at two time points following scrotal heat stress are shown in Fig. 5. Consistent with previous findings (Hourcade et al., 2010), scrotal heat stress induced a loss of seminiferous tubule organization as well as abnormal tubules, which was especially visible 15 days post-stress (Fig. 5A and D). Conversely, testicular sections of Fertilix[®]-supplemented mice showed no signs of major abnormality (Fig. 5C and E) at the same time points compared with unstressed controls. These observations were quantified on large numbers of tubules representing all stages of spermatogenesis from several animals, as described in Table II. In control animals,

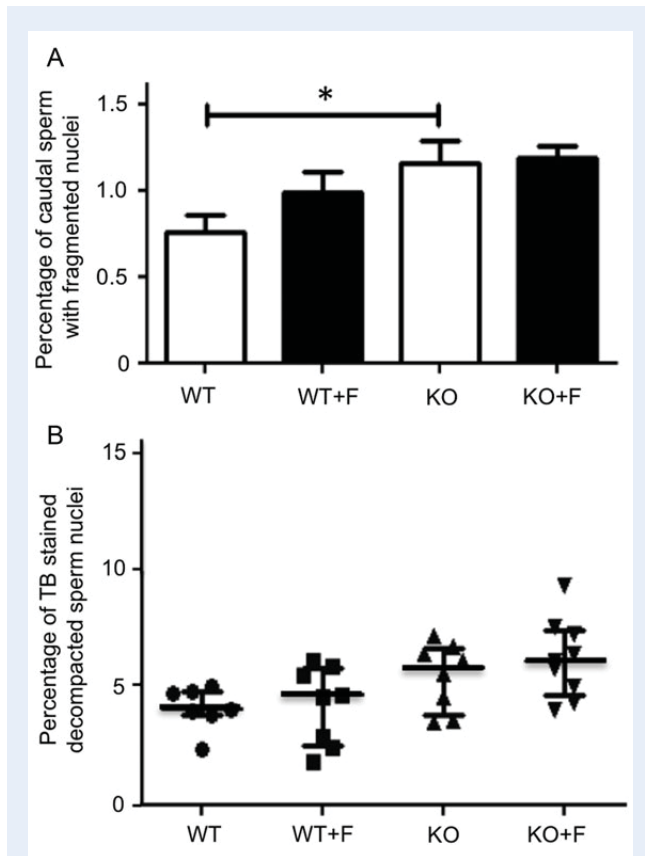


Figure 2 Evaluation of the impact of Fertilix[®] on caudal sperm DNA fragmentation and cauda sperm nuclear compaction in mice. (A) The effect of Fertilix[®] on the percentage of spermatozoa having a fragmented nucleus as revealed by the Halomax[™] assay, in WT, WT+F, KO and KO+F mice. Errors bars indicate SEM; * $P \leq 0.05$. (B) The effect of Fertilix[®] on the percentage of spermatozoa bearing a decondensed nucleus as revealed by the toluidine blue assay in WT, WT+F, KO and KO+F. Bars indicate mean values while errors bars indicate SEM (Mann–Whitney statistical test).

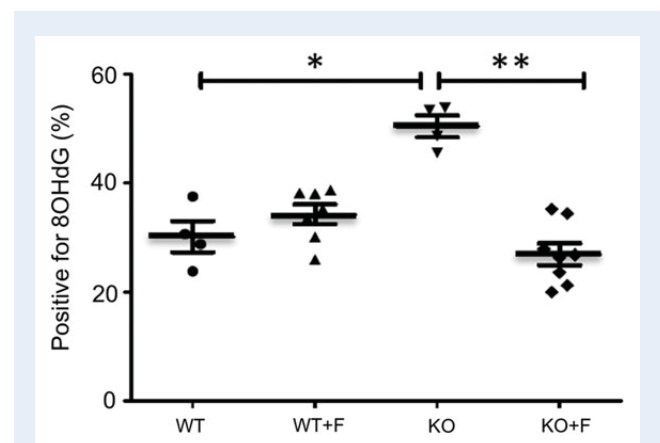


Figure 3 Evaluation of the impact of Fertilix[®] on caudal sperm DNA oxidation in mice. The effect of Fertilix[®] on the percentage of cauda spermatozoa showing high nuclear reactivity towards an 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG) antibody in WT, WT+F, KO and KO+F mice. Bars indicate mean values while errors bars indicate SEM; * $P \leq 0.05$; ** $P < 0.01$ (Mann–Whitney statistical test).

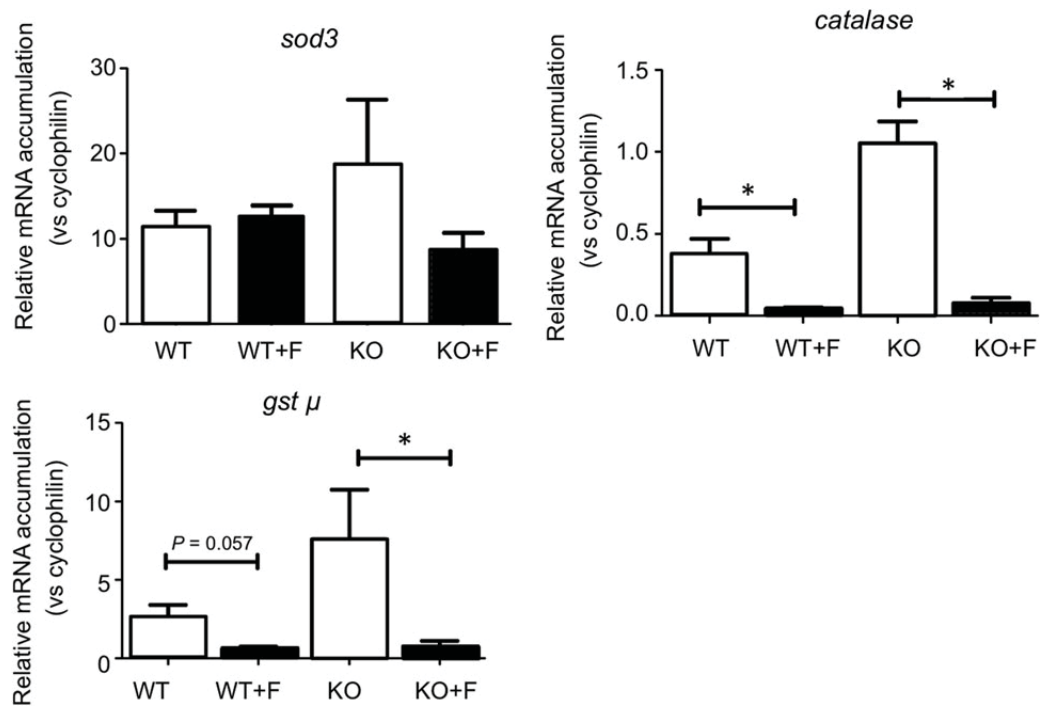


Figure 4 Quantitative RT–PCR estimations of *sod3*, *catalase*, and *gstμ* mRNA accumulation in cauda epididymal extracts from WT and KO male mice treated (F) or not treated with Fertilix[®]. For quantification of transcripts, the relative method was used to calculate mRNA levels relative to the *Cyclophilin* and *36B4* standards. Data presented for superoxide dismutase 3 (*sod3*), *catalase* and glutathione S transferase μ (*gstμ*) transcripts. Data presented as mean \pm SEM; * $P \leq 0.05$ (Mann–Whitney statistical test).

78% of observed tubules showed a normal organization while after scrotal heat stress only 30.8% of the tubules (Day 1 post-stress) and 22% of the tubules (Day 15 post-stress) were histologically normal (Table II). In Fertilix[®]-supplemented animals, the proportion of seminiferous tubules showing normal organization increased to 50.9% (Day 1 post-stress) and 64.7% (Day 15 post-stress). These data suggest that Fertilix[®] supplementation allowed the testicular tissue to better withstand acute transient scrotal heat stress ($P < 0.0001$).

Pregnancy outcomes following scrotal heat stress

In order to evaluate the impact of Fertilix[®] on the reproductive potential of spermatozoa following transient heat stress, males were each mated with three female mice. The resulting numbers of pregnant mice, live fetuses and resorption sites were monitored (Table III). Scrotal heat stressed animals ($n = 18$) successfully impregnated only 19 of 54 dams (35.2%), giving birth to 169 fetuses, while non-stressed controls were significantly more successful, impregnating 34 of 36 dams (94.4%) and giving rise to 340 fetuses. Fertilix[®]-supplemented male mice ($n = 19$) subjected to scrotal heat stress approached the fecundity of unstressed controls, achieving pregnancy in 42 of 57 females (73.7%) and giving rise to 427 fetuses (Table III; $P < 0.05$). The number of fetal resorptions were also assessed as follows; 2.9% (10/340) in normal dams versus 18% (30/169) in heat stressed animals but was significantly reduced to 9%

(38/427) in Fertilix[®]-supplemented mice. The average litter weight was unchanged at about 42 g in all 3 groups.

Discussion

The purpose of this study was to determine whether a carefully formulated antioxidant preparation, Fertilix[®], could ameliorate the consequences of oxidative stress within the male reproductive tract using two animal models: (i) the *Gpx5* KO mouse which exhibits diminished antioxidant protection in the epididymal lumen in the absence of any systemic redox change and (ii) a mild scrotal heat stress. In both situations Fertilix[®] administration was shown to have a significant protective effect. In *Gpx5*^{-/-} mice, this antioxidant formulation reduced the levels of oxidative DNA damage in the spermatozoa and reduced the epididymal need to exhibit a compensatory increase in catalase or GST μ expression (Fig. 4). The strong reduction in catalase and GST μ expression levels recorded in cauda epididymal extracts of animals supplemented with Fertilix[®] suggests that hydrogen peroxide generation is efficiently controlled in that compartment by one or more of the ingredients present in the Fertilix[®] formulation. However, it is not possible to know which ingredient(s) is (are) responsible for this effect as many of the constituents of Fertilix[®], including lycopene, vitamin E, selenium and carnitines, can reduce H₂O₂-mediated oxidative alterations (as examples see: Salem et al., 2012; Salama et al., 2015). The increase in sperm counts recorded only in *Gpx5*^{-/-} mice treated with Fertilix[®] (Fig. 1) was

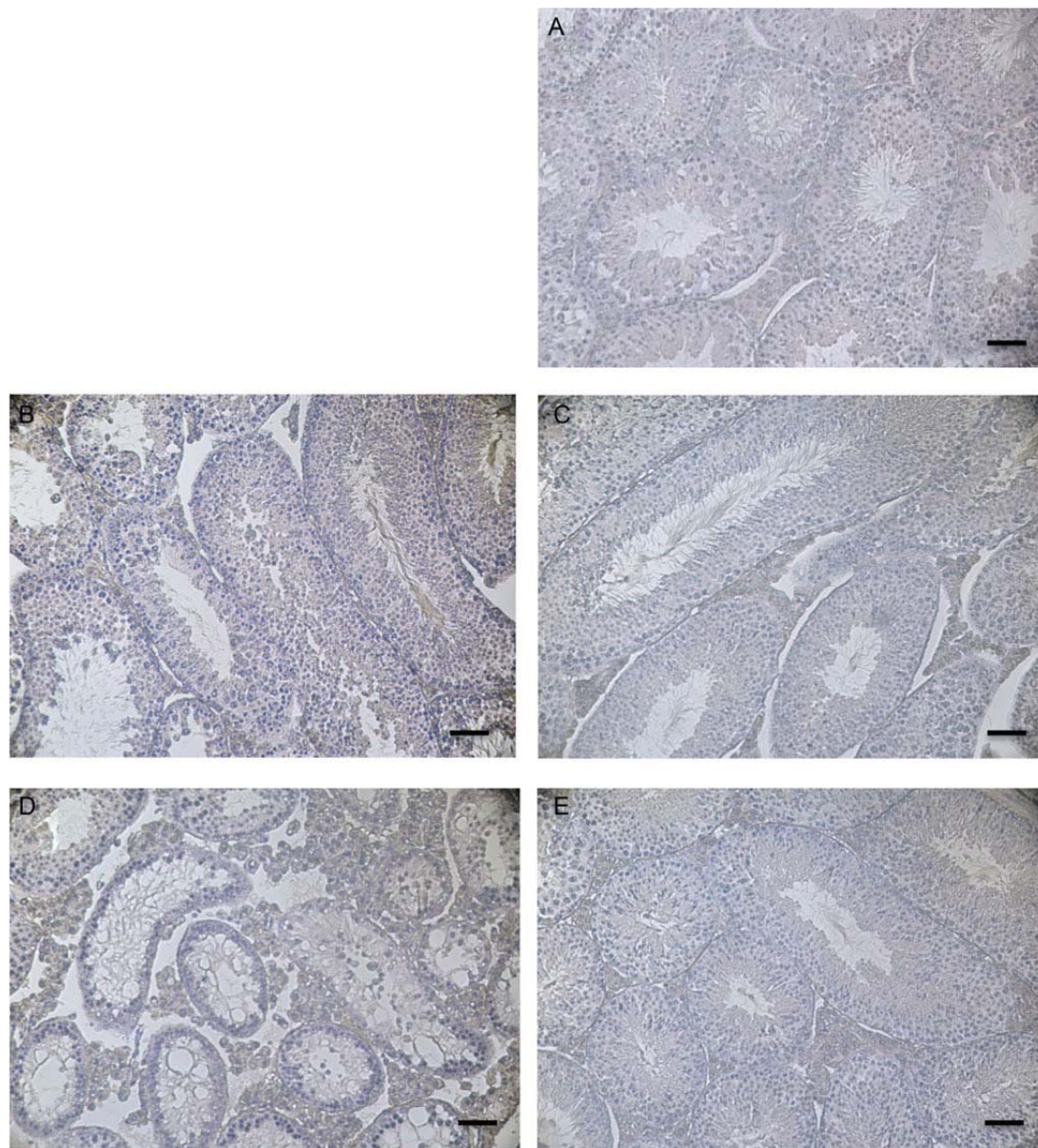


Figure 5 Evaluation of the impact of Fertilix[®] on testicular histology in the scrotal heat stress mouse model. Representative photographs showing sections of seminiferous tubules stained with hematoxylin/eosin in control mice (A), unsupplemented mice at 1 day (B) and 15 days (D) post scrotal heat stress, and mice supplemented with Fertilix[®] at 1 day (C) and 15 days (E) post scrotal heat stress. Scale bar = 50 μm.

unexpected and difficult to explain, given that the effects of *Gpx5* depletion are confined entirely to the epididymis. One hypothesis may be that the antioxidant treatment associated with the epididymal activities that are switched-on in this KO model (Chabory et al., 2009; Noblanc et al., 2012) to compensate for the lack of GPX5, may act synergistically with the antioxidants in Fertilix[®] to protect spermatozoa transiting the epididymis from elimination by quality control processes which we have previously shown to be operative in this organ (Jrad-Lamine et al., 2011), thereby increasing caudal sperm counts. In the scrotal heat stress model, Fertilix[®] exhibited a capacity to protect spermatogenesis from the adverse effects of increased temperature (Fig. 5; Table II) as clearly

indicated by the absence of abnormal spermatogenic tubules at Day 15 and the significant increase in overall fertility (Table III). This ability of antioxidants to protect the seminiferous tubules from structural damage is impressive and clearly indicates that the constituents of Fertilix[®] are able to gain access to the germinal epithelium. Spermatogenesis is a temperature-dependent process, and increases in scrotal temperature are known to induce DNA damage and a complex stress response, including induction of genes associated with oxidative stress and hypoxia resulting in germ cell death (Paul et al., 2009). The significant rise in both pregnancy rates and reduction of fetal resorptions in scrotal heat stress model provide definitive evidence in support of the prophylactic use of oral

antioxidant administration in ameliorating oxidative stress in the male germ line.

While clinical studies with a wide variety of different antioxidant preparations have been generally encouraging (Greco *et al.*, 2005; Tremellen *et al.*, 2007; Tunc *et al.*, 2009; Gharagozloo and Aitken, 2011; Showell *et al.*, 2011, 2014), most of these investigations have been flawed because they did not select the patients on the basis of oxidative stress but instead either randomly selected patients for such treatment or employed indirect markers of oxidative damage including poor sperm motility or DNA fragmentation (Kessopoulou *et al.*, 1995; Moslemi and Tavanbakhsh, 2011; Ménéz *et al.*, 2014). Similarly, the effectiveness of such treatment has rarely been examined in terms of the resolution of the oxidative stress but rather inferred from changes in semen quality, apoptosis or even fertility (Tremellen *et al.*, 2007; Tunc *et al.*, 2009). As a result of this lack of direct engagement with markers of oxidative stress, it has been difficult to determine the effectiveness of antioxidant therapy *in vivo* (Gharagozloo and Aitken, 2011) although the effectiveness of antioxidants such as α -tocopherol or resveratrol have been repeatedly demonstrated *in vitro* (Aitken *et al.*, 1989; Mojica-Villegas *et al.*, 2014). In this study, we have utilized animal models where the impacts on male reproductive function are definitively oxidative and have demonstrated effective reversal of the oxidative stress phenotype using an antioxidant preparation. Clearly, these

data suggest that the detailed formulation of Fertilix[®] (see Supplementary Data) is such that the constituents are bioavailable and bioactive *in vivo* in both the testis and the epididymis. These promising data now open the way for clinical trials with this antioxidant to determine whether this antioxidant formulation is able to reverse the oxidative stress encountered in the human male population.

Oxidative stress in the male reproductive tract originates from various pathophysiological stressors, such as age, infection or exposure to environmental toxicants, as well as unhealthy attributes of the modern lifestyle including smoking and obesity (Aitken *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2014). Of particular interest from the perspective of ART, is the observation that most DNA damage in the male germ line is oxidatively induced and strongly linked with adverse downstream events including increased rates of miscarriage as well as *de novo* mutations, birth defects, metabolic disease and obesity in the offspring (Aitken *et al.*, 2009; Chabory *et al.*, 2009; De Iuliis *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2014). In light of such findings, reducing oxidative stress in the germ line of males contemplating parenthood would seem advisable and would logically be deemed a matter of 'best practice' as far as ART clinics are concerned.

It is also important to stress the obvious point that antioxidant therapy will only influence pathologies that are induced by oxidative stress. Treating normal males, who are not suffering from oxidative stress, with an aggressive antioxidant preparation may even induce 'reductive stress' by suppressing redox reactions that are vital to normal physiology and inducing, rather than suppressing, DNA damage (Seifirad *et al.*, 2014). In this context, it is undeniable that male infertility, and even DNA damage, in spermatozoa may have multiple etiologies many of which do not involve a contribution from oxidative stress. For example, several studies have indicated that DNA fragmentation in spermatozoa may also involve a contribution from nucleases potentially activated in sperm chromatin during the late stages of apoptosis (Smith *et al.*, 2013b; Muratori *et al.*, 2015). At present the molecular identity of this putative nuclease or the mechanisms associated with its activation are uncertain. However the fact that Fertilix[®] did not reduce DNA fragmentation levels as measured with a Halomax[™] assay in the *Gpx5*^{-/-} model (Fig. 2) suggests there are elements of the DNA fragmentation process that are beyond the reach of antioxidants. Importantly, however, Fertilix[®] did significantly decrease the incidence of 8OHdG positive cells in these mice (Fig. 3). This activity is particularly important clinically because 8OHdG is a mutagen and the germ line has a very limited capacity to remove such adducts from the DNA prior to the initiation of embryo development (Smith *et al.*, 2013b).

Spermatozoa are unusual in that they only possess the first enzyme in the base excision repair pathway, OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) (Smith *et al.*, 2013b). As a result, when oxidative DNA damage

Table II Characterization of mouse testicular cross sections at Day 1 and Day 15 following acute transient scrotal heat stress.

Samples [#]	Tubules analyzed	Tubules with spermatogenesis	Tubules with abnormal phenotype
Control	614	479 (78.0%)	0 (0%)
SHS (Day 1)	159	49 (30.8%)	0 (0%)
SHS+Fertilix [®] (Day 1)	267	136 (50.9%) ^a	0 (0%)
SHS (Day 15)	282	62 (22.0%)	126 (44.7%) ^c
SHS+Fertilix [®] (Day 15)	312	202 (64.7%) ^b	0 (0%)

SHS, Scrotal Heat Stress.

[#]Six mice were analyzed per group.

^aFertilix significantly increased number of tubules with spermatogenesis compared with SHS controls on the day of heat stress (Chi square statistic, $P < 0.001$).

^bFertilix significantly increased number of tubules with spermatogenesis compared with SHS controls 15 days following heat stress (Chi square statistic, $P < 0.001$).

^cFertilix significantly decreased number of tubules with abnormal phenotype compared with SHS controls (Chi square statistic, $P < 0.001$).

Table III Fertility rates of mice treated and not treated with Fertilix following acute transient scrotal heat stress.

	Treated males	Mated females	Successful pregnancies	Pregnancy rate (%)	Fetus number	Fetal resorption n (%)
Control	12	36	34	94.4	340	10 (2.9)
SHS	18	54	19	35.2	169	30 (17.8)
SHS + Fertilix [®]	19	57	42*	73.7*	427*	38 (8.9)*

Mating occurred between 1 and 2 weeks after SHS.

* $P < 0.05$ for difference between SHS and SHS + Fertilix[®], Chi-square and z test.

occurs, these cells can remove the adducted base but are unable to advance the repair process further because they do not possess the next components of the pathway, APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease 1) and XRCC1 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1). In contrast, the oocytes are characterized by high levels of APE1 and XRCC1 but possess limited supplies of OGG1 (Smith et al., 2013b). Thus DNA repair involves the concerted action of both male and female gametes. If oxidative DNA damage in spermatozoa is severe then the oocyte will be presented with an abundance of abasic sites created by OGG1, which will destabilize the DNA backbone and increase the tendency for DNA fragmentation to occur. Furthermore, when this system is overwhelmed, which is frequently the case in the infertile patient population (Aitken et al., 2010), then the oocyte is presented with unresolved 8OHdG residues, which this cell has a limited capacity to address, given the relative lack of OGG1 in the female germ line. It is therefore likely that these highly mutagenic DNA lesions will persist beyond the immediate post-fertilization round of DNA repair into S-phase of the first mitotic division, increasing the risk of *de novo* mutations being created as the embryo enters the cleavage stage of development. Evidence to support the link between oxidative DNA damage in the male germ line and the mutational load carried by the progeny can be found in studies of paternal ageing which clearly reveal that advanced paternal age is associated with increased oxidative DNA damage in spermatozoa (Weir and Robaire, 2007; Smith et al., 2013a) and an increased incidence of *de novo* mutations in the offspring (Kong et al., 2012).

Conclusions

Cells utilize a selection of antioxidants to protect themselves against the deleterious effects of oxidative stress. The development of antioxidant supplements to combat oxidative stress in the male germ line *in vivo* will therefore involve the development of an optimized combination of scientifically validated antioxidants. As set out in the [Supplementary Data](#), we used a set of stringent medicinal chemistry criteria to critically examine every antioxidant ingredient, herbal or plant extract reported in the literature for some measure of improvement of sperm quality or male fertility. We found compelling evidence for only seven ingredients. The doses and nature of ingredients (synthetic versus natural) used, were also critically examined to ensure little or no short or long-term side effects. The *in vivo* experiments using mouse *Gpx5*^{-/-} and scrotal heat stress models reported in this article provide the first robust evidence that antioxidants can access the male germ line *in vivo* and effectively address the consequences of oxidative stress at both testicular and epididymal levels. We do not currently understand the etiology of oxidative DNA damage in human spermatozoa and so cannot be certain that the results obtained in this study would be replicated in a clinical situation. Nevertheless these results provide an important objective basis for actively pursuing clinical trials in human subjects exhibiting evidence of oxidative damage to their spermatozoa. Large, well-designed clinical trials are now required to validate these findings in infertile couples.

Supplementary data

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

Authors' roles

P.G. designed, developed and orchestrated the preparation of Fertilix[®] for this study and participated in the design of the experiments, the analysis of the data and the preparation of the manuscript. J.R.D., A.G.-A., A.C., A.N., A.K., A.C., S.P.-C. and E.P. designed and undertook the experimental work, contributed to the analysis and presentation of data and facilitated preparation of the manuscript. A.M. and A.P. were involved in the overall management of the project and contributed to the preparation of the manuscript. R.J.A. was involved in critically reviewing the initial draft of this publication and in redrafting the final version of the paper.

Funding

The study was funded by the University of Clermont-Ferrand and the University of Madrid.

Conflict of interest

P.G. is the Managing Director of CellOxess LLC, which has a commercial interest in the detection and resolution of oxidative stress. A.M. is an employee of CellOxess LLC, which has a commercial interest in the detection and resolution of oxidative stress. A.P. is an employee of CellOxess LLC, which has a commercial interest in the detection and resolution of oxidative stress. J.R.D., A.G.-A. and R.J.A. are honorary members of the CellOxess advisory board.

References

- Aitken RJ. The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; **115**:1–7.
- Aitken RJ. GPx5 protects the family jewels. *J Clin Invest* 2009; **119**:1849–1851.
- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; **81**:459–469.
- Aitken RJ, Krausz CG. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; **122**:497–506.
- Aitken RJ, Baker MA, Nixon B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian J Androl* 2015; **17**:633–639.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; **41**:183–197.
- Aitken RJ, De Luliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009; **32**:46–56.
- Aitken RJ, De Luliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; **25**:2415–2426.
- Aitken RJ, Whiting S, De Luliis GN, McClymont S, Mitchell LA, Baker MA. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem* 2012; **287**:33048–33060.
- Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Luliis GN. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod* 2013; **19**:475–485.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Luliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014; **16**:31–38.

- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987;**8**:338–348.
- Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clin Chem Lab Med* 2000;**41**:13–19.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PTK. Impact of mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005;**129**:505–514.
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J *et al.* Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 2009;**119**:2074–2085.
- Cohen-Bacrie P, Belloc S, Méneézo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2009;**91**:1801–1805.
- Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 2005;**25**:7637–7644.
- De Iulius GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod* 2009;**81**:517–524.
- Fernández JL, Lourdes M, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvares JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;**24**:59–66.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, de Dios Hourcade J, de Fonseca FR *et al.* Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;**78**:761–772.
- Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to DNA. *Mutat Res* 1996;**351**:199–203.
- Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;**26**:1628–1640.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;**26**:349–353.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;**142**:231–255.
- Hourcade JD, Pérez-Crespo M, Fernández-Gonzalez R, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;**8**:9.
- Jannes P, Spiessens C, Van der Auwera I, D'Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Hum Reprod* 1998;**13**:372–375.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ. Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proc R Soc Lond B* 1978;**201**:413–417.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979;**31**:531–537.
- Jrad-Lamine A, Henry-Berger J, Goubeyre P, Damon-Soubeyrand C, Lenoir A, Combaret L, Saez F, Kocer A, Tone S, Fuchs D *et al.* Deficient tryptophan catabolism along the kynurenine pathway reveals that the epididymis is in a unique tolerogenic state. *J Biol Chem* 2011;**286**:8030–8042.
- Kessopoulou E, Powers HJ, Sharma KK, Pearson MJ, Russell JM, Cooke ID, Barratt CL. A double-blind randomized placebo cross-over controlled trial using the antioxidant vitamin E to treat reactive oxygen species associated male infertility. *Fertil Steril* 1995;**64**:825–831.
- Kong A, Frigge ML, Masson G, Besenbacher S, Sulem P, Magnusson G, Gudjonsson SA, Sigurdsson A, Jonasdottir A, Jonasdottir A *et al.* Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 2012;**488**:471–475.
- Koppers AJ, Garg ML, Aitken RJ. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 2010;**48**:112–119.
- Koppers AJ, Mitchell LA, Wang P, Lin M, Aitken RJ. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem J* 2011;**436**:687–698.
- Lane M, McPherson NO, Fullston T, Spillane M, Sandeman L, Kang WX, Zander-Fox DL. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PLoS One* 2014;**9**:e100832.
- Lanzafame FM, La Vignera S, Vicari E, Calogero AE. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:638–659.
- Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid : comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol* 2002;**30**:524–533.
- Lewis SE, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 2005;**322**:33–41.
- Lewis SEM, Boyle PM, McKinney K, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995;**64**:868–870.
- Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997;**67**:142–147.
- Lewis SEM, Aitken RJ, Conner SJ, De Iulius G, Evenson DP, Henkel R, Giwercman A, Gharagozloo P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:325–337.
- Luczaj W, Skrzydlewska E. DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett* 2003;**8**:391–413.
- Ménézo Y, Evenson D, Cohen M, Dale B. Effect of antioxidants on sperm genetic damage. *Adv Exp Med Biol* 2014;**791**:173–189.
- Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, Aitken RJ. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod* 2015;**21**:502–515.
- Mojica-Villegas MA, Izquierdo-Vega JA, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M. Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron/ascorbate in mouse spermatozoa. *Nutrients* 2014;**6**:489–503.
- Moslemi MK, Tavanbakhsh S. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. *Int J Gen Med* 2011;**4**:99–104.
- Muratori M, Tamburrino L, Marchiani S, Cambi M, Olivito B, Azzari C, Forti G, Baldi E. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol Med* 2015;**21**:109–122.

- Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Alvarez JG et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med* 2013;**65**:719–723.
- Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H et al. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One* 2012;**7**:e38565.
- Paul C, Teng S, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod* 2009;**80**:913–919.
- Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev* 2008;**75**:40–47.
- Pizzimenti S, Ciamporcerio E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F et al. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol* 2013;**4**:242.
- Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2007;**22**:659–661.
- Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, El-Toukhy T. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:711–723.
- Salama AF, Kasem SM, Tousson E, Elsisy MK. Protective role of L-carnitine and vitamin E on the testis of atherosclerotic rats. *Toxicol Ind Health* 2015;**31**:467–474.
- Salem EA, Salem NA, Maarouf AM, Serefoglu EC, Hellstrom WJG. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology* 2012;**79**:1184.e1.
- Seifirad S, Ghaffari A, Amoli MM. The antioxidants dilemma: are they potentially immunosuppressants and carcinogens? *Front Physiol* 2014;**5**:245.
- Showell MG, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;**1**:CD007411.
- Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;**12**:CD007411.
- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SEM. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013;**26**:68–78.
- Smith TB, De Iulius GN, Lord T, Aitken RJ. The senescence-accelerated mouse prone 8 as a model for oxidative stress and impaired DNA repair in the male germ line. *Reproduction* 2013a;**146**:253–262.
- Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci* 2013b;**126**:1488–1497.
- Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: advances in chemistry and analysis. *Redox Biol* 2013;**1**:145–152.
- Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2007;**47**:216–221.
- Tunc O, Thompson J, Tremellen K. Improvement in sperm DNA quality using an oral antioxidant therapy. *Reprod Biomed Online* 2009;**18**:761–768.
- Weir CP, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *J Androl* 2007;**28**:229–240.
- Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014;**28**:684–703.
- Zenzes MT. Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2000;**6**:122–131.
- Zhu B, Walker SK, Oakey H, Setchell BP, Maddocks S. Effect of paternal heat stress on the development in vitro of preimplantation embryos in the mouse. *Andrologia* 2004;**36**:384–394.

*Discussion
Perspectives*

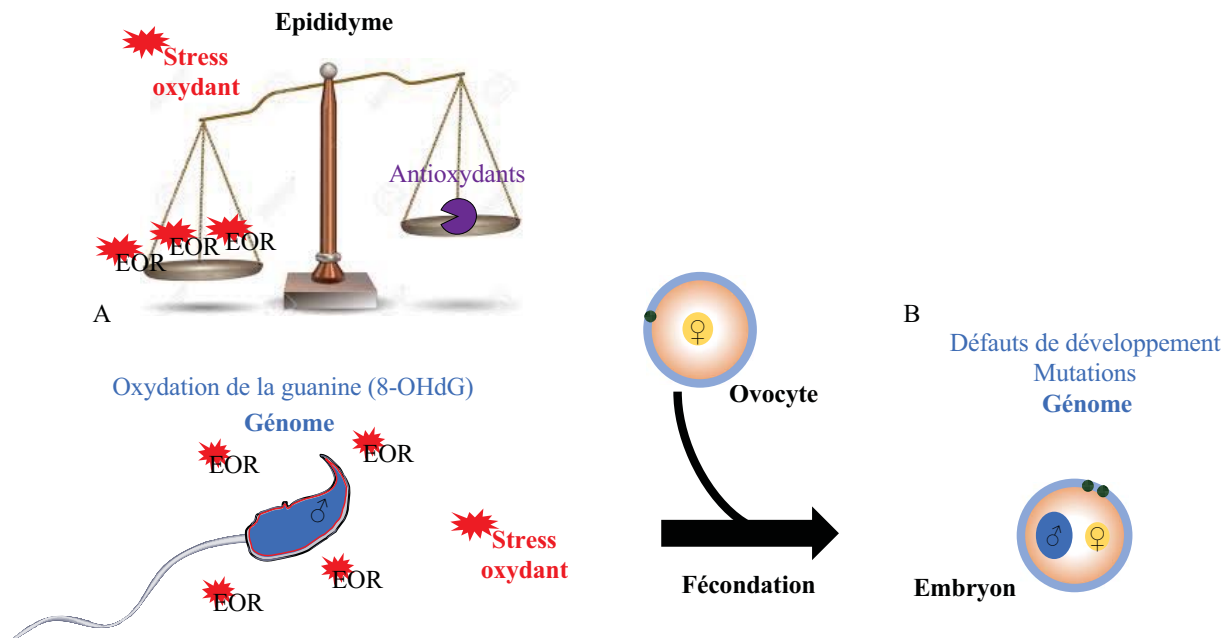


Figure 74 : Noyau spermatique oxydé et conséquences post-fécondation.

- A. Lors d'un stress oxydant épидидymaire, les espèces oxygénées réactives (EOR) induisent une oxydation de la guanine (8-OHdG) spermatique.
- B. Après la fécondation, l'ADN paternel oxydé peut conduire à des mutations de l'ADN embryonnaire.

Dans le monde, plus de 70 millions de couples souffrent d'infertilité ce qui se traduit en d'autres termes par le fait qu'un couple sur 6 en âge de procréer fait face à des difficultés à concevoir. Des facteurs masculins sont impliqués dans près de la moitié des cas d'infertilité. Les causes de l'infertilité masculine sont variées et peuvent être multifactorielles. De nombreuses recherches indiquent que les dommages à l'ADN spermatique et en particulier les dommages oxydants sont l'une des causes de l'infertilité conduisant à diminuer la qualité des spermatozoïdes et surtout l'intégrité du patrimoine génétique paternel qu'ils portent (Bisht and Dada, 2017 ; Lewis and Aitken, 2005). Les études menées par notre équipe sur des modèles murins invalidés pour des enzymes antioxydantes d'expression post-testiculaire ou portées par les spermatozoïdes (souris *Gpx5* -KO- et *Sngpx4* ; *Gpx5* -DKO-) ont permis de souligner clairement cette importance (figure 74 ; Chabory et al., 2009 ; Noblanc et al., 2013). GPx5 et SNGPx4 sont des protéines antioxydantes et leur invalidation a permis de montrer qu'un stress oxydant épидидymaire conduisait à une oxydation significative de l'ADN spermatique (présence de résidus 8-OHdG résultant des bases guanines oxydées) sans pour autant affecter les aptitudes des spermatozoïdes à se mouvoir et à féconder un ovocyte (Chabory et al., 2009 ; Conrad et al., 2005 ; Noblanc et al., 2012). Néanmoins, les croisements de souris mâles *Gpx5*^{-/-} avec des femelles sauvages fertiles entraînent l'apparition de défauts de développement dans la descendance, des avortements précoces et une augmentation de la mortalité périnatale (Chabory et al., 2009).

Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait montré que l'oxydation de l'ADN affecte des domaines discrets de la chromatine spermatique toujours en assemblage nucléosomal. Ces régions sont situées en périphérie et dans la partie basale du noyau spermatique en étroite connexion avec la matrice nucléaire (Noblanc et al., 2013). L'immunoprécipitation des séquences oxydées a permis de montrer que tous les chromosomes ne sont pas affectés de façon homogène par l'oxydation. Les petits chromosomes (17, 18 et 19) et la région péri-centromérique du chromosome Y se sont avérés particulièrement altérés par l'oxydation (figure 49 ; Kocer et al., 2015).

Dans ce contexte, les travaux qui m'ont été confiés dans le cadre de ma thèse ont consisté à :

- 1) Analyser si la position des chromosomes dans le noyau spermatique murin permettait d'expliquer leur différence d'oxydation en situation de stress oxydant épидидymaire ;

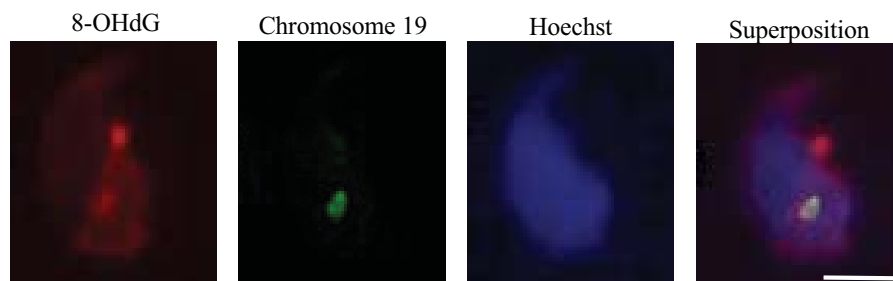


Figure 75 : Co-localisation du chromosome 19 et le 8-OHdG dans le noyau spermatique murin.

L'image confocale représentative montre l'oxydation de la guanine oxydé (8-OHdG-Alexa-555) et le chromosome 19 positionné dans la région basale dans un même noyau spermatique (bleu, Hoechst) de souris *Gpx5*^{-/-}. Les images sont capturées en utilisant un microscope confocale (en *Z-stack*). La barre blanche représente l'échelle, 5µm.

(Modifiée d'après Kocer *et al.*, 2015)

2) Mettre au point une approche d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*) spermatique murine afin de séparer les régions liées aux histones persistantes qu'elles soient ou non liées à la matrice nucléaire ;

3) Analyser le méthylome spermatique en contexte pro-oxydant ;

4) Participer à une étude préclinique dont le but a été de vérifier en modèle murin si une supplémentation orale antioxydante peut corriger ou non l'oxydation de l'ADN spermatique ?

I. L'impact du stress oxydant sur l'organisation chromatinienne spermatique.

La première partie de mon travail de thèse a ainsi consisté en l'analyse de la position tridimensionnelle (3D) des chromosomes dans le noyau spermatique murin. Chez les Mammifères, l'organisation du noyau spermatique a été décrite notamment au niveau du positionnement des chromosomes pour être non aléatoire (Foster et al., 2005 ; Zalenskaya and Zalensky, 2004). **Nous avons pu montrer que les chromosomes possèdent une position préférentielle dans le noyau spermatique murin et que cette position permettait d'expliquer la différence d'oxydation observée entre les chromosomes** (Article I, figure 1 ; Kocer et al., 2015). Nous confirmons cette observation par l'utilisation d'une approche d'immuno-FISH où nous localisons dans un même noyau spermatique le chromosome 19 et l'oxydation de l'ADN (figure 75).

Nous avons pu définir pour la première fois, les paramètres 3D (volume et superficie) des différents chromosomes dans le noyau spermatique murin. **Nous observons que la majorité des chromosomes occupent des volumes précis dans le noyau spermatique** à l'exception du chromosome 2, qui ne possède pas de localisation préférentielle et des chromosomes 3 et 12 qui peuvent être retrouvés dans deux régions discrètes du noyau spermatique. En effet, nous avons observé que le chromosome 2 occupe des volumes différents selon sa position dans le noyau spermatique murin (Article I, tableau supplémentaire 1). Cela suggère que le chromosome 2 adapte son niveau de compaction et sa position dans le noyau spermatique murin. La première hypothèse que nous avons testée a été de savoir si la position du chromosome 2 dépendait de la présence du chromosome X ou Y. Le chromosome X et le chromosome Y étant de tailles différentes cela pourrait expliquer les variations observées pour le chromosome 2 sachant que le volume du noyau spermatique ne varie pas entre un spermatozoïde Y et un spermatozoïde X (Article I, tableau 2). Une analyse de localisation de deux chromosomes simultanément ne nous a pas permis de valider cette hypothèse car le

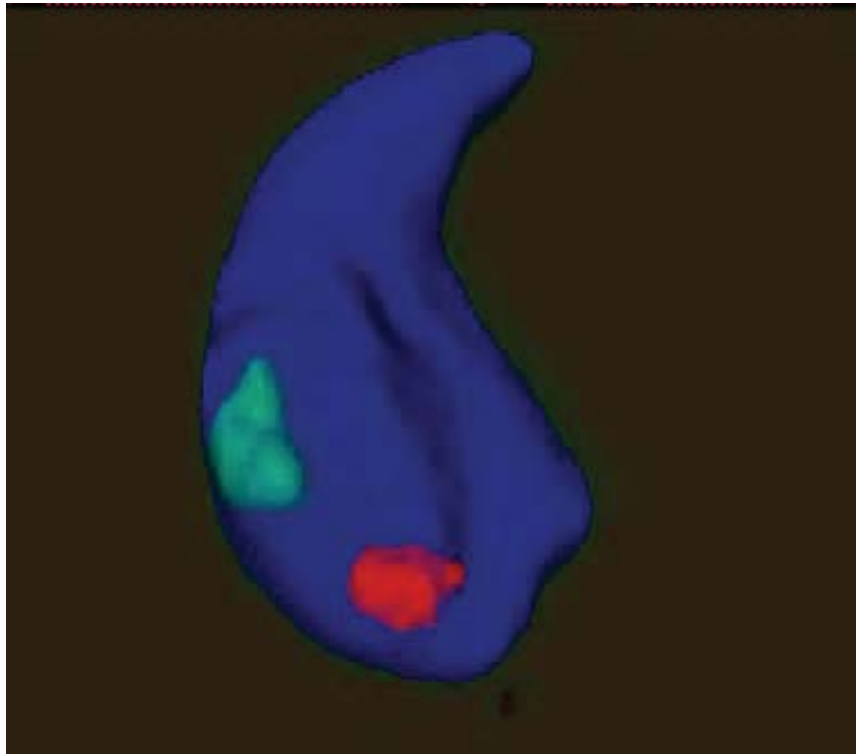


Figure 76 : Illustration de la modélisation 3D du noyau spermatique murin obtenue grâce à la collaboration avec le LIMOS.

A partir des différentes images 3D des composants de la tête spermatique, nous souhaitons créer un modèle 3D regroupant tous les chromosomes du noyau spermatique dans le noyau spermatique murin.

chromosome 2 se positionne dans les 4 régions arbitrairement définies de manière égale indépendamment du chromosome X ou Y (Article I, figure 1). Nous supposons que la position du chromosome 2 pourrait dépendre d'une combinaison de positionnement de plusieurs chromosomes. En effet, comme évoqué plus haut, d'autres chromosomes présentes des distributions non uniques. Le chromosome 3 et le chromosome 12 occupent chacun deux positions préférentielles. Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que ces trois chromosomes 2, 3 et 12 absorbent en modulant leur volume et leur position, les variations d'organisation dues à la différence de taille des chromosomes sexuels. Cependant, il nous est, actuellement, impossible d'un point de vue technique de réaliser des marquages multiples des chromosomes. Nous avons établi une collaboration avec des mathématiciens et informaticiens (LIMOS, Clermont-Ferrand), afin d'élaborer une modélisation 3D de la position des chromosomes du noyau spermatique (figure 76) qui nous permettrait de mieux appréhender les positions relatives des chromosomes. Nous souhaitons à terme établir une approche d'étude tridimensionnelle de l'organisation des chromosomes, comme établie par Bolzer en 2005, éventuellement transposable à d'autres types cellulaires (figure 76 ; Bolzer et al., 2005) ; en incluant dans notre modèle les différents composants de la chromatine (histones, protamines, matrice nucléaire) sachant qu'ils occupent chacun des positions particulières dans le noyau spermatique.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes posé la question de savoir si le stress oxydant pouvait modifier ou non la position des chromosomes dans le noyau spermatique. Récemment, une équipe a montré que les dommages à l'ADN spermatique humain comme la fragmentation conduisait à une relocalisation des centromères de différents chromosomes (Wiland et al., 2016). Nous constatons dans les modèles murins dont nous disposons, **que le stress oxydant n'affecte pas la position des chromosomes dans le noyau spermatique murin** (Article I, tableau 1). Nous pouvons potentiellement expliquer cette différence par le fait que l'altération du noyau spermatique provoquée dans nos modèles transgéniques est de moindre envergure que la fragmentation du noyau spermatique humain dont il est question dans l'étude de Wiland (Wiland et al., 2016). Par ailleurs, le noyau spermatique humain présente une compaction bien moindre comparée au noyau spermatique murin attestée par le fait que le niveau d'histones persistantes est plus élevé (Erkek et al., 2013 ; Gatewood et al., 1990 ; Hammoud et al., 2009). Ainsi, le noyau spermatique humain est sans aucun doute plus plastique conduisant à des mouvements des chromosomes les uns par rapport aux autres plus facilement que dans le noyau spermatique murin plus condensé.

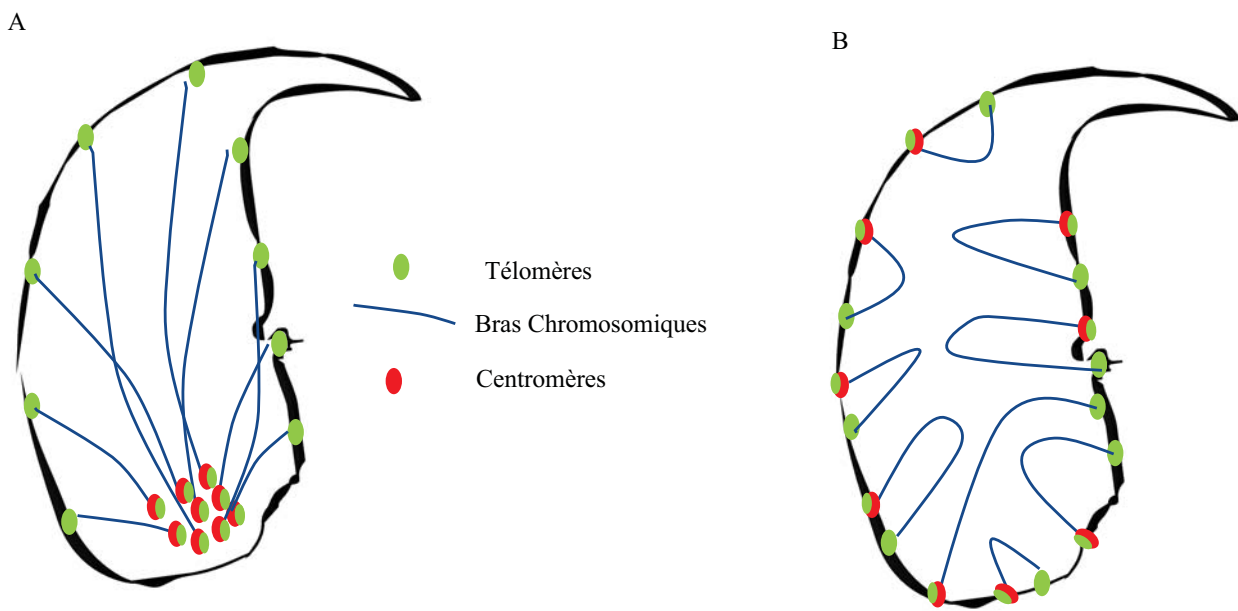


Figure 77 : Représentation schématique des modèles proposés d'organisation de la chromatine dans les noyaux de spermatozoïdes murins.

- A. Représentation schématique du modèle dans lequel il y a une rangée linéaire de chromocentres (rouge) situés en partie basale du noyau spermatique ; avec les bras chromosomiques (bleu clair) s'étendant vers les télomères (verts) qui sont localisés à la "périphérie extrême" du noyau murin.
- B. Nous présentons une version raffinée du modèle qui représente une organisation plus segmentée, avec des télomères et des centromères localisés dans le noyau murin.

Comme nous avons pu l'évoquer dans l'introduction, les espèces oxygénées réactives sont indispensables à la compaction optimale du noyau spermatique lors du transit épидидymaire. **Chez les souris *Gpx5*^{-/-}, où le stress oxydant épидидymaire est augmenté, nous avons constaté une compaction plus importante du noyau spermatique murin** (Article I, tableau II). La compaction du noyau spermatique est un paramètre clé de la fertilité qui peut influencer la mobilité et la réussite de la fécondation (Liu and Baker, 2007). La littérature rapporte que des souris invalidées pour *Sngpx4* présentant un défaut de compaction de la chromatine ont des difficultés à pénétrer la zone pellucide (Pipolo et al., 2017 ; Puglisi et al., 2012). Dans nos modèles de souris, nous n'avons néanmoins jamais évalué cette capacité de liaison à la zone pellucide qui pourrait être altérée que ce soit chez les souris DKO ou chez les souris *Gpx5*^{-/-} qui présentent une augmentation de la compaction de la chromatine (Projet I, Article I, tableau I). Cette compaction accrue du noyau spermatique des souris *Gpx5*^{-/-} n'affecte pas les taux de fécondation qui sont semblables lorsque nous comparons les croisements mâles *Gpx5*^{-/-} x femelles WT avec les croisements mâles WT x femelles WT (Chabory et al., 2009). Cependant, nous ne savons pas aujourd'hui si cette compaction accrue du noyau spermatique perturbe la phase de décondensation de ce noyau post-fécondation et son évolution en *pronucleus* mâle. Des expériences de cinétique de décondensation en ayant recours au *time-lapse* sont envisagées pour tenter de répondre à cette interrogation.

Concernant les télomères ceux-ci ont été observés en périphérie du noyau spermatique humain alors que les centromères sont organisés en « chromocentre » au centre du noyau spermatique (Zalensky and Zalenskaya, 2007). Récemment, une étude a montré que ces régions des chromosomes s'organisent en *clusters* au sein du noyau spermatique humain (Ioannou et al., 2017). En accord partiel avec les études réalisées sur les spermatozoïdes humains, nous montrons ici chez la souris que les régions centromériques et télomériques s'organisent en *clusters* à la périphérie du noyau spermatique (figure 77 ; Article I, figure 2). Les études d'immunofluorescence, nous montrent que ces régions chromosomiques co-localisent avec les régions spermatiques oxydées (figures 23 et 47 et Article I, figure 3 ; Noblanc et al., 2013). En concordance avec ces observations, nous avons montré précédemment que l'oxydation de l'ADN touche les régions répétées de type *SINE*, des séquences retrouvées préférentiellement dans les régions péri-centromériques (figure 50 ; Kocer et al., 2015 ; Prades et al., 1996). Dans le contexte spermatique, les régions télomériques et centromériques présentent un intérêt particulier car elles permettent d'assurer la mise en place des chromosomes et leurs stabilités

après la fécondation (Thilagavathi et al., 2013). Il a par ailleurs été montré que les télomères interviennent aussi dans la formation du *pronucleus* mâle (Zalenskaya et al., 2000). Étant donné la richesse en guanine des télomères, leur susceptibilité vis-à-vis des atteintes oxydantes devrait être importante. Néanmoins, ce point reste à vérifier car nos données de séquençage des régions oxydées des chromosomes murins sur le modèle *Gpx5*^{-/-} n'ont pas mis en avant une sensibilité particulière des régions télomériques à l'oxydation (Kocer et al., 2015). La littérature suppose que les télomères puissent être sensibles au stress oxydant. Si c'est effectivement le cas en cellule spermatique, la moindre atteinte de ces régions pourrait entraîner des défauts de formation du *pronucleus* mâle et donc de développement (Houben et al., 2008). Il a été par ailleurs montré que la présence de la guanine oxydée (résidu 8-OHdG) pourrait inhiber la liaison de nombreux facteurs de transcription et de protéines intervenant dans la protection des télomères, comme les protéines *telomeric repeat-binding* (TERF) TERF1 et TERF2 (Opresko et al., 2005 ; Valinluck et al., 2004). Pour creuser cette question de la stabilité des chromosomes spermatiques en contexte de stress oxydant nous pourrions mesurer dans la première cellule du zygote, la taille des télomères en comparant les embryons obtenus avec des ovocytes fécondés par un spermatozoïde de souris sauvage ou invalidée pour *Gpx5*, afin de voir si l'oxydation de l'ADN induit un raccourcissement des télomères. Cela est possible *via* une approche dite de « *telomere restriction fragment* » (TRF) qui consiste à mesurer la longueur des télomères après digestion de l'ADN non télomérique par différentes enzymes de restriction et migration sur gel (Mender and Shay, 2015). Une évaluation du niveau des protéines de protection et de réparation des télomères telles que TERF1 et 2 pourrait être aussi réalisée (Opresko et al., 2005 ; Valinluck et al., 2004).

Un autre point important est le chromosome sexuel Y qui est un chromosome difficile à réparer à cause de sa faible capacité de recombinaison et de sa richesse en séquences répétées (Rozen et al., 2003). Étant donné sa forte oxydation (figure 48 ; Kocer et al., 2015), la probabilité de transmettre un chromosome Y défectueux, avec un fort taux de mutation à la descendance mâle, peut-être significativement plus élevé dans les spermatozoïdes présentant des dommages oxydants. Une perspective intéressante serait d'étudier par une approche de séquençage exomique, l'éventuelle transmission de mutations du chromosome Y dans la descendance en comparant les souriceaux mâles issus d'un croisement entre des souris femelles WT croisées avec des mâles WT ou invalidés pour *Gpx5*. Chez la souris, le gène *Sry* (*Sex-determining region on the Y Chromosome*), qui conduit à la différenciation des gonades en

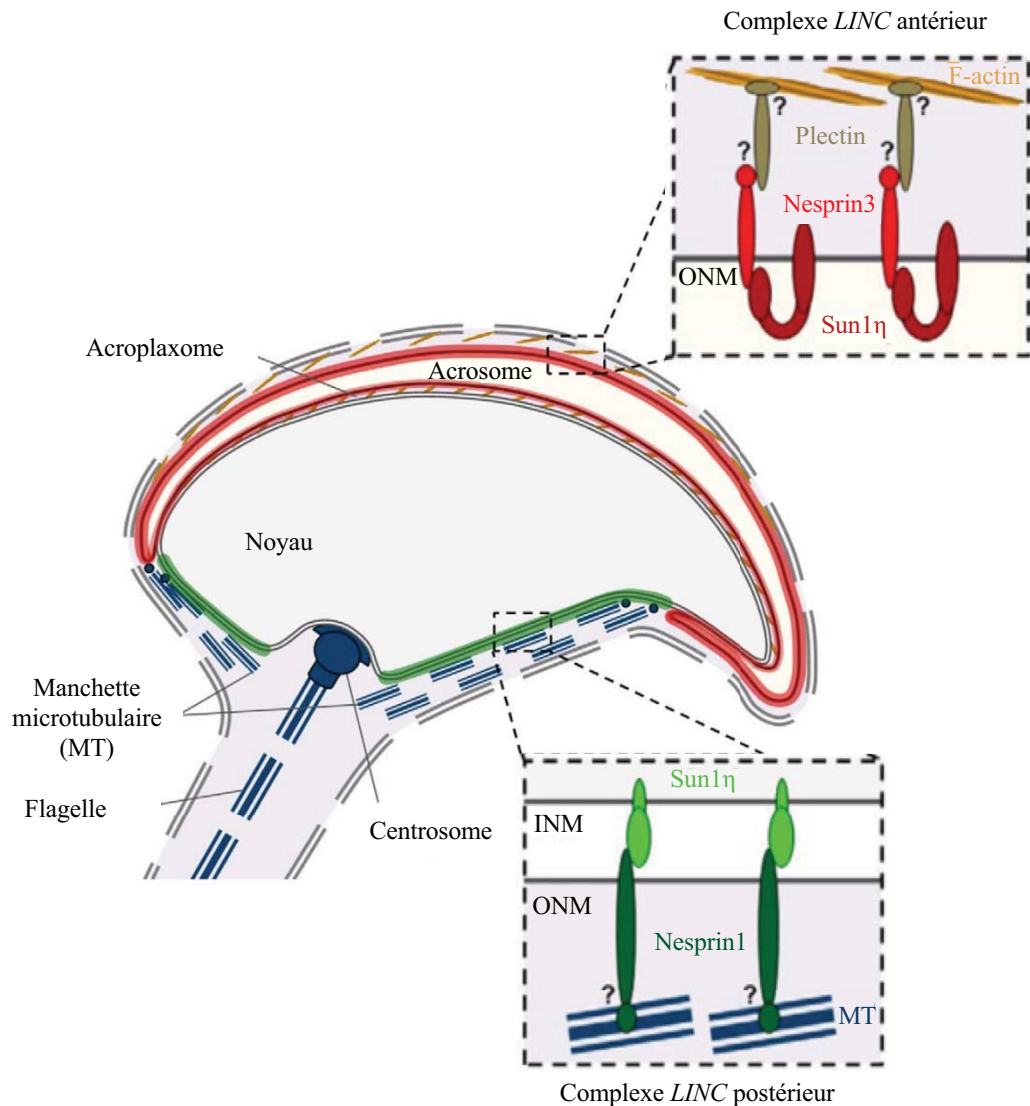


Figure 78 : Modèle illustrant les complexes *LINC* dans la tête spermatique murine.

Des complexes « *linker of nucleoskeleton and cytoskeleton* » (*LINC*) permettent de connecter le noyau et l'acrosome à la manchette microtubulaire environnante (MT) et l'actine-F respectivement.

ONM : *outer nuclear membrane* ; INM : *inner nuclear membrane*.

(Modifiée d'après Göb *et al.*, 2010)

testicules par une cascade moléculaire, est situé sur le bras court du chromosome Y, qui est la région que nous avons trouvé fortement oxydée (Kocer et al., 2015). Le long bras du chromosome Y, quant-à-lui, est connu pour porter une information génétique requise pour la spermatogenèse (pour revue voir Krausz and Casamonti, 2017) et la compaction de la chromatine (Yamauchi et al., 2010) et notamment le gène *Sly*. Les souris invalidées pour *Sly* présentent une différenciation spermatique anormale associée à des défauts de compaction de la chromatine et des dommages à l'ADN (Cocquet et al., 2009 ; Riel et al., 2013). Il serait donc intéressant d'évaluer au niveau spermatique et dans la descendance des différents croisements, si le gène *Sry* ou le gène *Sly* (présents en de multiples copies) arborent des mutations.

D'autre part, outre l'organisation tridimensionnelle des chromosomes dans le noyau spermatique, nous avons pu observer grâce à l'approche d'immunofluorescence couplée à un traitement tridimensionnel que les histones persistantes occupent une région appelée la crête dorsale liée à la matrice nucléaire (Article I). Cette dernière fait le lien entre l'ADN, l'enveloppe nucléaire et le cytosquelette, *via* l'intermédiaire de protéines dont notamment les protéines SUN et les lamines (pour revue voir : Meinke and Schirmer, 2015). Certaines protéines SUN sont spécifiques et indispensables à la formation du noyau spermatique telles que SPAG4 (*Sperm associated antigen 4* ou SUN 4 ; Calvi et al., 2015 ; Pasch et al., 2015). Des souris invalidées pour le gène codant pour SPAG4 présentent une globozoospermie associée à des spermatozoïdes dont la membrane nucléaire est déformée (Calvi et al., 2015 ; Pasch et al., 2015). Il a été proposé que les protéines SUN pourraient intervenir dans la formation du *pronucleus* mâle (Zhang et al., 1996). Nous pouvons faire l'hypothèse que des altérations de ces protéines SUN comme l'oxydation pourraient induire des défauts ou un retard dans la formation du *pronucleus* mâle. En effet, ces protéines SUN sont localisées sur la crête dorsale (figure 78) et dans la partie basale et sont donc potentiellement touchées par l'oxydation. Par ailleurs, SPAG4 a été montrée pour co-localiser et interagir avec la β -tubuline (Pasch et al., 2015) et nous avons pu montrer que cette dernière co-localise avec les régions oxydées dans le noyau spermatique murin, suggérant que ces régions d'organisation du noyau sont potentiellement touchées par l'oxydation. Il serait intéressant de voir si ces protéines sont effectivement altérées par l'oxydation en évaluant si ces protéines sont relocaliser par une approche d'immunofluorescence ; mais aussi d'évaluer leur implication après la fécondation dans le développement embryonnaire.

Dans les cellules somatiques, les régions de la membrane nucléaire liées à la matrice nucléaire (MAR) sont supposées être organisatrices de la chromatine et rendre la chromatine permissive ou non à la transcription des gènes (Arope et al., 2013). Il semblerait que dans le noyau spermatique, les MAR jouent un rôle similaire (à l'exception du rôle transcriptionnel dans une cellule silencieuse) permettant ainsi l'organisation de la chromatine spermatique, et après la fécondation, la formation du *pronucleus* mâle et le développement embryonnaire (Linnemann et al., 2009 ; Shaman et al., 2007a, 2007b). Dans le noyau spermatique, les régions MAR sont associées aux régions riches en histones (Hammoud et al., 2009 ; Ward, 2010). Les études que nous avons menées sur les noyaux spermatiques oxydés confirment que ces régions contiennent des histones persistantes qui sont localisées dans la région basale et sur la crête dorsale du noyau spermatique murin et sont touchées par l'oxydation (Noblanc et al., 2013 ; Ward, 2010). Néanmoins, la connaissance précise des régions géniques liées à ces histones est encore controversée et un consensus n'est pas atteint dans la communauté (*Cf.* Introduction Bibliographique). En effet, selon les approches techniques et analytiques utilisées, les différentes équipes qui se sont attachées à identifier les séquences spermatiques toujours en agencement nucléosomal ne trouvent pas les mêmes résultats. De plus, il n'existe pas de données identifiant les régions géniques liées aux différents variants des histones retrouvées au sein du noyau d'un spermatozoïde mature, tels que TH2B, H2AZ ... ce qui a motivé la poursuite de nos investigations dans la caractérisation fine des séquences spermatiques murines liées aux histones.

II. L'identification des séquences liées aux histones persistantes attachées à la matrice nucléaire.

Afin de tenter d'éclaircir cette situation, j'ai développé une approche permettant de séparer la chromatine associée aux histones persistantes attachées ou non à la matrice nucléaire. Durant l'analyse par immunoprécipitation des séquences oxydées de l'ADN spermatique du modèle *Gpx5^{-/-}* il a été impossible de séparer les séquences liées ou non à la matrice nucléaire (Kocer et al., 2015). Aucune étude de *ChIP-seq* sur la chromatine spermatique réalisée par différentes équipes ne considère ces régions attachées à la matrice nucléaire (Erkek et al., 2013 ; Hammoud et al., 2009 ; Hisano et al., 2013). En effet, toutes ces études utilisent la même méthodologie de préparation de l'ADN spermatique qui consiste en une décondensation du noyau spermatique provoquant l'expulsion de grandes boucles d'ADN de la tête et la récupération de cet ADN par l'utilisation de la micrococcal nucléase (MNase). Cette approche

ne permet pas de récupérer l'ADN spermatique lié à la matrice nucléaire qui reste solidement accroché aux débris membranaires. À la suite de l'immunoprécipitation des histones spermatiques persistantes liées ou non à la matrice nucléaire (figure 52) nous avons pu récupérer les séquences liées aux histones persistantes (H3, H2A.Z et TH2B) en dissociant celles liées à la matrice de celles non liées à la matrice. Nous observons de façon intéressante dans la fraction dite « surnageant » (non liée à la matrice nucléaire) la présence de séquences connues pour être associées aux histones persistantes (histone H3 ; Brykczynska et al., 2010 ; Hammoud et al., 2009). Il est intéressant de noter que les études d'immunoprécipitation de l'ADN oxydé ont montré que les régions oxydées du noyau spermatique murin s'alignaient de façon significative avec certaines régions associées au variant d'histone H2A.Z (figure 59). H2A.Z a été montré comme un variant d'histone essentiel dans l'organisation de la chromatine ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes. Dans les cellules souches embryonnaires, H2A.Z est associée aux promoteurs de gènes du développement réprimés par le complexe polycomb PRC2 dont fait partie EZH2 (impliquée dans la méthylation de l'histone). H2A.Z a le même profil que SUZ12 qui est un partenaire d'EZH2 dans le complexe polycomb PRC (Creyghton et al., 2008). D'une façon plus large le variant H2A.Z a été impliqué dans les processus de transcription, de réparation de l'ADN, la cohésion de la chromatine, la structure des centromères et le maintien de la frontière eu/hétérochromatine (Greaves et al., 2007 ; Meneghini et al., 2003 ; Sharma et al., 2013 ; Suto et al., 2000 ; Xu et al., 2012). **Actuellement, les fractions ADN collectées sont en attente de séquençage afin d'identifier les gènes en assemblage nucléosomal liés à la matrice nucléaire spermatique.**

Ces dernières années, il a été montré que le spermatozoïde ne transmet pas uniquement la chromatine à l'embryon mais aussi une information épigénétique portée en partie par la méthylation de l'ADN et en partie par les ARN (codants ou non). Cette information épigénétique est considérée comme un paramètre clé de la fertilité et du développement embryonnaire (pour revue voir : Cui et al., 2016 ; Marques et al., 2008 ; Poplinski et al., 2010). Chez l'homme, des études montrent que des altérations de l'épigénome paternel conduisent à des infertilités et à des défauts de développement embryonnaire voire à la transmission de maladies à la descendance (Chang et al., 2005 ; Chopra et al., 2010 ; Mares et al., 2009).

III. L'épigénome spermatique en situation de stress oxydant épидидymaire.

Nous avons souhaité tester l'hypothèse que l'épigénome spermatique pouvait être modifié en cas de stress oxydant post-testiculaire en utilisant le modèle murin *Gpx5*^{-/-} développé au laboratoire. Je me suis concentré sur la méthylation de l'ADN, mais d'autres approches sont menées au sein de l'équipe en particulier sur le volet des petits ARN spermatiques et épидидymaires et leurs dynamiques en contexte WT ou *Gpx5*^{-/-}.

Concernant la méthylation de l'ADN spermatique, des études récentes ont rapporté que la modification du profil de 5hmC (une forme oxydé de la 5mC) dans le spermatozoïde humain pouvait être associée à des infertilités masculines (Efimova et al., 2017 ; Wang et al., 2015). Dans nos modèles, **nous avons constaté une augmentation importante de la marque 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) sur l'ADN spermatique des souris transgéniques *Gpx5*^{-/-} et DKO** (figure 61C). Les résultats obtenus semblent indiquer qu'un stress oxydant au niveau épидидymaire conduit à une modification du méthylome spermatique en induisant une augmentation de l'oxydation de la 5-méthylcytosine (figure 61C). Nous observons la même chose sur des spermatozoïdes sauvages soumis à une exposition artificielle au peroxyde d'hydrogène (figure 61C). De façon logique, nous nous attendions à une diminution de la 5mC avec l'augmentation de la 5hmC chez les souris présentant un ADN oxydé. Or, de façon surprenante, nous constatons une **augmentation de la méthylation de la cytosine sur les spermatozoïdes des modèles murins *Gpx5*^{-/-} et DKO, ce que nous ne retrouvons pas avec une oxydation artificielle de l'ADN spermatique (H₂O₂ ; figure 61B)**. Il nous faudra donc expliquer ces augmentations des marques 5mC/5hmC dans l'ADN spermatique des souris *Gpx5*^{-/-} et DKO, observées avec les deux approches immunoblot et kit Epimark[®]. Pour avoir une quantification plus précise de ces marques, nous avons envisagé d'utiliser une approche de spectrométrie de masse HPLC comme déjà réalisée par d'autres équipes sur l'embryon (Amouroux et al., 2016). L'idée étant d'évaluer le taux de méthylation et d'hydroxyméthylation du noyau des spermatozoïdes spermatiques issus de la tête et de la queue de l'épididyme des souris sauvages, *Gpx5*^{-/-} et DKO.

Parmi les gènes que nous avons testés qui présentent une augmentation de la marque 5mC après utilisation de la technologie Epimark[®], nous notons deux DMR intéressants *H19* et *Rasgrfl* (figure 63). Ces deux régions connues pour afficher une méthylation aberrante dans

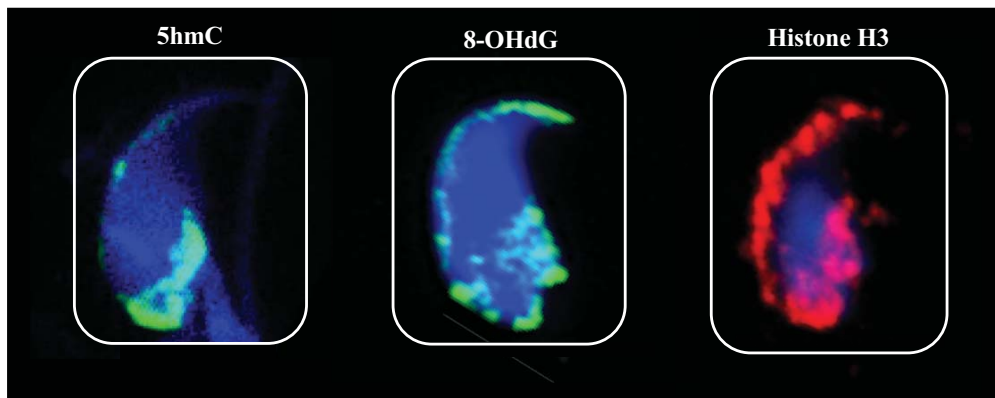


Figure 79 : Localisation de différents marqueurs dans le noyau spermatique murin. Localisation périphérique et basale de l'hydroxyméthylation, de l'oxydation de l'ADN et de l'histone H3 dans le noyau spermatique murin. Le noyau spermatique est marqué par Hoechst (bleu).

certains cas d'infertilité (Khazaie and Nasr-Esfahani, 2014) et sont responsables du syndrome de Beckwith-Wiedmann (Chang et al., 2005). Toutefois, *H19* et *Rasgrfl* sont des gènes localisés sur les chromosomes murins 7 et 9 respectivement, que nous avons montré localisés dans la région ventrale du noyau spermatique (Article I, figure 1) qui ne correspond pas aux régions particulièrement susceptibles à l'oxydation (figure 47). De manière intéressante, la littérature rapporte que les souris invalidées pour *Sngpx4* arborent aussi un défaut de méthylation du DMR du locus *Igf2/H19* (Pipolo et al., 2017) ce qui pourrait être le cas dans notre modèle DKO et/ou *Gpx5*^{-/-}. Néanmoins, en utilisant les mêmes *primers* que dans cette étude, nous ne trouvons pas de variations de l'hydroxyméthylation de ce locus dans nos modèles de souris transgéniques.

L'absence de détection de la marque 5hmC par cette approche peut être due à un problème de coupure des enzymes MspI et HpaII. En effet, la présence de la guanine oxydée (8-OHdG) sur le site de coupure de l'enzyme (CCGG), a été montré pour inhiber cette coupure de l'ADN par des endonucléases telles que MspI et HpaII (Turk and Weitzman, 1995). De plus, il a été rapporté que l'oxydation de la guanine du dinucléotide CpG altère la mise en place de la méthylation de la cytosine par DNMT1 ou DNMT3A chez l'homme (Maltseva et al., 2009).

A plus long terme pour identifier les régions géniques touchées par l'hydroxyméthylation (donc par une potentielle déméthylation active après la fécondation) ou pour repérer des défauts de méthylation des gènes à empreinte parentale il faudra réaliser une analyse globale du méthylome spermatique des souris sauvages, *Gpx5*^{-/-} et DKO. Il existe des techniques permettant de différencier les séquences d'ADN marquées par la 5hmC et le 5mC (Kirschner et al., 2018). Une fois cette identification acquise, nous pourrions alors comparer ces séquences avec celles identifiées lors de l'immunoprécipitation des séquences oxydées (Kocer et al., 2015) et celles obtenues après le protocole d'immunoprécipitation de la chromatine (*ChIP*) que nous avons développé. Nous permettant ainsi de mettre en lien les séquences différenciellement méthylées et hydroxyméthylées, celles oxydées et celles associées aux histones persistantes (figure 79).

Nos résultats préliminaires suggèrent ainsi que l'épigénome spermatique peut être modifié par un stress oxydant lors du transit épидидymaire. Il faudra donc que nous nous attachions à connaître l'origine et à identifier les acteurs de ce changement de l'épigénome. Il sera aussi nécessaire d'évaluer l'impact des modifications de l'épigénome spermatique par le stress oxydant sur le développement embryonnaire (figure 80). L'utilisation de

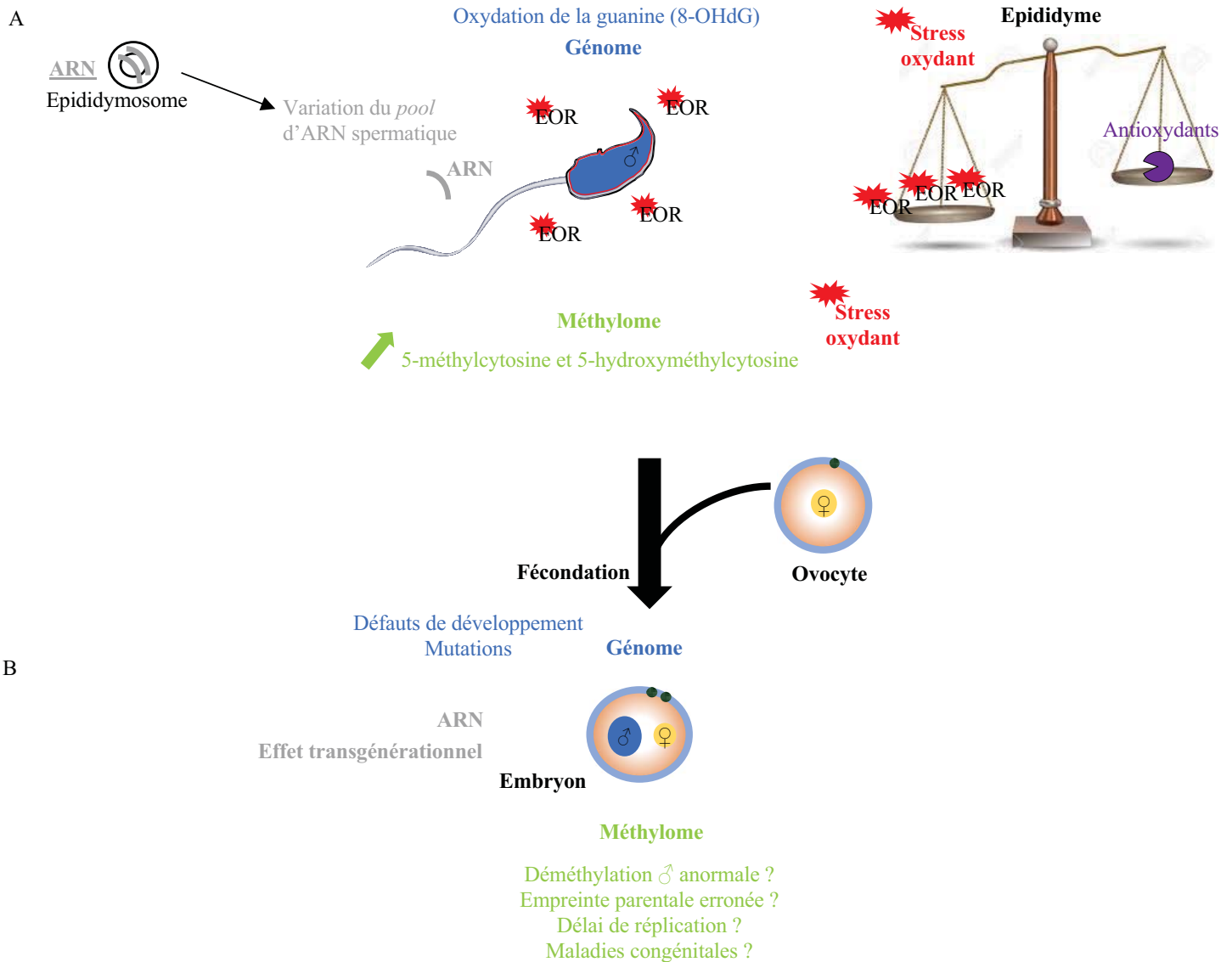


Figure 80 : Noyau spermatique oxydé et conséquences sur l'épigénome embryonnaire.

- A. Lors d'un stress oxydant épiddymaire, les espèces oxygénées réactives (EOR) induisent une oxydation de la guanine (8-OHdG) spermatique. Le méthylome semble être modifié dans les spermatozoïdes oxydés. Le spermatozoïde apporte un *pool* d'ARN (codants et non-codants). Ce *pool* change au cours du transit épiddymaire grâce notamment aux échanges avec les épiddymosomes. Ce *pool* d'ARN est sensible à l'environnement (Reilly *et al.*, 2016 ; Sharma *et al.*, 2016).
- B. Après la fécondation, l'ADN paternel oxydé peut impacter le méthylome du zygote. Les spermatozoïdes oxydés peuvent apporter un *pool* d'ARN différent pouvant ainsi affecter le développement embryonnaire.

l'immunofluorescence 5hmC et 5mC dans des embryons fécondés par des spermatozoïdes de souris sauvages et transgéniques permettra éventuellement d'apprécier s'il existe des variations du méthylome au sein du *pronucleus* paternel. La logique voudrait qu'une augmentation de la marque 5hmC sur le noyau spermatique conduise à une déméthylation anormale (accrue) du *pronucleus* mâle. L'éventuelle déméthylation accrue de régions ADN telles que les régions répétées ou des régions portant les gènes à empreinte parentale paternelle (lesquelles, en contexte sauvage, ne subissent pas la déméthylation) pourrait avoir des conséquences importantes. La déméthylation de ces régions spécifiques pourrait expliquer les défauts de développement observés chez les souris *Gpx5*^{-/-} et/ou les mortalités périnatales (Chabory et al., 2009). Dans des protocoles d'ICSI où le spermatozoïde présente des dommages à l'ADN il a été observé un retard dans le processus de déméthylation et dans le développement embryonnaire (Fernández-Gonzalez et al., 2008 ; Gawecka et al., 2013). Il serait intéressant de confirmer ces observations en évaluant la cinétique de déméthylation du *pronucleus* mâle entre des embryons obtenus avec des spermatozoïdes sauvages *Gpx5*^{-/-} et DKO. Nous pourrions par exemple évaluer si nous observons un délai entre les différents embryons dans le processus de déméthylation et le début du développement (réplication de l'ADN) par une approche d'incorporation de BrdU (Bromodéoxyuridine ; Wang et al., 2013). Par ailleurs, nous pourrions évaluer (*Western-blot*) le niveau des protéines impliquées dans la voie de déméthylation de l'ADN, TET-TDG-BER, dans les embryons issus de spermatozoïdes *Gpx5*^{-/-} et DKO. Un bon exemple serait la protéine TDG qui est impliquée dans la reconnaissance des dérivés oxydés de la 5-méthylcytosine ou bien encore étudier des cytosines déaminases comme AID/APOBEC (Kohli and Zhang, 2013 ; Xue et al., 2016 ; Zhang et al., 2012).

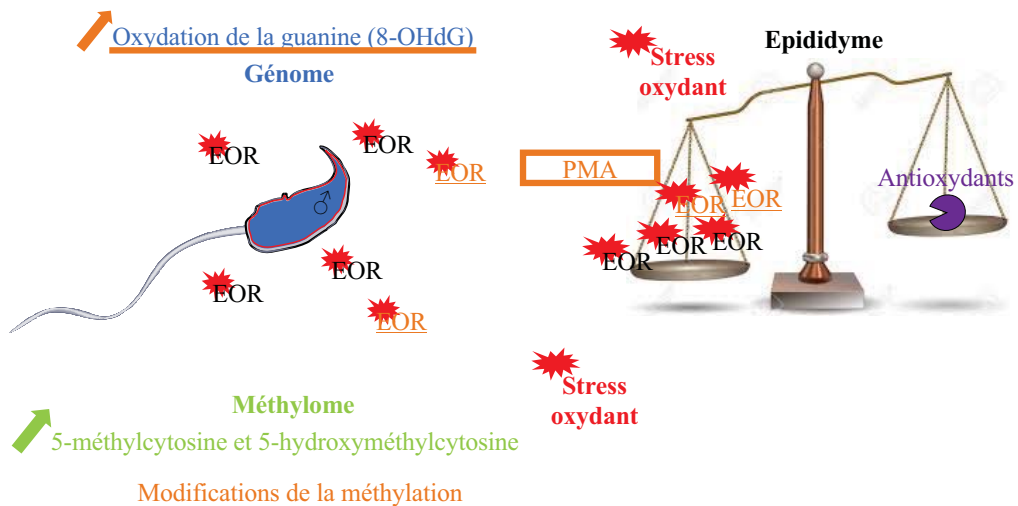
Un autre processus pourrait affecter la méthylation du *pronucleus* paternel, c'est la voie de réparation des dommages oxydants à l'ADN, faisant intervenir OGG1 qui reconnaît l'oxydation de la guanine en résidus 8-OHdG (Larsen et al., 2004). Récemment, il a été montré que cette enzyme est capable de lier l'enzyme TET et donc d'induire la déméthylation par oxydation de la 5-méthylcytosine accolée à la guanine oxydée (Zhou et al., 2016). Nous savons que OGG1 est mise en place au niveau spermatique et qu'après la fécondation, l'enzyme TET induit l'oxydation de certaines cytosines méthylées et conduit donc à la déméthylation du *pronucleus* mâle (Iqbal et al., 2011 ; Smith et al., 2013 ; Tahiliani et al., 2009). Nous présumons que si un spermatozoïde oxydé féconde un ovocyte, les régions méthylées proches d'une guanine oxydée risquent d'être elles-mêmes déméthylées, par recrutement de TET. A titre

d'exemple, les régions répétées de type *SINE* qui ont été montrées pour être des régions méthylées (Ostertag and Kazazian, 2001) et sensibles à l'oxydation (figure 50 ; Kocer et al., 2015) mais qui normalement ne doivent pas être déméthylées, sont des régions que nous pourrions étudier. Une approche d'analyse du génome embryonnaire de type « *oxidative bisulfite sequencing* », permettrait de répondre à cette question en comparant des ovocytes fécondés par des spermatozoïdes issus de souris sauvages ou transgéniques.

Dans un autre registre nous nous sommes récemment intéressés à tester l'hypothèse que le stress oxydant épидидymaire pourrait éventuellement modifier une autre information épигénétique portée par les spermatozoïdes, les petits ARN codants ou non-codants. A l'instar de l'ADN, ces ARN contiennent des résidus guanines qui peuvent être oxydés, d'autant plus qu'ils ne sont pas protégés par des protéines nucléaires comme dans l'ADN. Par des approches de *RNA-seq* dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire de Shanghai (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of Sciences, Prof Y-L Zhang*) sous l'égide d'un programme Hubert Curien (*PRC Cai Yuanpei 2016-2019*) nous avons entrepris d'analyser quantitativement et qualitativement les petits ARN spermatiques et épидидymaires des souris *Gpx5^{-/-}* versus les souris WT (Chu et al., 2018 ; manuscrit en révision). Des différences notables ont été enregistrées à la fois au niveau de l'épididyme et des spermatozoïdes illustrant à nouveau qu'un stress oxydant post-testiculaire modifie les profils des marques épигénétiques spermatiques.

Le rôle de l'épididyme dans le contrôle du *pool* des petits ARN embarqués par le spermatozoïde a été récemment mis en évidence par le groupe de Brett Nixon (Université de Newcastle, NSW, Australie). Ce dernier a récemment publié que la quantité en petits ARN non-codants (ARNnc) spermatiques change au cours de la maturation post-testiculaire dans l'épididyme. Les auteurs montrent que les miRNA sont fortement représentés dans les spermatozoïdes de tête d'épididyme et sont largement diminués dans les spermatozoïdes de queue d'épididyme (Hutcheon et al., 2017). Inversement, les piRNA sont enrichis dans les spermatozoïdes matures prélevés dans la queue de l'épididyme (Hutcheon et al., 2017). Les épидидymosomes, une population hétérogène de petites vésicules lipidiques libérées de l'épithélium épидидymaire, sont mises en avant comme des intermédiaires dans l'apport aux spermatozoïdes d'un ensemble d'ARNnc (Reilly et al., 2016 ; Sharma et al., 2016). Ces observations démontrent la complexité et le caractère dynamique du *pool* d'ARNnc des spermatozoïdes (Hutcheon et al., 2017 ; Pantano et al., 2015).

A



B

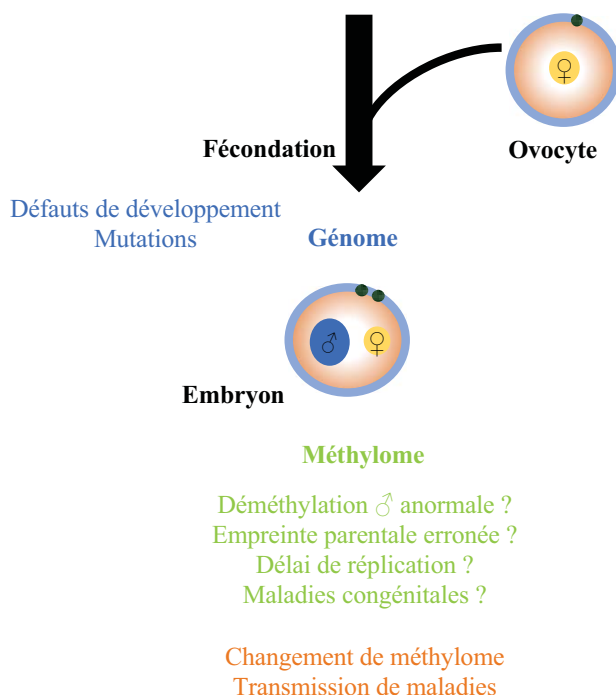


Figure 81 : Impact de la PMA sur l'oxydation et la méthylation de l'ADN spermatique.

- A. Les procédures de procréation médicalement assistée (PMA) conduisent à l'augmentation du stress oxydant donc de l'oxydation de la guanine (8-OHdG) et à des modifications du méthylome spermatique.
- B. Les conséquences de la modification du méthylome spermatique par le stress oxydant sur l'embryon ne sont pas connues mais des perturbations du méthylome spermatique, comme par exemple lors de PMA, peuvent entraîner des défauts de méthylome de l'ADN embryonnaire (empreinte parentale perturbée...) et conduire à des maladies.

Ensemble, ces résultats tendent à confirmer notre hypothèse de départ que le stress oxydant peut modifier l'épigénome spermatique. Ce constat nous invite à nous poser la question de l'impact du stress oxydant engendré par les protocoles de procréation médicalement assistée (PMA) sur l'épigénome spermatique (figure 81 ; pour revue voir : Agarwal et al., 2006). La modification de l'épigénome spermatique par un stress oxydant permettrait peut-être d'expliquer en partie certains cas d'infertilités masculines idiopathiques (Denomme et al., 2017 ; Song et al., 2015) voire des défauts de développement embryonnaire ou la transmission de maladies congénitales.

Une fois évalué le niveau de stress oxydant la question pratique qui se pose au clinicien est celle de la possibilité d'une action thérapeutique. En d'autres termes, pouvons-nous corriger les altérations oxydantes du noyau spermatique ?

IV. La correction du stress oxydant par un supplémentation en antioxydants.

Le stress oxydant, au sein de chaque cellule, est régulé par un système enzymatique et par la présence d'antioxydants non-enzymatiques tels que les vitamines, les polyamines et tout un ensemble de molécules qui ont pour effet de bloquer les radicaux libres et les espèces activées de l'oxygène. L'éventuel effet bénéfique d'une supplémentation antioxydante sur la fertilité mâle chez l'homme a été l'objet de nombreuses études qui n'ont pas permis d'atteindre un consensus. En cause, la disparité des études en termes de : cohortes de patients analysés et les raisons de leur infertilité, de molécules antioxydantes utilisées seules ou en combinaisons, de doses, de durée, de modes d'administration, de paramètres évalués (fertilité, ou amélioration des classiques paramètres spermatiques : numération, morphologie, mobilité). Néanmoins, même en l'absence de résultats prouvant l'efficacité de cette approche thérapeutique, les antioxydants sont très fréquemment utilisés spontanément par les patients eux-mêmes ou conseillés par les cliniciens. Ces dix dernières années le marché mondial des antioxydants ciblés sur la fertilité mâle s'est enrichi d'environ une centaine de formulations très diverses générant des chiffres d'affaires colossaux.

Afin de mettre un peu de clarté dans cette cacophonie notre équipe de recherche a œuvré dans deux directions :

- ✚ Optimiser pour la clinique un protocole de détection du niveau d'atteintes oxydantes du noyau spermatique humain qui soit fiable, pratique, précis et reproductible. Un des

objectifs a été de définir si possible des seuils de pathogénicité qui permettront de catégoriser les patients à traiter éventuellement en adaptant les doses au niveau d'oxydation enregistré.

Ce travail conduit en partenariat avec les cliniciens locaux du centre AMP-CECOS (Centre d'évaluation et de conservation des ovocytes et du sperme) de l'Hôpital Estaing de Clermont-Ferrand (service du Pr. Florence Brugnon) a conduit à la validation d'une approche en cytométrie en flux pour la détection des résidus 8-OHdG en sperme frais. Cette optimisation s'est accompagnée pour la première fois de la définition d'un seuil pathologique au-delà duquel les atteintes oxydantes du noyau spermatique sont corrélées avec des paramètres spermatiques anormaux et des situations cliniques connus pour induire des échecs reproductifs. Ces travaux ont récemment été publiés dans la revue *Human Reproduction* (Vorilhon et al., 2018, *in press*). J'ai participé marginalement à la partie pratique de cette étude ce qui a motivé que mon nom soit mentionné en « remerciements ».

✚ Tester dans nos modèles murins transgéniques présentant des spermatozoïdes à noyau oxydé (modèle *Gpx5^{-/-}*) l'efficacité d'une formulation antioxydante « raisonnée ».

Par « raisonnée » il faut entendre une formulation élaborée avec soin associant un nombre minimal d'ingrédients indispensables, dont les rôles antioxydants sont prouvés, dont les effets bénéfiques sur les spermatozoïdes ont été avérés expérimentalement, dont l'association entre eux ne s'accompagne pas d'effets antagonistes et/ou d'effets secondaires (Gharagozloo et al., 2016). Cette formulation a été élaborée au sein de la société CellOxess LLC (Pennington, New Jersey, Etats-Unis ; C.E.O. P. Gharagozloo) suivant une approche rigoureuse de type « *drug design process* » de l'industrie pharmaceutique avec les Professeurs John Aitken (Université de Newcastle, NSW, Australie) et Joël Drevet (Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France) tous deux exerçant en qualité de conseils scientifiques honoraires de cette entreprise de biotechnologie.

Dans ce contexte, l'équipe a testé une formulation antioxydante commercialisée sous le nom de Fertilix® par la société CellOxess LLC donnée dans l'eau de boisson à différents groupes de souris. **Nous avons ainsi pu montrer que l'utilisation d'une telle formulation permettait de réduire la proportion de spermatozoïdes présentant un ADN oxydé chez les souris *Gpx5^{-/-}* à un niveau comparable aux souris sauvages** (figure 4, Gharagozloo et al.,

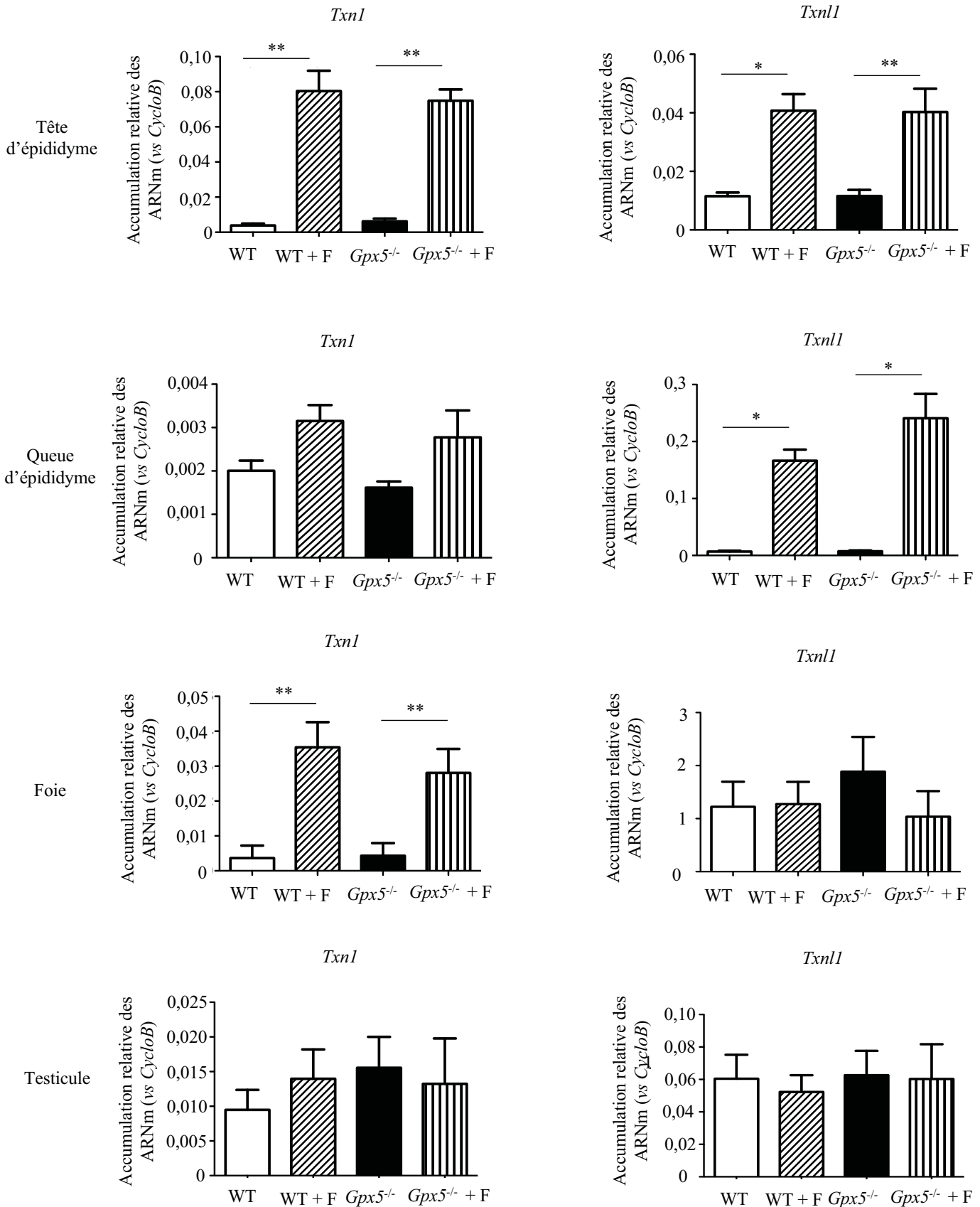


Figure 82 : Expression des gènes codant pour thiorédoxines Txn1 et Txn11.

L'accumulation relative des ARNm des différents gènes codants pour des enzymes antioxydantes, les thiorédoxines Txn1 et Txn11, a été déterminée par qRT-PCR dans la tête et la queue d'épididyme, le foie et le testicule des souris de chaque catégorie (WT et *Gpx5*^{-/-} traitées ou non). Les barres d'erreur représentent les sommes des écarts à la moyenne (SEM) et un test de Mann-Whitney a été effectué entre chaque catégorie : **p*<0,05, ***p*<0,01. + F : traitées avec le Fertilix®.

WT (n= 5); WT + F (n= 6) ; *Gpx5*^{-/-} (n= 4) et *Gpx5*^{-/-} + F (n= 8). *CycloB* : Cyclophiline B

2016). Le dosage et la durée de traitement utilisés n'ont pas induit de décondensation des noyaux spermatiques, un risque associé à l'utilisation d'antioxydants sur le spermatozoïde puisqu'il faut un certain niveau d'oxydation pour assurer un pontage disulfure physiologique des groupements thiols portés par les protamines nucléaires pendant la descente épидидymaire (Björndahl and Kvist, 2010b ; Greco et al., 2005 ; Lanzafame et al., 2009).

L'effet bénéfique du traitement antioxydant est attesté par une baisse conséquente de l'expression des enzymes antioxydantes épидидymaires (telles que la catalase, les GST ou certaines PRDX) démontrant que l'excès de peroxyde d'hydrogène induit par le contexte de stress oxydant chez les animaux *Gpx5^{-/-}* était bien résorbé par les antioxydants donnés de façon exogène (Gharagozloo et al., 2016). L'ensemble des données recueillies au niveau de la queue de l'épididyme, organe de stockage des spermatozoïdes, semble montrer que le stress oxydant est diminué au sein de cet organe par l'apport d'une supplémentation orale antioxydante (figure 73 et figure 4, Gharagozloo et al., 2016).

A l'inverse, dans la tête de l'épididyme des souris WT, nous observons une augmentation de l'expression de la *Sod*, des *Gstm* et π chez les souris sauvages traitées et une tendance à l'augmentation de la *Gpx1* et 3 semblant indiquer la présence d'un stress chez des souris sauvages supplémentées (figure 72). Ces observations renforcent l'idée que l'administration d'antioxydants dans un contexte où cela n'est pas nécessaire peut induire des effets délétères.

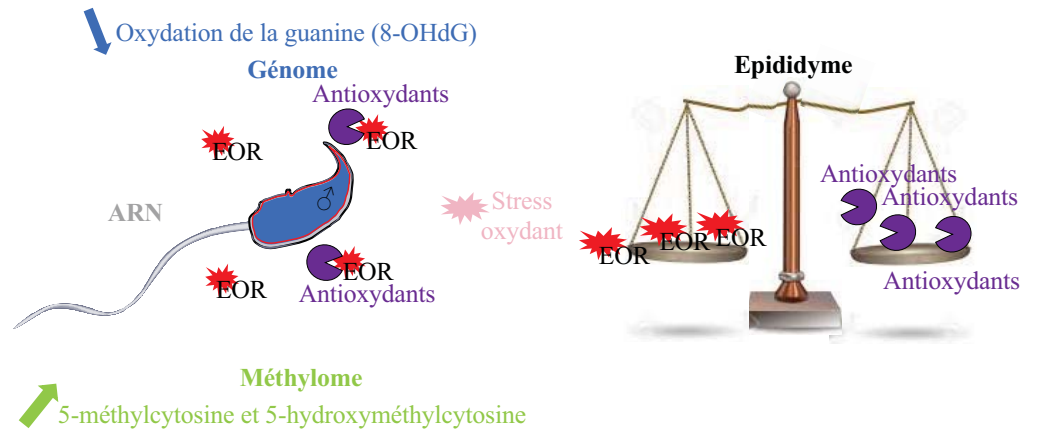
Nous avons également évalué l'expression des enzymes de la famille des thiorédoxines, : *Txn1* et la *Txn11*. Ce sont des enzymes clés intervenant dans le recyclage des GPx et des PRDX (figure 32 ; pour revue voir Netto and Antunes, 2016). Elles ont leurs expressions augmentées dans la tête, la queue d'épididyme et le foie des souris traitées que ce soit chez les souris *Gpx5^{-/-}* ou les souris sauvages (figure 82). L'augmentation de l'expression de ces deux enzymes pourrait s'expliquer par le fait que nous perturbons l'équilibre antioxydant dans ces tissus après l'administration de la supplémentation. Il est probable que l'apport de vitamines telles que la vitamine C ou E (molécules qui facilitent l'action des thiorédoxines et des GST ; figure 32) soit en cause. Il serait intéressant de compléter cette étude et d'évaluer le niveau de chacune de ces protéines par une approche de *Western-blot* ainsi que leurs activités

afin de confirmer les changements observés dans le système antioxydant enzymatique de l'épididyme et d'autres tissus. Nous devrions aussi mesurer le niveau d'expression des enzymes thiorédoxines réductases (Trxr) qui contrôlent le recyclage des thiorédoxines et permettent la réduction de la vitamine C (vitamine apportée dans la supplémentation ; figure 32).

Ainsi, après évaluation du niveau d'oxydation du noyau spermatique il est possible d'envisager de corriger les altérations oxydantes par une approche thérapeutique simple de supplémentation orale en antioxydants. Il reste encore beaucoup d'étapes avant de valider complètement l'efficacité et l'innocuité d'une telle stratégie en clinique. Des essais cliniques à grande échelle, multicentriques, en double aveugle, placebo *versus* antioxydants devront être menés pour valider ce choix thérapeutique. Il serait par ailleurs intéressant d'évaluer en parallèle si le traitement antioxydant corrige (ou bouleverse encore plus) les modifications du méthylome spermatique observées chez les souris *Gpx5^{-/-}* et/ou DKO (figure 61).

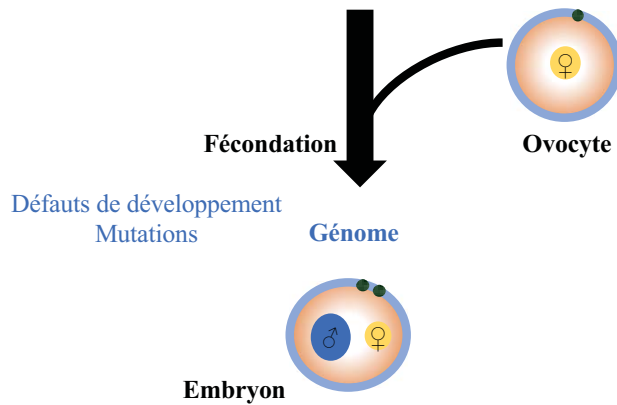
En effet, une étude de 2009, montre qu'une formulation antioxydante induit des variations du méthylome spermatique (Tunc and Tremellen, 2009). Les auteurs montrent que le méthylome spermatique de patients infertiles est diminué et que l'administration d'une supplémentation orale antioxydante permet un retour à un méthylome comparable à celui des patients fertiles non traités (Tunc and Tremellen, 2009). Plus récemment, il a été rapporté que des souris mâles en sous-nutrition présentaient un taux de spermatozoïdes à noyau oxydé (8-OHdG) augmenté et une baisse de la 5mC (McPherson et al., 2016). Une supplémentation en antioxydants et vitamines chez ces souris permet de restaurer la méthylation spermatique et un taux basal de spermatozoïdes positifs pour la 8-OHdG (McPherson et al., 2016). D'autres études rapportent un impact d'une supplémentation en antioxydants sur le méthylome. Par exemple, un des composés de la formulation que nous avons utilisé, l'acide folique module la disponibilité en S-adenosyl-1-méthionine, le donneur du groupement méthyle pour la méthylation de la cytosine (Jirtle and Skinner, 2007). Une déficience en acide folique conduit à une méthylation anormale au niveau de l'ADN spermatique sur des gènes impliqués dans le diabète tels que *Nkx2-2*, qui code pour un facteur de transcription et conduit à des défauts de développement embryonnaire (Lambrot et al., 2013). Récemment, un apport excessif d'acide folique conduit de la même façon à des défauts de développement embryonnaire en lien avec une variation du méthylome (Ly et al., 2017). Des résultats similaires sont observés chez des patients traités avec une supplémentation à haute dose d'acide folique (Aarabi et al., 2015).

A



En cas de stress oxydant baisse de la 5hmC ? De la 5mC ?

Modifications du méthylome spermatique



Déméthylation ♂ anormale ?
 Empreinte parentale erronée ?
 Délai de réplication ?
 Maladies congénitales ?

Modifications du méthylome embryonnaire ?
 Conséquences transgénérationnelles ?

B

Figure 83 : Supplémentation en antioxydants exogènes et noyau spermatique.

- A. L'apport d'antioxydants exogènes diminue la 8-OHdG au niveau spermatique. L'évaluation de l'impact des antioxydants sur le méthylome spermatique en cas de stress oxydant devra être réalisée.
- B. Après la fécondation, l'ADN paternel oxydé peut conduire à des mutations de l'ADN embryonnaire voire à des défauts de développement. Les conséquences de la modification du méthylome spermatique par le stress oxydant sur l'embryon ne sont pas connues. Les antioxydants comme l'alimentation, apportés chez le mâle, sont connus pour modifier le méthylome spermatique et induire des modifications du méthylome embryonnaire.

Cependant, aucune hypothèse n'a été formulée sur des variations du 5-hydroxyméthylcytosine où qu'un apport d'antioxydants pourrait réduire le niveau de 5hmC. Des études approfondies pour établir le lien entre environnement et modification de cette marque seront donc nécessaires.

Au regard de ces observations, l'apport d'une supplémentation orale antioxydante doit être intégrée comme un « stress alimentaire » dont l'impact sur le méthylome est bien démontré (figure 83). Or, à ce jour les supplémentations en antioxydants sont données de manière non contrôlée et sans évaluation du stress oxydant des patients. Ainsi, une évaluation du niveau de stress oxydant mais aussi de l'épigénome spermatique des patients avant et pendant le traitement serait nécessaire. Il serait intéressant de proposer une approche efficace, rapide et peu coûteuse au centre de PMA pour évaluer le niveau de stress oxydant chez des patients infertiles, ce qui actuellement n'est jamais fait. La spectrométrie de masse HPLC pourrait permettre d'évaluer à la fois le taux d'oxydation de la guanine mais aussi des marques 5mC, 5hmC dans l'ADN spermatique de patients.

Si l'alimentation induit des variations au niveau du méthylome spermatique, il a été récemment démontré qu'elle induisait aussi des variations du *pool* d'ARN spermatique à l'origine d'effets sur les générations suivantes. Une supplémentation orale en antioxydants, qui passe par l'alimentation pourrait donc potentiellement aussi induire des variations des ARN tissulaires et spermatiques. Pour exemple, un stress nutritionnel (régime riche en graisse) chez des rongeurs, modifie le contenu en miARN spermatique et est à l'origine de la transmission de « maladies métaboliques » à la descendance (Fullston et al., 2013). Dans des études plus récentes, un régime riche en graisse ou faible en protéines, administré à des souris mâles conduit à une augmentation d'une catégorie de tRNA fragmentés et est associé à des maladies métaboliques (diabète, obésité) dans la descendance (Chen et al., 2016 ; Sharma et al., 2016). De plus, la micro-injection de ces ARN dans des ovocytes fécondés par des spermatozoïdes issus de mâles nourris avec un régime normal induit des embryons présentant des anomalies métaboliques. Il apparaît donc clairement que l'environnement influence les ARN (codants ou non) spermatiques et contribue à des défauts de développement ou de santé dans la descendance. Une nouvelle étude de la supplémentation en antioxydants sur l'épigénome (méthylome, ARN) tissulaire et spermatique devra être réalisée pour répondre à ces questions.

En conclusion, nous avons pu montrer que le stress oxydant au niveau épидидymaire engendre des dommages à l'ADN spermatique (augmentation de l'oxydation de la guanine) mais aussi à l'épigénome spermatique (augmentation de la méthylation et de l'hydroxyméthylation et de probables variations des ARNnc). Au vu des différentes données rapportées ici, il semble essentiel de poursuivre les études fondamentales pour comprendre dans quelle mesure un stress oxydant post-testiculaire altère le patrimoine génétique paternel, challenge les systèmes de réparation ovocytaire et potentiellement peut-être à l'origine de la transmission de mutations *de novo* dans la descendance. En outre il sera important de poursuivre les analyses concernant l'impact du stress oxydant sur l'épigénome spermatique (méthylome et ARN) et d'évaluer quelles peuvent être les conséquences sur le développement embryonnaire. Les modèles murins dont nous disposons sont particulièrement adaptés pour répondre à ces questions.

En clinique, la prise en compte des altérations oxydantes du noyau spermatique et de leurs potentiels impacts sur la fertilité et la descendance devra être accrue. L'utilisation de tests supplémentaires pour caractériser l'intégrité du noyau spermatique, telles que l'évaluation de la fragmentation et de l'oxydation de l'ADN, doit être promue une fois prouvée leur efficacité. Enfin, le développement d'actions thérapeutiques simples telle que la supplémentation en antioxydants attend encore à ce jour les résultats de la conduite de larges essais cliniques.

Annexes

A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: biological and transgenerational implications.

Alexandre Champroux¹, Julie Cocquet^{2*}, Joëlle Henry-Berger¹, Joël Drevet¹, Ayhan Kocer^{1*}

¹GReD CNRS UMR-6293 INSERM-U1103, Université Clermont Auvergne, France, ²Développement, Reproduction, Cancer, INSERM Institut Cochin, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Genetics

Specialty Section:
Epigenomics and Epigenetics

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
343387

Received on:
19 Dec 2017

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

AC, JC, JHB and AK drafted the manuscript. JRD critically reviewed the manuscript.

Keywords

sperm, paternal epigenome, Chromatin, Histone post-translational modifications, Protamines, Embryo development, DNA Methylation, sperm non-coding RNA.

Abstract

Word count: 150

The past decade has seen a tremendous increase in interest and progress in the field of sperm epigenetics. Studies have shown that chromatin regulation during male germline development is multiple and complex, and that the spermatozoon possesses a unique epigenome. Its DNA methylation profile, DNA-associated proteins, nucleo-protamine distribution pattern and non-coding RNA set up a unique epigenetic landscape which is delivered, along with its haploid genome, to the oocyte upon fertilization, and therefore can contribute to embryogenesis and to the offspring health. An emerging body of compelling data demonstrates that environmental exposures and paternal lifestyle can disturb the sperm epigenome and, consequently, may affect both the embryonic developmental program and the health of future generations. This short review will attempt to provide an overview of what is currently known about sperm epigenome and the existence of transgenerational epigenetic inheritance of paternally acquired traits that may contribute to the offspring phenotype.

Funding statement

State grants from the University of Clermont-(UCA), INSERM, CNRS and former “Région Auvergne” support the activities of the research team headed by Professor. Joël R. Drevet. This work was also supported by INSERM and ANR-12-JSV2-0005-01 to Julie Cocquet.

1 **A decade of exploring the mammalian sperm epigenome: biological and transgenerational**
2 **implications.**

3
4 **Champroux Alexandre¹, Cocquet Julie^{2#}, Henry-Berger Joëlle¹, Drevet Joël R¹ & Kocer**
5 **Ayhan^{1#}**

6
7 # Corresponding authors: julie.cocquet@inserm.fr; ayhan.kocer@uca.fr

8 ¹GReD, Laboratoire “Génétique, Reproduction & Développement”, UMR CNRS 6293,
9 INSERM U1103, Université Clermont Auvergne, 28 Place Henri Dunant, 63000 Clermont-
10 Ferrand, France.

11 ²INSERM U1016, Institut Cochin, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Sorbonne
12 Paris Cité, Paris, France.

13
14 **Abstract**

15 The past decade has seen a tremendous increase in interest and progress in the field of sperm
16 epigenetics. Studies have shown that chromatin regulation during male germline development
17 is multiple and complex, and that the spermatozoon possesses a unique epigenome. Its DNA
18 methylation profile, DNA-associated proteins, nucleo-protamine distribution pattern and non-
19 coding RNA set up a unique epigenetic landscape which is delivered, along with its haploid
20 genome, to the oocyte upon fertilization, and therefore can contribute to embryogenesis and to
21 the offspring health. An emerging body of compelling data demonstrates that environmental
22 exposures and paternal lifestyle can disturb the sperm epigenome and, consequently, may affect
23 both the embryonic developmental program and the health of future generations. This short
24 review will attempt to provide an overview of what is currently known about sperm epigenome
25 and the existence of transgenerational epigenetic inheritance of paternally acquired traits that
26 may contribute to the offspring phenotype.

27
28
29 Keywords: sperm, paternal epigenome, chromatin, histone post-translational modifications,
30 protamines, embryo development, DNA methylation, sperm non-coding RNA.

31
32
33
34 **Introduction**

35 The aim of spermatozoa is to deliver the haploid paternal genome to an oocyte during
36 fertilization. Spermatozoa are highly specialized cells generated in the testis through a
37 differentiation process called spermatogenesis. They are equipped with specific structures to
38 achieve fertilization, such as a flagellum which confers mobility and a very compact nucleus
39 which ensures protection of the paternal genome. Their chromatin organization differ
40 significantly from that of somatic cells: while, in the latter, the chromatin is packed into
41 nucleosomes containing 146 bp of DNA wrapped around an octamer of basic proteins named
42 histones (Kornberg, 1974), in mammalian sperm cells, the chromatin is organized in a very
43 compact structure described as a “doughnut loop” or “toroid” in which the DNA is wrapped
44 around even more basic, smaller proteins, called protamines. As a result, the sperm nucleus is
45 about seven times smaller than that of an interphase somatic cell (Ward and Coffey, 1991).
46 During the last step of spermatogenesis, histones are progressively replaced by protamines
47 through a series of complex chromatin remodelling events which have been the focus of recent
48 studies (see for instance, Barral et al., 2017; Gaucher et al., 2012; Liu et al., 2017; Montellier
49 et al., 2013). The key steps of histone-to-protamine transitions are i) opening of the chromatin,

50 owing to the combination of post translational modifications of histones, in particular histone
51 hyperacetylation, and incorporation of histone variants, ii) eviction of most histones while
52 transition proteins and some late expressed histone variants are transiently incorporated, iii)
53 removal of transition proteins and of most remaining histones, while protamines are
54 incorporated [For reviews on this topic, see (Hoghoughi et al., 2017; Rathke et al., 2014)]. The
55 majority of histones are replaced by protamines during spermiogenesis but some do persist in
56 mature sperm (Figure 1 ; Oliva and Dixon, 1991; Wykes and Krawetz, 2003; Gatewood et
57 al.,1990 ; Tanphaichitr et al., 1978). First seen as histone remnants of an inefficient replacement
58 process, it is now rather clear to the scientific community that sperm persisting histones
59 contribute to the paternal information brought to the oocyte and the developing embryo. There
60 is nevertheless an ongoing debate regarding the genomic location of those persistent histones
61 (Brykczynska et al., 2010; Carone et al., 2014; Hammoud et al., 2009; Kocer et al., 2015; Royo
62 et al., 2016; Samans et al., 2014). Interestingly, it has also been recently demonstrated that
63 spermatozoa do not only transmit their DNA and chromatin to the embryo. Along with the
64 haploid genome and various epigenetic marks carried by the DNA and associated chromatin
65 proteins, spermatozoa bring along a complex array of RNAs (both coding and non-coding).
66 Recent reports have shown that some of these RNAs may affect the developing embryo and/or
67 the progeny (Chen et al., 2016; Sharma et al., 2016).

68 Therefore, from now on, the issues of male fertility, successful reproduction, optimal
69 embryonic development, offspring's health and that of the subsequent generations cannot be
70 solely attributed to sperm DNA integrity. The picture is now more complex and beside an
71 optimal paternal genetic code one has to consider the highly dynamic and environmentally
72 susceptible epigenetic information carried by the paternal nucleus.

73 In the present review, we focus on sperm-specific chromatin features and epigenome.
74 Subsequently, with the literature available to date we illustrate the impact that the sperm
75 epigenome may have on early embryo development and the consequences of environmental
76 effects on paternal epigenome inheritance.

77

78 **The mammalian sperm epigenome**

79 Epigenetics (from “epi” in Greek which means above/upon/near) is the study of heritable
80 changes in gene expression that are not caused by modifications in the primary DNA sequence
81 (Goldberg et al., 2007). Epigenetic information is cell specific, dynamic and responsive to
82 environmental influences. Epigenetic regulation can occur via three main processes in
83 mammals: i) DNA methylation and associated modifications ii) the histone/chromatin code
84 which consists mainly in histone variants and their post-translational modifications and iii) non-
85 coding RNA.

86

87

88 **DNA methylation and beyond**

89 DNA methylation is the most studied epigenetic modification in the literature, probably
90 owing to its robustness compared to histone post-translational modification (PTM) or RNA. It
91 consists in the addition of a methyl group of S-adenosyl-1-methionine to carbon five of cytosine
92 resulting in the formation of 5-methylcytosine (5mC). DNA methylation is an important
93 regulator of gene expression demonstrated to be globally involved in gene regulation, and, more
94 specifically, in transposon silencing, genomic imprinting, maintenance of genome integrity or
95 X chromosome inactivation (for reviews, see Bird, 2002; Hackett et al., 2012; Messerschmidt
96 et al., 2014). In mammalian cells, cytosine methylation occurs mostly at CpG dinucleotides.
97 CpG islands (CGI), which are long regions rich in CG repeats located in promoter regions,
98 remain largely hypomethylated; most other CpG (*i.e.* in non-CpG island promoters, gene
99 bodies, transposons and intergenic regions) are targets of DNA methylation. DNA methylation

100 at promoter regions is associated with gene repression (Messerschmidt et al., 2014). It is carried
101 out by DNA methyltransferases (DNMTs) that are divided in two classes: DNMT3A,
102 DNMT3B and DNMT3L (Bestor, 1988a, 1988b) are responsible for *de novo* methylation, while
103 DNMT1 is involved in methylation maintenance (for review, see Chen and Li, 2004). A fourth
104 *de novo* DNMT has been recently identified in rodents (Barau et al., 2016; Jain et al., 2017).

105 In gametes, DNMTs also establish a differential DNA methylation on ICR (Imprinting
106 control regions) a phenomenon known as paternal or maternal imprinting depending on whether
107 it takes place in male or female germ cells (Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007). These ICR
108 are maintained in the embryo meaning that somatic cells present, at a few loci, paternal or
109 maternal mono-allelic methylation patterns which results in a maternal or paternal mono-allelic
110 expression, respectively (Hanna and Kelsey, 2014). This phenomenon only concerns a minor
111 part of the genome (to date there are less than 30 ICR in the mouse genome) but has an
112 important signification in term of development and health. Most of them are maternal ICR and
113 only 3 of them are established in male gametes.

114 Transposon silencing is also mediated by DNMTs and established in the male gametes with a
115 high efficiency.

116 All these distinct sex-dependent DNA methylation profiles are essential for male
117 gametogenesis as demonstrated by reports that DNMT3A and 3B invalidation leads to an arrest
118 in meiosis, an overexpression of repeated elements such as LINEs (long interspersed nuclear
119 elements) and IAP (intracisternal A particles) and, a loss in spermatocytes *via* apoptosis; while
120 DNMT3L invalidation leads to male sterility because *de novo* methylation is absent in germ
121 cells (Bourc'his and Bestor, 2004; Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007; Walsh et al., 1998).

122
123 Overall, depending on the cellular type and development period, the genome is more or
124 less methylated (Bird, 1986; Bogdanović and Veenstra, 2009) with two major reprogramming
125 time points during mammalian development: in primordial germ cells (PGC) and pre-
126 implantation embryos.

127 During the formation and migration of PGC at E12.5 to E13.5 days in mouse, DNA
128 methylation is erased up to a point that solely 10% of total CpG remain methylated. This is
129 required because PGC are derived from embryo cells that have already acquired a somatic fate
130 (Guibert et al., 2012; Hajkova et al., 2002; Seisenberger et al., 2012). The erasure of CpG
131 methylation (5mC) is a key component of PGC specification, but the dynamics and
132 underlying mechanisms of this process remained unclear (Hackett et al., 2012). Recent
133 studies have shown that conversion of 5mC to 5hmC (5-hydroxymethylcytosine) is
134 instrumental to the DNA demethylation process and involves enzymes belonging to the ten-
135 eleven translocation (Tet) family (Gan et al., 2013; Hackett et al., 2013; Tahiliani et al., 2009).
136 Further down, 5hmC can itself be oxidized by Tet into 5fC (standing for 5-formylcytosine) and
137 5caC (standing for 5-carboxycytosine) (He et al., 2011; Ito et al., 2011). In mammals, the Tet
138 family contains three members (Tet 1 to 3) that are expressed differently according to tissue
139 and stage of development (Tahiliani et al., 2009). Tet 1 and 2 are present in embryonic stem
140 (ES) cells and PGC (Hackett et al., 2012) while Tet3 is expressed in the oocyte, spermatozoon
141 and in the preimplantation embryo. In mice, at around E15.5, DNA methylation is rapidly re-
142 acquired, and the germ cell-specific profile is fully established after birth in pachytene
143 spermatocytes through the action of DNMT 3A, 3B, 3L and 3C (Barau et al., 2016; Guibert et
144 al., 2012; Seisenberger et al., 2012)

145 At the end of gametogenesis, spermatozoa are “hypermethylated” with ~90% of methylated
146 CpG, a situation that is different from that of the oocyte where only 40% of CpG are methylated
147 (Popp et al., 2010). DNA modifications in spermatozoa are mostly in transposons and intergenic
148 regions, while gene bodies and CGI are hypomethylated (Smith et al., 2012). In many species,

149 the sperm DNA methylation pattern appears to be different from that of somatic cells but similar
150 to that of ES cells (Farthing et al., 2008; Weber and Schübeler, 2007). For instance promoters
151 of transcription and signalling factors controlling early development such as *Sox-*, *Fox-*, *Hox*
152 *or Gata-* family are equally hypomethylated in ES cells and spermatozoa (Hammoud et al.,
153 2014). Interestingly, these same regions apparently contain persisting histones (Brykczynska et
154 al., 2010; Erkek et al., 2013; Hammoud et al., 2009) suggesting a role of the sperm epigenome
155 in the regulation of gene expression after fertilization.

156 In the oocyte, zygote and early embryo, the DNA methylation pattern is the opposite,
157 *i.e.* methylation restricted to CGI and gene bodies (Smith et al., 2012). Other cytosine
158 modifications, such as 5hmC, 5fC and 5caC are minor compared to 5mC but despite
159 representing only a small fraction of modified CpG, their location could be biologically
160 meaningful. In their study of 5hmC at different stages of male germ cell differentiation, Gan et
161 al. observed that 5hmC represents less than 2.5% of 5mC in male germ cells but is very dynamic
162 as it changes in genomic regions related to the regulation of gene expression (such as
163 transposons and piRNA clusters) and correlates positively with genes expressed during
164 spermatogenesis, with high level of 5hmC found in coding exons of highly expressed genes
165 (Gan et al., 2013).

166 A few days after fertilization, DNA methylation is erased, with substantial differences in timing
167 between the paternal and maternal pronuclei (Messerschmidt et al., 2014). A small portion of
168 DNA methylation, principally imprinted regions and a sub-category of transposons called IAP
169 (Intracisternal A-particle) is resistant to this genome-wide reprogramming with potential for
170 transgenerational inheritance (see below).

171 Numerous studies have correlated abnormal sperm DNA modification patterns with
172 male infertility (for review, see Cui et al., 2016), starting with defects in DNA methylation on
173 ICR that are associated with failures in spermatogenesis (Hartmann et al., 2006). In clinic,
174 patients showing overall low DNA methylation or a non-methylated *Igf2/H19* locus present a
175 reduced sperm quality, a decrease in sperm count and mobility when compared to fertile men
176 (Boissonnas et al., 2010; Niemitz and Feinberg, 2004; Zama and Uzumcu, 2010). Other
177 abnormal profiles in DNA methylation on imprinting gene regions such as *Mest* (mesoderm
178 specific transcript) or on spermatogenesis implicated genes such as for example *Dazl* (deleted
179 in azoospermia like) were shown to be associated with oligozoospermia, *i.e.* low sperm
180 concentration (Marques et al., 2008; Poplinski et al., 2010). More recently, it was also reported
181 that modification in 5hmC pattern in sperm is associated with male infertility (Efimova et al.,
182 2017; Wang et al., 2015). In these reports, infertile males were shown to contain higher rate of
183 5hmC than fertile males and infertility correlated with defects in sperm morphology and a high
184 sperm DNA fragmentation rate (Efimova et al., 2017). Several studies have also reported that
185 a link exists between assisted reproductive technologies (ART) and loss of imprinting resulting
186 in an increased incidence of genomic imprinting disorders in children conceived *via* ART.
187 These include Beckwith-Wiedemann syndrome (Chang et al., 2005), Angelman syndrome,
188 Silver-Russel syndrome (Chopra et al., 2010) and retinoblastoma (Marees et al., 2009).

189
190

191 **Sperm chromatin**

192 The eukaryotic genome is compacted into the nucleus via a multi-layer structure, the
193 chromatin. The association of a histone octamer with ~146bp of DNA forms the basal
194 chromatin structure of all somatic cells, the nucleosome. The organization of the sperm
195 chromatin is unique compared to that of other cells, as its basal unit is the nucleoprotamine.
196 During the last phase of spermatogenesis takes place an extensive remodelling of male germ
197 chromatin that results in the replacement of most histones by smaller and more basic proteins
198 than histones, the protamines. This leads to a chromatin structure known as ‘‘doughnut loop’’

199 or “toroid” containing 50 to 100Kb of DNA (depending on the species analysed). This structure
200 is approximately 6-10 times more condensed than a classical somatic nucleosome (Balhorn,
201 2007; Ward and Coffey, 1989, 1991). In mammals, including human, two protamines, Prm1
202 and Prm2 exist. The ratio between the two Prm is 1:1 in human sperm but shows a wide range
203 of variability between species (Corzett et al., 2002). However, the protamine ratio is tightly
204 controlled and an aberrant ratio is associated with male infertility (Aoki et al., 2006; Balhorn
205 et al., 1988). In order to study the structure and composition of the mammalian sperm
206 chromatin, two main approaches have been used: either DNA digestion by endonucleases, such
207 as DNase I or Mnase (Brykczynska et al., 2010; Erkek et al., 2013; Hammoud et al., 2009;
208 Pittoggi et al., 1999; Zalenskaya et al., 2000), or high salt treatments to disrupt proteins-DNA
209 associations coupled to digestion of free DNA typically by using EcoRI and BamHI
210 endonucleases (Arpanahi et al., 2009; Wykes and Krawetz, 2003). Taken together, these studies
211 showed that the sperm DNA is mainly associated with protamines and that only few regions
212 remain associated with histones both canonical and variant ones (Brykczynska et al., 2010;
213 Erkek et al., 2013; Hammoud et al., 2009). From these studies, it was found that about 2%
214 histones persist in the sperm nucleus of mouse, hamster and bull, while in human around 5 to
215 10% of histones remain (Balhorn et al., 1977; Bench et al., 1996; Erkek et al., 2013; Gatewood
216 et al., 1990; Hammoud et al., 2009; Tovich and Oko, 2003). Persisting histones were reported
217 to be organized into solenoid structures within the protamine embedded chromatin and also,
218 associated with linker DNA segments connecting adjacent toroids, a chromatin structure
219 formed by protamines (Noblanc et al., 2013; Sotolongo et al., 2003; Ward, 2010) as
220 schematized in Figure 1.

221
222 Chromatin organization in somatic cells depends on the composition of nucleosomes in
223 histone variants and histone post-translational modifications (PTMs). To date, the most
224 extensively studied histone PTMs are lysine acetylation (which often correlates with
225 nucleosome destabilization and transcriptional activity) and methylation, which depending on
226 the residue can impact on gene expression either by activation or repression. For example,
227 histone H3 trimethylated at lysine 27 (termed H3K27me3) deposited by the histone-lysine N-
228 methyltransferase enzyme EZH2, leads to chromatin compaction and thus to inhibition of
229 transcription. This mark is notably found in the constitutive heterochromatin. In contrast,
230 H3K4me3 (*i.e.* trimethylation at lysine 4 of histone 3) is associated with actively transcribed
231 genes (Barski et al., 2007; for review, see Bernstein et al., 2007). The recent development of
232 mass spectrometry-based analyses of histone PTM has immensely complicated the picture with
233 20 different types of modifications identified to date resulting in several hundred different
234 histone PTMs (for review, see Andrews et al., 2016; Huang et al., 2015). Also, a recent study
235 identified 11 PTMs on protamines both in mouse and human sperm including phosphorylation
236 and acetylation (Brunner et al., 2014). The authors suggested that PTMs of protamines are
237 involved in the process of deposition of protamines in sperm and their eviction after
238 fertilization. These concurred with earlier observations that, phosphorylation of Prm was
239 necessary for its deposition on DNA during spermatogenesis (Dadoune, 2003).

240 Gene expression and chromatin organization in somatic cells is also influenced by
241 nucleosome remodelling *i.e.* histone variants incorporation that have different properties and
242 functions compared to that of canonical histones leading to subtle changes in chromatin
243 organization. The incorporation of histone variants depends on cellular types and cell cycle (for
244 review Talbert and Henikoff, 2017).

245
246 Histone PTMs and histone variants also play a major role in the reorganization of sperm
247 chromatin. First, because they are involved in the extensive chromatin remodelling process that
248 takes place in elongating spermatids and leads to the replacement of histones by protamines.

249 Secondly, because a small portion of histones (~1 to 10% depending on species) is maintained
250 in spermatozoa, and those persisting histones bear PTMs and include non-canonical histones
251 (so called histone ‘variants’). It is worth noting that a majority of histone variants are
252 encountered at one point during spermatogenesis; they are involved in establishing a male germ
253 cell-specific gene expression program and/or in histone-to-protamine chromatin remodeling
254 process (see Table 1). Consequently, deficiency in histone variants is often associated with
255 defective spermatogenesis (see Table 1).

256 Prior to histone eviction, in spermatids, histone variants are incorporated and many
257 histone residues, modified. This leads to nucleosome destabilization and chromatin opening
258 (for reviews, see Hoghoughi et al., 2017; Rathke et al., 2014). Histones are replaced by a
259 transitory structure composed of transition proteins (TPs) that regulate protamine processing
260 and assembly (Goudarzi et al., 2014). Interestingly, one particular spermatid-expressed histone
261 variant H2A.L2 is incorporated along with transition proteins after most histones have been
262 removed, and facilitate nucleoprotamine assembly (Barral et al., 2017). In addition, many
263 modifications of histone residues have been reported to occur prior to histone removal; the most
264 striking and described in the literature being histone H4 hyperacetylation (see Goudarzi et al.,
265 2014). It is the molecular signal recognized by the testis-specific bromodomain protein BRDT
266 which controls the replacement of histones by transition proteins (Gaucher et al., 2012). Other
267 chromatin remodelling proteins and enzymes have been described to be involved in histone to
268 protamine transition. This is the case of CHD5 (Chromodomain helicase DNA binding protein
269 5; Li et al., 2014; Zhuang et al., 2014), CDYL (Chromodomain Y-like transcription
270 corepressor) which acts as a crotonyl-coA-hydratase (Liu et al., 2017), the histone acetyl
271 transferase TIP60 (Dong et al., 2017), the ubiquitin ligase RNF8 (Lu et al., 2010) or PIWI (Gou
272 et al., 2017). In human, low germ cell expression of CHD5 and BRDT is associated with male
273 infertility (Li et al., 2014; Steilmann et al., 2010; Zhuang et al., 2014).

274 Along with histone H4 acetylation at multiple sites, other PTMs occur on histones prior
275 to their turn-over, such as methylation, phosphorylation, crotonylation and ubiquitylation of
276 histone H3 and H2B residues (Brunner et al., 2014; Dottermusch-Heidel et al., 2014a, 2014b;
277 Govin et al., 2010; Hada et al., 2017; Hoghoughi et al., 2017; Lu et al., 2010; Mishra et al.,
278 2015; Pentakota et al., 2014; Rathke et al., 2014; Tan et al., 2011; Wendt and Shilatifard, 2006).
279 Some of them are transmitted to the embryo *via* the persisting histones; their role and effect
280 remain to be determined.

281
282 Finally, chromatin organization and gene regulation also depend on a higher order (3D)
283 chromatin structure, in which megabase-size genomic regions form topologically associated
284 domains (TADs ; Dixon et al., 2012; Sexton et al., 2012). Those domains of higher order
285 chromatin structure are stable during cell differentiation and conserved through evolution
286 (Dixon et al., 2015). They can be partitioned into different compartments [A/B compartments
287 (Lieberman-Aiden et al., 2009)] which present good correlation with active and repressive
288 chromatin regions, as defined by the composition in histone PTMs. Quite surprisingly in view
289 of the different architectures of sperm and somatic cell chromatin, somatic TADs appear to be
290 partially conserved in spermatozoa. High resolution maps nevertheless showed an elevated
291 number of additional long-range intra-chromosomal interactions (>2Mb) many of which
292 occurring between different TADs (inter-TADs), as well as inter chromosomal contacts
293 (Battulin et al., 2015; Jung et al., 2017; Ke et al., 2017). Interestingly, the organization in A/B
294 TADs compartments in sperm correlates with the presence of persisting histones. B
295 compartment are ‘repressive’ domains (genes in B compartments showing lower expression
296 than those in A compartments) that are enriched in persisting histones (Ke et al., 2017), as
297 measured by Micrococcal nuclease (Mnase) digestion assays (see below).

298

299 A burning question related to the sperm epigenome is the location, function and
300 contribution to the embryo of the small portion of histones that persist in spermatozoa. To
301 address this question, several groups have undertaken studies consisting in Mnase digestion of
302 sperm chromatin followed by high throughout sequencing (Brykczynska et al., 2010; Carone et
303 al., 2014; Erkek et al., 2013; Hammoud et al., 2009; Samans et al., 2014), but the answer is not
304 clear to date. While it is clear that the positioning of sperm remaining histones is not random,
305 there is an ongoing debate about the location in the sperm genome of these histones (Arpanahi
306 et al., 2009; Brykczynska et al., 2010; Carone et al., 2014; Erkek et al., 2013; Hammoud et al.,
307 2009, 2011; Noblanc et al., 2013; Royo et al., 2016; Samans et al., 2014). Some studies have
308 shown that persisting histones are enriched at promoters of genes involved in early embryonic
309 development (e.g. transcription factors, *HOX* genes, signalling proteins, etc.), microRNAs
310 clusters, genes subjected to genomic imprinting and binding sites of the chromatin insulator
311 protein CCCTC-binding factor (CTCF; Arpanahi et al., 2009; Hammoud et al., 2009). Besides,
312 nucleosomes were also found to be preferentially retained at hypomethylated DNA sequences
313 enriched in CpG (Erkek et al., 2013; Hammoud et al., 2011). When focusing on histone PTMs,
314 those groups observed enrichment of H3K4me2/3 and H3K27me3 bivalent marks at promoters
315 of developmental genes, while H3K4me2/3 alone was found at the promoter of genes with a
316 role in spermatogenesis and H3K27me3 alone marks promoters of genes repressed during
317 gametogenesis and early embryo development (Brykczynska et al., 2010; Hammoud et al.,
318 2009). Similarly, histone variant TH2B was found in gene promoters involved in sperm
319 maturation, fertilization and capacitation (Montellier et al., 2013) while H2A.Z was detected at
320 peri-centromeric regions (Greaves et al., 2006; Hammoud et al., 2009). All these data strongly
321 would suggest that the organization of the paternal genome influences early embryonic
322 development (also see below). Other reports have, however, found that persisting histones are
323 associated with intergenic sequences outside of gene regulatory regions (Carone et al., 2014;
324 Kocer et al., 2015; Samans et al., 2014). Carone et al. (2014) reported that nucleosomes are
325 mainly distributed in gene-poor regions in the mouse sperm, and that a subcategory of
326 nucleosomes is retained at CTCF binding sites (Carone et al., 2014). Samans et al., showed
327 nucleosome enrichment within distal intergenic regions and introns as well as with centromere
328 repeats and retrotransposons including LINE1 and SINEs, (Samans et al., 2014). But the
329 computational approach used in this study was contested as it appeared to induce a bias towards
330 repetitive elements (Royo et al., 2016). These rather conflicting data may be also partly
331 explained by the different protocols that were used in order to recover histone-bound sperm
332 DNA domains (Kocer et al., 2015). In fine, to date, there is no strong consensus as to which
333 specific DNA sequences in sperm are associated with nucleosomes.

334

335 **Sperm non-coding RNA**

336 Another category of epigenetic regulators of gene expression is the vast and
337 heterogeneous family of non-coding RNAs (ncRNA). They can be grouped according to their
338 size in long or small non-coding RNA. In this review, we will focus on small non-coding RNA
339 (sncRNA) as they are the most described in male germ cells. In spermatozoa, sncRNA could
340 be the basis of epigenetic information transmitted to the embryo as they enter the oocyte upon
341 fertilization. At the end of spermatogenesis, most of the cytoplasm and RNA content of
342 spermatozoa are ejected. Only a limited number of RNA molecules remain and they have been
343 the focus of several studies. In addition to mRNA fragments, several small non-coding RNA
344 (sncRNA) were shown to be present in sperm (Kramer and Krawetz, 1997; Krawetz et al., 2011;
345 Miller et al., 2005; Ostermeier et al., 2004; Rassoulzadegan et al., 2006; Wykes et al., 1997,
346 2000; Yuan et al., 2016). The main classes of sncRNA found in sperm were miRNA, endo-
347 siRNA and piRNA, the most abundant being piRNA (associated with repeated sequences ;
348 (Hutcheon et al., 2017; Krawetz et al., 2011; Pantano et al., 2015). MicroRNA (miRNA) and

349 endogenous small interfering RNA (endo-siRNA) are sncRNA of about 20-24 nucleotides.
350 They are synthesized in the nucleus and they matured in the cytoplasm compartment. They
351 are catalysed by enzymes of the RNA interference machinery including DROSHA and DICER
352 (Subramanyam and Belloch, 2011; Yang and Lai, 2011) and participate to the RNA-induced
353 silencing complex (RISC) involved in gene silencing (for review, see Holoch and Moazed,
354 2015; Martinez et al., 2002). Piwi-interacting RNA (termed piRNA) are another significant part
355 of the sncRNA found in spermatozoa. They are DICER-independent and are 26-31 nucleotides
356 long. As their name implies, piRNA interact with PIWI family proteins MIWI, MIWI2 and
357 MILI (Malone and Hannon, 2009). piRNA are germ cell specific and comprise two subgroups
358 according to their expression stage arbitrarily separated into pre-pachytene piRNA and
359 pachytene piRNA (for review Luo et al., 2016). These piRNA are derived from repeated
360 sequences and act on the silencing and DNA methylation of transposable elements (Aravin et
361 al., 2007; Carmell et al., 2007; Deng and Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa et al., 2004, 2008;
362 Luo et al., 2016). Recent studies provide evidences that beside the spermatogenetic importance
363 of sncRNA, there is a post-testicular transfer of sncRNA to sperm in maturation. It was shown
364 that epididymosomes, a heterogeneous population of small membrane bound vesicles that are
365 released from the epididymal epithelium (for review, see Sullivan and Saez, 2013) bring to
366 transiting sperm cell a load of sncRNA (Reilly et al., 2016; Sharma et al., 2016). In line with
367 these works, Dixon's group published recently that the content of sncRNA spermatozoa
368 changed during the post-testicular maturation which take place in the epididymis tissue. The
369 authors show that microRNAs (miRNAs) are highly represented in the spermatozoa of the
370 proximal epididymis and is largely decreased during the epididymal transit, inversely the
371 piRNA are enriched in the mature spermatozoa collected from cauda epididymis. These results
372 demonstrate the complexity and dynamic nature of sncRNA profile of spermatozoa (Hutcheon
373 et al., 2017; Pantano et al., 2015). To add to this complexity, a recent study, in which the
374 miRNA profile of spermatozoa was investigated at the single cell level, suggests that
375 spermatozoa from the same individual have different miRNA contents (Yu et al., 2017). Future
376 studies are needed to shed light on the role of these post-testicular transferred sncRNA
377 especially in the way they might influence embryo development, therefore contributing to
378 another level of paternal inheritance (Figure 1).

379

380 **Contribution of the sperm epigenome to the embryo**

381 *Paternal pronucleus*

382 As described above, the paternal nucleus is tightly compacted due to protamines. Upon
383 fertilization, it will be remodelled via the replacement of protamines with maternally derived
384 histones (McLay and Clarke, 2003). The decondensed paternal DNA will then expand to
385 approximately three times the size of the mature sperm nucleus, resulting in the formation of
386 the paternal pronucleus, compatible with DNA replication and the fusion of the maternal and
387 paternal pronuclei. Its timing has been placed by many studies within the first hours after
388 fertilization depending on the species concerned (Nonchev and Tsanev, 1990). In studies on
389 human sperm, protamine removal was observed to be completed in the hour following
390 intracytoplasmic sperm injection (ICSI; Jones et al., 2011). In studies in which porcine sperm
391 was used for *in vitro* fertilization (IVF), it was shown that 80% of the protamines were removed
392 within 3h post-fertilization (Shimada et al., 2000). On a mechanistic side sperm nucleus
393 protamine removal, was shown to rely on an antioxidant activity mediated by maternal
394 glutathione allowing for the reduction of disulfide bonds between protamines thus facilitating
395 the paternal chromatin decondensation (Perreault et al., 1988), Figure 2.

396

397 Considering the fact that the sperm nucleus brings along persisting histones (canonical and
398 variants) and associated PTMs, the question about the contribution of those persisting histones

399 to the embryo was asked (*i.e.* are they replaced by maternal histones or not?). Of course, in
400 view of the ongoing debate regarding the genomic location of sperm histones, their contribution
401 and functional role in the embryo cannot be fully understood. Most data regarding the location
402 of sperm histones after fecundation are based on immunodetection. It was reported that some
403 sperm persisting histones variants are removed after fertilization. For example, H2AL1/2
404 rapidly disappear after fertilisation in the mouse (Wu et al., 2008): First detected in the
405 centromeres of spermatids, these variants remain enriched in heterochromatin domains until
406 displaced from paternal DNA shortly after fertilization (Wu et al., 2008). In contrast, histone
407 H3 replication-dependent variants H3.1 and H3.2 (Tagami et al., 2004) were detected in the
408 male pronucleus after fertilization and prior to DNA synthesis, though in a much lower
409 abundance than in maternal chromatin (Hajkova et al., 2010; van der Heijden et al., 2005, 2008).
410 These sperm-derived proteins are detected until the zygotic S phase initiates, at which point
411 they become indistinguishable from their newly incorporated maternal counterparts (van der
412 Heijden et al., 2008). H3.3 plays an essential role during zygotic S-phase in the transcription of
413 peri-centromeric domains that trigger their silencing following the first cell cycle by acquisition
414 of H3K27 methylation in the male pronucleus (Santenard et al., 2010). Four hours after
415 fertilization, the newly formed male pronucleus appears to carry only nucleosomes containing
416 H3.3, while the female pronucleus exists in a relatively zero-H3.3 state (Akiyama et al., 2011;
417 Santenard et al., 2010). Moreover, after fertilization, the embryo has to rearrange paternal
418 pronucleus heterochromatin and euchromatin regions to form a functional embryonic genome
419 (Probst et al., 2010; van de Werken et al., 2014). The pathway involved in this process is
420 completely different between human and mouse embryos. In the human embryo, constitutive
421 heterochromatin (cHC) of paternal pronucleus is established by the H3K9/HP1 maternal
422 chromatin modifiers which recognize the canonical cHC (H3K9me3 and H4K20me3) carried
423 by paternal genome. Whereas in the mouse embryo, the sperm paternal heterochromatin is
424 devoid of canonical heterochromatin marks and is mainly established by PRC1/2 protein
425 complexes (Casanova et al., 2013; van der Heijden et al., 2006; Probst et al., 2010; van de
426 Werken et al., 2014).

427 Paternally-derived modified histones also seem to play a critical role in establishing a totipotent
428 embryo. For a correct development, the paternal pronucleus is hyperacetylated shortly after
429 fertilization with acetylation of lysines 5 and 16 of H4 and lysines 9, 14, 18, and 27 of histone
430 H3 (Adenot et al., 1997; Santenard et al., 2010).

431 Beside remaining histones and protamines, the sperm nucleus contain MAR that allow the
432 formation of the male pronucleus and the replication of the zygote DNA following fertilization
433 (Linnemann et al., 2009). Indeed, intracytoplasmic injection of sperm-DNA alone without
434 MAR into oocyte or co-injected with an isolated sperm nuclear matrix does not allow the
435 formation of the male pronucleus or its replication. While injection of sperm nuclear matrix
436 only associated with short DNA fragments at the base of the toroids (so DNA fragments
437 associated with sperm MAR) allows the formation of the male pronucleus and DNA replication,
438 despite sperm DNA degradation ranging from 20 to 50% (Shaman et al., 2007a, 2007b).

439
440

441 ***Paternal DNA demethylation/methylation***

442 Before the fusion of the two pronuclei, a demethylation step takes place. In the female
443 pronucleus, passive DNA demethylation occurs during replication, while in the male
444 pronucleus, DNA demethylation is active. The removal of the majority of 5mC in both genomes
445 is crucial to establish the pluripotency of the inner cell mass of the blastocyst. DNA inherited
446 from the father is rapidly demethylated before DNA replication (Mayer et al., 2000; Oswald et
447 al., 2000; Santos et al., 2002). Traditionally, it is assumed that the maternal genome only
448 undergoes passive, replication-dependent DNA demethylation, although new evidence have

449 weaken this assumption (Guo et al., 2014; Shen et al., 2014). On the contrary, the active paternal
450 DNA demethylation step involves Tet enzymes, including Tet3, and the successive formation
451 of 5hmC, 5caC and 5fC (Tahiliani et al., 2009). Tet3 is predominantly located in the male
452 pronucleus and results in an important accumulation of the 5hmC mark in the male pronucleus
453 (Amouroux et al., 2016; Gu et al., 2011; Iqbal et al., 2011). In the mouse, paternal DNA
454 demethylation is complete within 4h after fertilization while in rat and bovine methylation
455 erasure is accomplished by 10h post-IVF (Abdalla et al., 2009; Mayer et al., 2000; Santos et
456 al., 2002). Identical to the protamine replacement phenomenon, paternal DNA demethylation
457 is complete before pronuclei fusion. In zygotes deficient for *Tet3*, 5mC level remains constant
458 on the paternal genome leading to a delay in the activation of paternal allele of genes essential
459 for embryonic development, such as *Nanog* and *Oct4*. Interestingly, it is the maternally derived
460 Tet3 enzyme which is responsible for the conversion of 5mC to 5hmC in the paternal genome
461 (Gu et al., 2011). A combined deficiency of *Tet1* and *Tet3* results in an increase in the 5mC
462 mark and a loss of 5hmC at the eight-cell stage. In addition, these embryos show a decrease in
463 the expression of genes involved in the biosynthesis of cholesterol ; the few embryos that
464 survived showed signs of a holoprosencephaly associated with neurological disorders (Kang et
465 al., 2015).

466
467 The different methylated-cytosine derivatives (5hmC, 5fC and 5caC) are ultimately
468 transformed into non-methylated cytosine by the DNA repair pathway TDG-BER (standing for
469 thymidine DNA glycosylase-base excision repair) that is independent of replication (Kohli and
470 Zhang, 2013; Figure 2). TDG enzymes recognize only the 5fC and 5caC forms whereas 5hmC
471 undergoes a deamination in 5hmU by the intervention of cytosine deaminase AID/APOBEC
472 (Xue et al., 2016; Zhang et al., 2012). An abasic site is thus generated bringing in the players
473 of the BER repair pathways including APE1 and XRCC1 (Weber et al., 2016). XRCC1 is
474 located on the male pronucleus but absent from the female pronucleus (Hajkova et al., 2010;
475 Wossidlo et al., 2010). In addition, the DNA methyltransferase DNMT1 is excluded from the
476 nucleus of preimplantation embryos (Hirasawa et al., 2008; Howell et al., 2001), thus inducing
477 the absence of re-methylation of the DNA immediately after fertilization.

478
479 Importantly, some regions of the paternal sperm nucleus will escape demethylation after
480 fertilization, that is the case of some categories of transposable elements (IAP) and imprinted
481 genes (Lane et al., 2003). Recently, studies have shown that a few single copy genes (which are
482 not imprinted) also escape the demethylation wave (Hackett et al., 2013; Tang et al., 2015).

483
484 To explain the absence of active DNA demethylation in specific regions of the male pronucleus
485 a mechanism has been evoked. It involves the Stella protein (also known as PGC7 or DPPA3)
486 initially identified in the PGC. It is assumed that Stella protects from DNA demethylation, at
487 particular paternal imprinted loci (such as *Rasgfr1*) by preventing the binding of the Tet3
488 protein and maintaining the presence of the histone methylation mark H3K9me2 (Bian and Yu,
489 2014; Nakamura et al., 2007, 2012). Interestingly, the persisting histone repressive marks are
490 associated with imprinting repression such as H3K27me3, H3K9me3 and H4K20me3
491 (McEwen and Ferguson-Smith, 2010). Invalidation of the Stella protein leads to an arrest in
492 embryo development associated with a loss of 5mC both in male and female pronuclei
493 (Nakamura et al., 2007). Two other proteins have been identified to protect ICR from
494 demethylation: *Zfp57*, a zinc finger protein of the KRAB family and *Trim28*. The interaction
495 of these two proteins, which specifically target ICR, induces the recruitment of repressor
496 complexes such as NuRD (Nucleosome Remodelling Deacetylase), *Setdb1* (a histone
497 methyltransferase) and DNMTs (Quenneville et al., 2011; Zuo et al., 2012). The loss of *Trim28*
498 is embryonic lethal due in part to defects in the expression of imprinted genes (Messerschmidt

499 et al., 2012) while the loss of *Setdb1* leads to a de-repression of retrotransposons and an increase
500 in DNA double strand breaks (Kim et al., 2016).

501

502 ***Paternally derived RNA***

503 Since the discovery of sperm mRNA and non-coding RNA transmission to the
504 embryo after fertilization, studies were conducted to determine the impact(s) and role(s) of
505 these RNAs in embryonic development (Jodar et al., 2013; Kramer and Krawetz, 1997; Miller
506 et al., 2005; Ostermeier et al., 2004). Regarding the sperm mRNA cargo, it was estimated that
507 approximately 18,000 mRNA are delivered to the embryo (Ostermeier et al., 2004). The same
508 group identified six of these sperm mRNA (mRNA for *clusterin*, *AKAP4*, *Prm2*, *Cdh13*,
509 *Foxg1b* and *Wnt5a*) and suspected them to participate to paternal pronucleus formation and to
510 control the events of early embryo development. Regarding sperm-borne non-coding small
511 RNA, studies have shown their impact in preimplantation embryo development. A striking
512 example is that of miR-34c, a male germ line-specific miRNA that transmitted to the embryo.
513 Mir-34c was demonstrated to have a key role in the first division of the mouse embryo, as
514 injection of a miR-34c inhibitor into zygotes was shown to induce an arrest in embryo cell
515 division (Liu et al., 2012). This results from the inhibiting role of miR-34c on *Bcl2* (or B-cell
516 leukemia/lymphoma 2) gene expression and on its anti-proliferative function.

517 It is worth noting that several studies have shown a link between DNA methylation and non-
518 coding RNA. *Dnmt3A and 3B* mRNA expression was shown to be negatively regulated by miR-
519 29b in mouse early embryos and alterations of miR-29b activity was shown to change the DNA
520 methylation level in mouse preimplantation embryos leading to developmental arrest at the
521 morula stage (Zhang et al., 2015). In another study, when oocytes were fertilized using sperm
522 derived from mice invalidated for DICER or DROSHA, thus showing defective miRNAs/endo-
523 siRNAs biogenesis, a deregulation in the expression of the embryo preimplantation genes was
524 seen (Yuan et al., 2016). Interestingly, the phenotype of these embryos could be saved by
525 injecting a pool of sperm RNA from WT mice (Yuan et al., 2016).

526 Altogether these studies show the importance of all the facets of sperm epigenome not
527 only for sperm quality and fertilization abilities but also for subsequent embryo development.
528 In addition, recent studies suggest that the sperm epigenome could go beyond that, and have an
529 impact on several generations.

530 **Transgenerational effects of the paternal epigenome**

531 Recent studies in animal models together with epidemiological data have suggested that
532 epigenetic factors are responsible for the transmission of pathologies across generations. This
533 phenomenon was called epigenetic inheritance or transgenerational epigenetic inheritance.
534 Epigenetic inheritance involves the transmission of non-DNA base sequence information to the
535 offspring over multiple generations *via* the germline. Epigenetic inheritance occurred from
536 exposure of the parental (the so-called F0 generation) to multiple environmental insults
537 including nutritional stress, psychological stress, toxins and drugs exposure. Beside
538 environmental origins, epigenetic inheritance might come from parents carrying mutations in
539 epigenetic regulators (such as enzymes involved in the establishment of DNA methylation or
540 chromatin modifications, *etc.*; Chen et al., 2016; Sharma et al., 2016). Both paternal and
541 maternal gametes have been shown to transmit epigenetic information to the next generation
542 (*i.e.* intergenerational transmission; Huypens et al., 2016). If epigenetic inheritance effects due
543 to the mother lifestyle or/and environmental exposures particularly during oogenesis and during
544 pregnancy, have been widely studied and are now well established, only recently has it become
545 apparent that paternal epigenetics effects may also greatly influence offspring health (Blake
546 and Watson, 2016). This part of the review aims at summarizing recent progresses made on

547 paternal epigenetic inheritance and how environmental factors and paternal lifestyle can alter
548 the paternal epigenetic information, in particular its DNA methylation/modification.

549

550 *Paternal experiences transmitted to the future generation via sperm epigenome*

551 *Examples of sperm epigenome modifications and consequences on the offspring*

552 Several research groups using rodent models have recently shown that feeding male
553 mice with unbalanced diets (either a low protein diet, a high-fat diet or a Folate-deficient diet)
554 resulted in the appearance of metabolic disorders in the offspring that were directly linked to
555 changes in sperm epigenetics (Carone et al., 2010; de Castro Barbosa et al., 2016; Fullston et
556 al., 2013; Mejos et al., 2013; Ng et al., 2010; Wei et al., 2014a). The detected epigenetic
557 alterations in the offspring concerned changes in DNA methylation at regulatory regions of
558 genes involved in metabolic processes such as glucose–insulin homeostasis, cholesterol
559 biosynthesis (Carone et al., 2010; Fullston et al., 2013; Ng et al., 2010).

560 For example, Ng et al. (2010) reported that feeding male mice with a high-fat diet promoted in
561 the female offspring a state of impaired glucose-insulin homeostasis. This was evidenced by
562 alterations in the female offspring transcriptome of retroperitoneal adipose and pancreatic islet
563 tissues. Changes in the methylation status of the female offspring *Ill3ra2* gene that is part of
564 the Jak–Stat signalling pathway was also detected in that model (Ng et al., 2010, 2014). In
565 another study, it was reported that male mice consuming a low-protein diet produced offspring
566 with increased level of cytosine methylation in *trans*-acting regulatory sequences of key genes
567 involved in lipid and cholesterol biosynthetic pathways such as *Ppara* (Carone et al., 2010).
568 These changes were correlated with the down-regulation of the expression of the corresponding
569 genes in the offspring (Carone et al., 2010). Interestingly, in that particular model, the authors
570 did not show any significant change in cytosine methylation at classical imprinted loci in the
571 offspring. In addition, the global cytosine methylation profile of the paternal sperm was not
572 significantly different between male mice that were fed or not fed the diet. This suggested that
573 paternal sperm DNA methylation modifications were probably not at the origin of the
574 phenotypical trait recorded in the offspring in that particular model.

575 In different models, it was however shown that a diet-induced stress indeed provokes changes
576 in the DNA methylation profile of the father’s sperm cells (Fullston et al., 2013). In particular,
577 Wei et al. (2014) reported that a situation of diet-induced paternal prediabetes modifies the
578 sperm methylation status of several genes such as the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase
579 subunits *Pik3ca* and *Pik3r1* of the insulin pathway. It was proposed that these altered sperm
580 methylation profiles were at the origin of the metabolic disorders recorded in the next
581 generations (Wei et al., 2014b).

582 In humans, the association between a paternal condition and epigenetic changes in their children
583 has been described in many instances. For example, Soubry et al. explored putative correlations
584 between paternal obesity and children epigenetic profiles (Soubry et al., 2013, 2015). They
585 reported that children of obese fathers showed hypomethylation at differentially methylated
586 regions (so-called DMRs) of several imprinted genes such as *Mest* and *Peg3*. Interestingly, a
587 deregulation of the methylation status of these DMRs were reported elsewhere to be linked with
588 the occurrence of chronic diseases and metabolic disorders in the offspring (Jirtle and Skinner,
589 2007; Murphy and Jirtle, 2003).

590

591 Since changes in the methylation status of the paternal genome were not always observed, other
592 causative factors of paternal epigenetic inheritance have been suspected and looked for.
593 Changes in chromatin packaging *via* sperm nuclear protein modifications and non-coding RNA
594 content were brought forward and explored. As discussed above, sperm chromatin is mainly
595 made of protamines which will be expelled shortly after fertilization; the so-called persisting
596 histones, despite its limited amount, has therefore the most potential for a contribution to the

597 next generation(s). Any modification of these persisting sperm histones may also be considered
598 as part of the epigenetic information received by the future embryo. Very few studies have
599 succeeded to establish a relation between sperm histone changes and transgenerational defects.
600 In one particular study, Vassoler *et al.*, (2013) showed that the administration of cocaine to
601 male rats resulted in an increased level of brain-derived neurotrophic factor protein (BDNF) in
602 the prefrontal cortex of their sons. This was shown to be associated with an increased level of
603 acetylated histone H3 within the *Bdnf* promoter in the medial prefrontal cortex (Vassoler *et al.*,
604 2013). This epigenetic modification was also found in the promoter of the *Bdnf* gene in the
605 paternal sperm. Although interesting, these results are not sufficient to ascertain a
606 transgenerational effect related to sperm histone modification because they did not show effect
607 across several generations.

608 A more convincing association was shown *via* the use of a mutant mice for a protein involved
609 in chromatin modification. In that model, mice overexpress a human version of histone H3
610 lysine 4 (H3K4) demethylase KDM1A during spermatogenesis. Spermatozoa of these mice
611 showed reduced H3K4 dimethylation within CpG islands of genes implicated in development.
612 In their progeny were observed severely impaired embryonic development and reduced survival
613 rates across three generations (Siklenka *et al.*, 2015). However, KDM1A was not found
614 expressed in the germline of subsequent generations, the transgenerational defects were
615 therefore unlikely to result from transmitted modifications of sperm histone PTM. Since no
616 changes in DNA methylation were observed at CpG islands, the authors hypothesized that the
617 transgenerational inheritance was mediated by sperm-borne RNA (Siklenka *et al.*, 2015).

618 Several studies investigated specifically the role of small non-coding RNAs (sncRNAs) in
619 transgenerational inheritance because they are long known to be present in the germ cell lineage
620 and their involvement in the regulation of DNA methylation and histone modifications is well
621 documented (Holoach and Moazed, 2015). Those studies found that sperm-derived ncRNAs,
622 including miRNA and small tRNA derived from tRNAs, have the potential to influence
623 embryonic development (see above) and lead to transgenerational inheritance (Chen *et al.*,
624 2016; Holoach and Moazed, 2015; Sharma *et al.*, 2016). For example, a nutritional stress in
625 rodents such as a high fat diet can modify the sperm miRNA content which constitutes potential
626 epigenetic signals. These signals will drive offspring health and will initiate the transmission
627 of metabolic abnormalities in future generations (Fullston *et al.*, 2013). In 2016, two
628 independent studies showed that a high-fat or a low-protein diet given to male mice was
629 associated with increased levels of fragmented transfer RNAs species (small tRNA) in sperm
630 that were subsequently associated with metabolic disease in their offspring (Chen *et al.*, 2016;
631 Sharma *et al.*, 2016). To attest that sperm small tRNA generated by the diets were indeed at the
632 origin of the inherited offspring phenotypes, both research groups microinjected these diet-
633 induced small tRNA into control oocytes fertilized with sperm issued from males not subjected
634 to the regimens. Interestingly, offspring obtained from these injected oocytes showed the same
635 metabolic abnormalities (increased occurrence of metabolic disorders). When the origin of
636 these t-derived RNAs was questioned, it appeared that they were likely to come from the
637 epididymal epithelium by mean of lipid-rich secreted vesicles called epididymosomes or
638 exosomes (Reilly *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016).

639 These 2016 studies confirmed an earlier report showing that male mice fed a western diet (high
640 fat and high sugar diet) exhibited an altered sperm miRNA profile associated with an increase
641 in metabolic disorders in their offspring (Grandjean *et al.*, 2015). The microinjection of one of
642 these differentially represented miRNAs, namely miR19, into fertilized eggs resulted in the
643 appearance of similar phenotypes in the developed embryos (Grandjean *et al.*, 2015).

644 Changes in sperm ncRNA content following an environmental stress is not limited to metabolic
645 stresses since Gapp *et al.* (2014) reported that a traumatic stress such as maternal separation in
646 early life was associated with behavioural and metabolic conditions in the progeny (Gapp *et al.*,

647 2014). Here too, sperm miRNAs were shown to be involved since micro-injection of sperm
648 miRNAs collected from traumatized males into fertilized oocytes led to similar phenotypes.

649 Altogether, these studies showed that the sperm epigenome in particular its DNA
650 methylation profile or/and its ncRNA content has the potential to alter the health of the next
651 generations.

652

653 **Conclusions and future prospects**

654

655 The sperm epigenome, established during spermatogenesis in the testis, is highly specialized
656 and unique. The studies mentioned in the present review demonstrate that sperm is more than
657 a vehicle transferring its haploid genome to the oocyte. DNA modifications, chromatin proteins
658 and associated marks as well as sperm-derived RNA (in particular sncRNA) constitute a
659 specific epigenetic landscape, shown, in case of disruption, to result in male infertility,
660 abnormal embryo development and/or transgenerational inheritance. Future studies will have
661 to elucidate and clarify the role and underlying mechanisms of sperm epigenetics in those
662 processes, in particular its impact on the offspring health. If one takes into account the
663 additional effects due to variations in the oocyte epigenome, predicting the risk of diseases in
664 the offspring associated with germ cell epigenome alterations will certainly be a rather complex
665 issue.

666

667 **Authors contributions**

668 AC, JC, JHB and AK drafted the manuscript. JRD critically reviewed the manuscript.

669 **Acknowledgements**

670 Due to space constraints, we could not include all the relevant citations on the subject matter,
671 for which we apologize. State grants from the University of Clermont-(UCA), INSERM, CNRS
672 and former “Région Auvergne” support the activities of the research team headed by Professor.
673 Joël R. Drevet. This work was also supported by INSERM and ANR-12-JSV2-0005-01 to Julie
674 Cocquet.

675 **Figure Legends**

676

677 **Figure 1: The sperm epigenome**

678 During spermatogenesis, most histones are replaced by protamines (PRM). However, few
679 histones remain in chromosomal domains called « solenoid » as well as in the short DNA
680 segments connecting two adjacent toroids which are also attached to the sperm nuclear matrix
681 (Matrix Attachment Regions = MAR, red bar). The sperm DNA is thus mainly packaged into
682 toroids (protamine rich regions) and, for a minor proportion, into solenoids (histone rich
683 regions) overall allowing a great condensation of the chromatin. This condensed state of the
684 sperm nucleus is further enhanced during epididymal maturation *via* intra- and inter-protamine
685 disulfide bonds.

686

687 The sperm nucleus also harbours epigenetic marks at various levels: for example, on the sperm
688 DNA there are complex methylation profiles with regions rich in 5-methylcytosine (5mC) as
689 well as in 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). At the level of the sperm chromatin, persisting
690 histones are concerned by a vast array of post-translational modifications (PTM). Finally, a
691 third epigenetic information is associated with the sperm cell it is represented by a complex
692 pool of RNA (mRNA and several classes of non-coding RNA). This RNA-mediated epigenetic
693 information is acquired both during spermatogenesis and the post-testicular maturation
694 processes (*i.e.*: during epididymal transit; black arrow) with non-coding RNA being transferred

695 from the epididymal epithelium towards sperm cell *via* lipid-rich exosomes named,
696 epididymosomes.

697 C: cytosine; G: guanine; SH: thiol group; S-S: disulfide bridge

698

699 **Figure 2: Dynamics of epigenome reprogramming of the male pronucleus**

700 After fertilization, in one cell embryo, the sperm nucleus undergoes many remodelling events.
701 First, protamines are replaced by maternally-derived histones. In addition, in some areas of the
702 sperm nucleus where persisting histones remain, some will be replaced by canonical or other
703 variants. Furthermore, the majority of 5-methylcytosine residues (5mC) will be erased by two
704 processes: a TET-TDG-BER repair process that will introduce non-methylated cytosines (C) or
705 the AID/APOBEC/BER pathway that will change mC in thymine (T) then will repair the T-G
706 mismatches in non-methylated cytosines. Some regions will be protected from DNA
707 demethylation including repeats elements, transposons, and imprinting control regions (ICR)
708 thanks to the presence of the Stella protein and H3K9me2 histone modification.

709 AID/APOBEC: cytidine deaminase; APE: Apurinic/Apyrimidic endonuclease; BER: Base
710 excision repair; C: cytosine; G: guanine; GSH: Glutathione; 5m: 5-methylcytosine; 5hm: 5-
711 hydroxymethylcytosine; 5f: 5-formylcytosine; 5-caC: 5-carboxycytosine; Lig: Ligase; MAR:
712 matrix attachment region; Pol: Polymerase; Prm: Protamine; PTM: post-translational
713 modifications; S-S: disulfide bridge, TDG: Thymine DNA glycosylase; TET: Ten eleven
714 translocation; XRCC1: X-ray repair cross-complementing protein 1

715

716 **Figure 3: Paternal epigenetic transmission to subsequent generations.**

717 Environmental exposures of male mice (F0) can modify the sperm epigenome. Epigenetic
718 information about these exposures can be transmitted to the next F1 generation and also to the
719 F2 generation or more F3. The offspring of subsequent generations can be subject to
720 transgenerational phenotypes.

721

722 **Table 1: Variant histones in mammalian sperm nucleus**

723 Beside the names (acronyms and extended names) of the histone variants found in the mouse
724 sperm nucleus, the table reports the effects recorded when the corresponding gene was
725 knocked-out or not functional.

726 TP: Transition Proteins, Prm (Barral et al., 2017; Govin et al., 2007) (Szenker et al., 2011; Yuen
727 et al., 2014)(Govin et al., 2004; Ueda et al., 2017)(Schenk et al., 2011)(Palmer et al., 1991):
728 Protamine

729

730 **Figures References**

731 (Drabent et al., 2003)(Martianov et al., 2005)(Tanaka et al., 2005)(Yan et al., 2003)(Jedrzejczak
732 et al., 2007)(Blanco-Rodríguez, 2009; Celeste et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2003;
733 Turinetto and Giachino, 2015)(Greaves et al., 2007; Meneghini et al., 2003; Sharma et al., 2013;
734 Suto et al., 2000; Xu et al., 2012)(Pehrson et al., 2014)(Trostle-Weige et al., 1982)(Montellier
735 et al., 2013; Shinagawa et al., 2015)(Conrad et al., 2005; Johnston et al., 2005; Noblanc et al.,
736 2012)(Pehrson and Fried, 1992)

737

738

739

740

741

742

743

744

745 **References**

746

747 Abdalla, H., Yoshizawa, Y., and Hochi, S. (2009). Active demethylation of paternal genome in
748 mammalian zygotes. *J. Reprod. Dev.* 55, 356–360.

749 Adenot, P.G., Mercier, Y., Renard, J.P., and Thompson, E.M. (1997). Differential H4
750 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential
751 transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Dev. Camb. Engl.* 124, 4615–
752 4625.

753 Akiyama, T., Suzuki, O., Matsuda, J., and Aoki, F. (2011). Dynamic replacement of histone H3
754 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.* 7, e1002279.

755 Amouroux, R., Nashun, B., Shirane, K., Nakagawa, S., Hill, P.W., D’Souza, Z., Nakayama,
756 M., Matsuda, M., Turp, A., Ndjetehe, E., et al. (2016). De novo DNA methylation drives 5hmC
757 accumulation in mouse zygotes. *Nat. Cell Biol.* 18, 225–233.

758 Andrews, F.H., Strahl, B.D., and Kutateladze, T.G. (2016). Insights into newly discovered
759 marks and readers of epigenetic information. *Nat. Chem. Biol.* 12, 662–668.

760 Aoki, V.W., Liu, L., Jones, K.P., Hatasaka, H.H., Gibson, M., Peterson, C.M., and Carrell, D.T.
761 (2006). Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates
762 and predictive of fertilization ability. *Fertil. Steril.* 86, 1408–1415.

763 Aravin, A.A., Hannon, G.J., and Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an
764 adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318, 761–764.

765 Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M.,
766 Steger, K., Tedder, P., and Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human
767 spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences.
768 *Genome Res.* 19, 1338–1349.

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

770 Balhorn, R., Gledhill, B.L., and Wyrobek, A.J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins:
771 quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry (Mosc.)* 16, 4074–4080.

772 Balhorn, R., Reed, S., and Tanphaichitr, N. (1988). Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in
773 sperm of infertile human males. *Experientia* 44, 52–55.

774 Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., and
775 Bourc’his, D. (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from
776 transposon activity. *Science* 354, 909–912.

777 Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M.,
778 Charbonnier, G., Couté, Y., Puthier, D., Buchou, T., et al. (2017). Histone Variant H2A.L.2
779 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol. Cell* 66,
780 89–101.e8.

781 Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I.,
782 and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome.
783 *Cell* 129, 823–837.

784 Battulin, N., Fishman, V.S., Mazur, A.M., Pomaznoy, M., Khabarova, A.A., Afonnikov, D.A.,
785 Prokhortchouk, E.B., and Serov, O.L. (2015). Comparison of the three-dimensional
786 organization of sperm and fibroblast genomes using the Hi-C approach. *Genome Biol.* *16*, 77.

787 Bench, G.S., Friz, A.M., Corzett, M.H., Morse, D.H., and Balhorn, R. (1996). DNA and total
788 protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* *23*, 263–
789 271.

790 Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* *128*,
791 669–681.

792 Bestor, T. (1988a). Structure of mammalian DNA methyltransferase as deduced from the
793 inferred amino acid sequence and direct studies of the protein. *Biochem. Soc. Trans.* *16*, 944–
794 947.

795 Bestor, T.H. (1988b). Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* *74*, 9–12.

796 Bian, C., and Yu, X. (2014). PGC7 suppresses TET3 for protecting DNA methylation. *Nucleic
797 Acids Res.* *42*, 2893–2905.

798 Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* *16*, 6–21.

799 Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* *321*, 209–
800 213.

801 Blake, G.E., and Watson, E.D. (2016). Unravelling the complex mechanisms of
802 transgenerational epigenetic inheritance. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *33*, 101–107.

803 Blanco-Rodríguez, J. (2009). gammaH2AX marks the main events of the spermatogenic
804 process. *Microsc. Res. Tech.* *72*, 823–832.

805 Bogdanović, O., and Veenstra, G.J.C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding
806 proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* *118*, 549–565.

807 Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J.M., Gut, I., Vaiman,
808 D., Jouannet, P., Tost, J., and Jammes, H. (2010). Specific epigenetic alterations of IGF2-H19
809 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *18*, 73–80.

810 Bourc’his, D., and Bestor, T.H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in
811 male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* *431*, 96–99.

812 Brunner, A.M., Nanni, P., and Mansuy, I.M. (2014). Epigenetic marking of sperm by post-
813 translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* *7*, 2.

814 Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C.,
815 Schübeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2010). Repressive and active histone
816 methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
817 *17*, 679–687.

818 Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc’his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G.,
819 and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons
820 in the mouse male germline. *Dev. Cell* *12*, 503–514.

821 Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H.,
822 Zamore, P.D., et al. (2010). Paternally induced transgenerational environmental
823 reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084–1096.

824 Carone, B.R., Hung, J.-H., Hainer, S.J., Chou, M.-T., Carone, D.M., Weng, Z., Fazio, T.G.,
825 and Rando, O.J. (2014). High-Resolution Mapping of Chromatin Packaging in Mouse
826 Embryonic Stem Cells and Sperm. *Dev. Cell* 30, 11–22.

827 Casanova, M., Pasternak, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., Probst, A.V., and Almouzni, G.
828 (2013). Heterochromatin reorganization during early mouse development requires a single-
829 stranded noncoding transcript. *Cell Rep.* 4, 1156–1167.

830 de Castro Barbosa, T., Ingerslev, L.R., Alm, P.S., Versteijhe, S., Massart, J., Rasmussen, M.,
831 Donkin, I., Sjögren, R., Mudry, J.M., Vetterli, L., et al. (2016). High-fat diet reprograms the
832 epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. *Mol.*
833 *Metab.* 5, 184–197.

834 Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova,
835 O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., et al. (2002).
836 Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* 296, 922–927.

837 Chang, A.S., Moley, K.H., Wangler, M., Feinberg, A.P., and Debaun, M.R. (2005). Association
838 between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series
839 of 19 patients. *Fertil. Steril.* 83, 349–354.

840 Chen, T., and Li, E. (2004). Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr.*
841 *Top. Dev. Biol.* 60, 55–89.

842 Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang,
843 Y., et al. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired
844 metabolic disorder. *Science* 351, 397–400.

845 Chopra, M., Amor, D.J., Sutton, L., Algar, E., and Mowat, D. (2010). Russell-Silver syndrome
846 due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a patient conceived using intracytoplasmic sperm
847 injection. *Reprod. Biomed. Online* 20, 843–847.

848 Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M.,
849 Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The nuclear form of phospholipid
850 hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm
851 chromatin stability. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7637–7644.

852 Corzett, M., Mazrimas, J., and Balhorn, R. (2002). Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in
853 the sperm of eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 519–527.

854 Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y., and Wang, Z. (2016). DNA methylation
855 in spermatogenesis and male infertility. *Exp. Ther. Med.* 12, 1973–1979.

856 Dadoune, J.-P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res.*
857 *Tech.* 61, 56–75.

858 Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein
859 essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819–830.

860 Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B.
861 (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin
862 interactions. *Nature* 485, 376–380.

863 Dixon, J.R., Jung, I., Selvaraj, S., Shen, Y., Antosiewicz-Bourget, J.E., Lee, A.Y., Ye, Z., Kim,
864 A., Rajagopal, N., Xie, W., et al. (2015). Chromatin architecture reorganization during stem
865 cell differentiation. *Nature* 518, 331–336.

866 Dong, Y., Isono, K.-I., Ohbo, K., Endo, T.A., Ohara, O., Maekawa, M., Toyama, Y., Ito, C.,
867 Toshimori, K., Helin, K., et al. (2017). EPC1/TIP60-Mediated Histone Acetylation Facilitates
868 Spermiogenesis in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 37.

869 Dottermusch-Heidel, C., Gärtner, S.M.K., Tegeder, I., Rathke, C., Barckmann, B., Bartkuhn,
870 M., Bhushan, S., Steger, K., Meinhardt, A., and Renkawitz-Pohl, R. (2014a). H3K79
871 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-
872 protamine transition in *Drosophila* and rat. *Biol. Open* 3, 444–452.

873 Dottermusch-Heidel, C., Klaus, E.S., Gonzalez, N.H., Bhushan, S., Meinhardt, A., Bergmann,
874 M., Renkawitz-Pohl, R., Rathke, C., and Steger, K. (2014b). H3K79 methylation directly
875 precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to
876 bacterial infections. *Andrology* 2, 655–665.

877 Drabent, B., Benavente, R., and Hoyer-Fender, S. (2003). Histone H1t is not replaced by H1.1
878 or H1.2 in pachytene spermatocytes or spermatids of H1t-deficient mice. *Cytogenet. Genome*
879 *Res.* 103, 307–313.

880 Efimova, O., Pendina, A., Tikhonov, A., E. Parfenyev, S., D. Mekina, I., M. Komarova, E., A.
881 Mazilina, M., Daev, E., G. Chiryayeva, O., A. Galembo, I., et al. (2017). Genome-wide 5-
882 hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality.
883 *Oncotarget*.

884 Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., Vlag, J. van
885 der, Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2013). Molecular determinants of nucleosome
886 retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 868–875.

887 Farthing, C.R., Ficz, G., Ng, R.K., Chan, C.-F., Andrews, S., Dean, W., Hemberger, M., and
888 Reik, W. (2008). Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic
889 reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet.* 4, e1000116.

890 Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero,
891 R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is
892 required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse
893 meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508.

894 Fullston, T., Ohlsson Teague, E.M.C., Palmer, N.O., DeBlasio, M.J., Mitchell, M., Corbett, M.,
895 Print, C.G., Owens, J.A., and Lane, M. (2013). Paternal obesity initiates metabolic disturbances
896 in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the
897 transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am.*
898 *Soc. Exp. Biol.* 27, 4226–4243.

- 899 Gan, H., Wen, L., Liao, S., Lin, X., Ma, T., Liu, J., Song, C.-X., Wang, M., He, C., Han, C., et
900 al. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine during mouse spermatogenesis. *Nat.*
901 *Commun.* *4*, 1995.
- 902 Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Prados, J., Farinelli, L., Miska, E.,
903 and Mansuy, I.M. (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the
904 effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* *17*, 667–669.
- 905 Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., and Bradbury, E.M. (1990). Isolation
906 of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic
907 histones. *J. Biol. Chem.* *265*, 20662–20666.
- 908 Gaucher, J., Boussouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., Hery, P.,
909 Jounier, S., Depaux, A., Vitte, A.-L., et al. (2012). Bromodomain-dependent stage-specific
910 male genome programming by Brdt. *EMBO J.* *31*, 3809–3820.
- 911 Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape.
912 *Cell* *128*, 635–638.
- 913 Gou, L.-T., Kang, J.-Y., Dai, P., Wang, X., Li, F., Zhao, S., Zhang, M., Hua, M.-M., Lu, Y.,
914 Zhu, Y., et al. (2017). Ubiquitination-Deficient Mutations in Human Piwi Cause Male
915 Infertility by Impairing Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis. *Cell* *169*,
916 1090–1104.e13.
- 917 Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2014). Genome-scale acetylation-
918 dependent histone eviction during spermatogenesis. *J. Mol. Biol.* *426*, 3342–3349.
- 919 Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones
920 in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem. FEBS* *271*,
921 3459–3469.
- 922 Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson,
923 I., Garin, J., Khochbin, S., et al. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new
924 histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* *176*, 283–294.
- 925 Govin, J., Dorsey, J., Gaucher, J., Rousseaux, S., Khochbin, S., and Berger, S.L. (2010).
926 Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during
927 gametogenesis. *Genes Dev.* *24*, 1772–1786.
- 928 Grandjean, V., Fourré, S., De Abreu, D.A.F., Derieppe, M.-A., Remy, J.-J., and
929 Rassoulzadegan, M. (2015). RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and
930 metabolic disorders. *Sci. Rep.* *5*, 18193.
- 931 Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006).
932 The X and Y Chromosomes Assemble into H2A.Z, Containing Facultative Heterochromatin,
933 following Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5394–5405.
- 934 Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2007). H2A.Z contributes
935 to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 525–530.

- 936 Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., Xie, Z.-G., Shi, L., He, X., Jin, S.,
937 et al. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes.
938 *Nature* 477, 606–610.
- 939 Guibert, S., Forné, T., and Weber, M. (2012). Global profiling of DNA methylation erasure in
940 mouse primordial germ cells. *Genome Res.* 22, 633–641.
- 941 Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H., Wu, X., Wen, L., Gu, T.-P., Hu, B., et al.
942 (2014). Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the
943 Mammalian zygote. *Cell Stem Cell* 15, 447–458.
- 944 Hackett, J.A., Zyllicz, J.J., and Surani, M.A. (2012). Parallel mechanisms of epigenetic
945 reprogramming in the germline. *Trends Genet. TIG* 28, 164–174.
- 946 Hackett, J.A., Sengupta, R., Zyllicz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., and Surani, M.A.
947 (2013). Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-
948 hydroxymethylcytosine. *Science* 339, 448–452.
- 949 Hada, M., Masuda, K., Yamaguchi, K., Shirahige, K., and Okada, Y. (2017). Identification of
950 a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis. *Sci. Rep.* 7, 46228.
- 951 Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani,
952 M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* 117, 15–
953 23.
- 954 Hajkova, P., Jeffries, S.J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S.P., and Surani, M.A. (2010). Genome-
955 wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*
956 329, 78–82.
- 957 Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009).
958 Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460,
959 473–478.
- 960 Hammoud, S.S., Nix, D.A., Hammoud, A.O., Gibson, M., Cairns, B.R., and Carrell, D.T.
961 (2011). Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic
962 modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum.*
963 *Reprod. Oxf. Engl.* 26, 2558–2569.
- 964 Hammoud, S.S., Low, D.H.P., Yi, C., Carrell, D.T., Guccione, E., and Cairns, B.R. (2014).
965 Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and
966 spermatogenesis. *Cell Stem Cell* 15, 239–253.
- 967 Hanna, C.W., and Kelsey, G. (2014). The specification of imprints in mammals. *Heredity* 113,
968 176.
- 969 Hartmann, S., Bergmann, M., Bohle, R.M., Weidner, W., and Steger, K. (2006). Genetic
970 imprinting during impaired spermatogenesis. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 12, 407–411.
- 971 He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al.
972 (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian
973 DNA. *Science* 333, 1303–1307.

- 974 van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A.H.A., Muller, S., Berden, J.H.M., Braat,
975 D.D.M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine
976 methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech. Dev.*
977 *122*, 1008–1022.
- 978 van der Heijden, G.W., Derijck, A. a. H.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer,
979 P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote
980 and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev. Biol.* *298*, 458–469.
- 981 van der Heijden, G.W., Ramos, L., Baart, E.B., van den Berg, I.M., Derijck, A.A.H.A., van der
982 Vlag, J., Martini, E., and de Boer, P. (2008). Sperm-derived histones contribute to zygotic
983 chromatin in humans. *BMC Dev. Biol.* *8*, 34.
- 984 Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R., and Sasaki, H. (2008).
985 Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA
986 methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.* *22*, 1607–1616.
- 987 Hoghoughi, N., Barral, S., Vargas, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2017). Histone
988 variants: essential actors in the male genome programming. *J. Biochem. (Tokyo)*.
- 989 Holoch, D., and Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression.
990 *Nat. Rev. Genet.* *16*, 71–84.
- 991 Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Chaillet,
992 J.R. (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene.
993 *Cell* *104*, 829–838.
- 994 Huang, H., Lin, S., Garcia, B.A., and Zhao, Y. (2015). Quantitative proteomic analysis of
995 histone modifications. *Chem. Rev.* *115*, 2376–2418.
- 996 Hutcheon, K., McLaughlin, E.A., Stanger, S.J., Bernstein, I.R., Dun, M.D., Eamens, A.L., and
997 Nixon, B. (2017). Analysis of the small non-protein-coding RNA profile of mouse spermatozoa
998 reveals specific enrichment of piRNAs within mature spermatozoa. *RNA Biol.* *0*.
- 999 Huypens, P., Sass, S., Wu, M., Dyckhoff, D., Tschöp, M., Theis, F., Marschall, S., Hrabě de
1000 Angelis, M., and Beckers, J. (2016). Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity
1001 and insulin resistance. *Nat. Genet.* *48*, 497–499.
- 1002 Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2011). Reprogramming of the paternal
1003 genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl.*
1004 *Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3642–3647.
- 1005 Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011).
1006 Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*
1007 *333*, 1300–1303.
- 1008 Jain, D., Meydan, C., Lange, J., Claeys Bouuaert, C., Lailier, N., Mason, C.E., Anderson, K.V.,
1009 and Keeney, S. (2017). rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase
1010 homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. *PLoS*
1011 *Genet.* *13*, e1006964.

- 1012 Jedrzejczak, P., Kempisty, B., Bryja, A., Mostowska, M., Depa-Martynow, M., Pawelczyk, L.,
1013 and Jagodzinski, P.P. (2007). Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-
1014 specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and
1015 asthenozoospermic men. *Arch. Androl.* *53*, 199–205.
- 1016 Jirtle, R.L., and Skinner, M.K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility.
1017 *Nat. Rev. Genet.* *8*, 253–262.
- 1018 Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M.P., Krawetz, S.A., and Reproductive
1019 Medicine Network (2013). The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum.*
1020 *Reprod. Update* *19*, 604–624.
- 1021 Johnston, D.S., Jelinsky, S.A., Bang, H.J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., and Turner,
1022 T.T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene
1023 expression in the epididymis. *Biol. Reprod.* *73*, 404–413.
- 1024 Jones, E.L., Zalensky, A.O., and Zalenskaya, I.A. (2011). Protamine withdrawal from human
1025 sperm nuclei following heterologous ICSI into hamster oocytes. *Protein Pept. Lett.* *18*, 811–
1026 816.
- 1027 Jung, Y.H., Sauria, M.E.G., Lyu, X., Cheema, M.S., Ausio, J., Taylor, J., and Corces, V.G.
1028 (2017). Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory
1029 Landscapes. *Cell Rep.* *18*, 1366–1382.
- 1030 Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004).
1031 Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting.
1032 *Nature* *429*, 900–903.
- 1033 Kang, J., Lienhard, M., Pastor, W.A., Chawla, A., Novotny, M., Tsagaratou, A., Lasken, R.S.,
1034 Thompson, E.C., Surani, M.A., Koralov, S.B., et al. (2015). Simultaneous deletion of the
1035 methylcytosine oxidases Tet1 and Tet3 increases transcriptome variability in early
1036 embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E4236.
- 1037 Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki,
1038 M., and Sasaki, H. (2007). Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and
1039 repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* *16*,
1040 2272–2280.
- 1041 Ke, Y., Xu, Y., Chen, X., Feng, S., Liu, Z., Sun, Y., Yao, X., Li, F., Zhu, W., Gao, L., et al.
1042 (2017). 3D Chromatin Structures of Mature Gametes and Structural Reprogramming during
1043 Mammalian Embryogenesis. *Cell* *170*, 367–381.e20.
- 1044 Kim, J., Zhao, H., Dan, J., Kim, S., Hardikar, S., Hollowell, D., Lin, K., Lu, Y., Takata, Y.,
1045 Shen, J., et al. (2016). Maternal Setdb1 Is Required for Meiotic Progression and
1046 Preimplantation Development in Mouse. *PLoS Genet.* *12*, e1005970.
- 1047 Kocer, A., Henry-Berger, J., Noblanc, A., Champroux, A., Pogorelnik, R., Guiton, R., Janny,
1048 L., Pons-Rejraji, H., Saez, F., Johnson, G.D., et al. (2015). Oxidative DNA damage in mouse
1049 sperm chromosomes: Size matters. *Free Radic. Biol. Med.*
- 1050 Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA
1051 demethylation. *Nature* *502*, 472–479.

- 1052 Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*
1053 *184*, 868–871.
- 1054 Kramer, J.A., and Krawetz, S.A. (1997). RNA in spermatozoa: implications for the alternative
1055 haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.* *3*, 473–478.
- 1056 Krawetz, S.A., Kruger, A., Lalancette, C., Tagett, R., Anton, E., Draghici, S., and Diamond,
1057 M.P. (2011). A survey of small RNAs in human sperm. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *26*, 3401–
1058 3412.
- 1059 Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M.,
1060 Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., et al. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene,
1061 is essential for spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 839–849.
- 1062 Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada,
1063 N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon
1064 genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.*
1065 *22*, 908–917.
- 1066 Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., and Reik, W. (2003).
1067 Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic
1068 inheritance in the mouse. *Genesis* *35*, 88–93.
- 1069 Li, W., Wu, J., Kim, S.-Y., Zhao, M., Hearn, S.A., Zhang, M.Q., Meistrich, M.L., and Mills,
1070 A.A. (2014). Chd5 orchestrates chromatin remodeling during sperm development. *Nat.*
1071 *Commun.* *5*, 3812.
- 1072 Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A.,
1073 Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of
1074 long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* *326*, 289–293.
- 1075 Linnemann, A.K., Platts, A.E., and Krawetz, S.A. (2009). Differential nuclear scaffold/matrix
1076 attachment marks expressed genes. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 645–654.
- 1077 Liu, S., Yu, H., Liu, Y., Liu, X., Zhang, Y., Bu, C., Yuan, S., Chen, Z., Xie, G., Li, W., et al.
1078 (2017). Chromodomain Protein CDYL Acts as a Crotonyl-CoA Hydratase to Regulate Histone
1079 Crotonylation and Spermatogenesis. *Mol. Cell* *67*, 853–866.e5.
- 1080 Liu, W.-M., Pang, R.T.K., Chiu, P.C.N., Wong, B.P.C., Lao, K., Lee, K.-F., and Yeung, W.S.B.
1081 (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc.*
1082 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 490–494.
- 1083 Lu, L.-Y., Wu, J., Ye, L., Gavriline, G.B., Saunders, T.L., and Yu, X. (2010). RNF8-dependent
1084 histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev. Cell* *18*,
1085 371–384.
- 1086 Luo, L.-F., Hou, C.-C., and Yang, W.-X. (2016). Small non-coding RNAs and their associated
1087 proteins in spermatogenesis. *Gene* *578*, 141–157.
- 1088 Malone, C.D., and Hannon, G.J. (2009). Molecular evolution of piRNA and transposon control
1089 pathways in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *74*, 225–234.

- 1090 Marees, T., Dommering, C.J., Imhof, S.M., Kors, W.A., Ringens, P.J., van Leeuwen, F.E., and
1091 Moll, A.C. (2009). Incidence of retinoblastoma in Dutch children conceived by IVF: an
1092 expanded study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 3220–3224.
- 1093 Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., and Sousa, M. (2008).
1094 Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia.
1095 *Mol. Hum. Reprod.* *14*, 67–74.
- 1096 Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-
1097 Corsi, P., and Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant,
1098 required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl.*
1099 *Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2808–2813.
- 1100 Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-
1101 stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* *110*, 563–574.
- 1102 Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000). Demethylation of the
1103 zygotic paternal genome. *Nature* *403*, 501–502.
- 1104 McEwen, K.R., and Ferguson-Smith, A.C. (2010). Distinguishing epigenetic marks of
1105 developmental and imprinting regulation. *Epigenetics Chromatin* *3*, 2.
- 1106 McLay, D.W., and Clarke, H.J. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in
1107 mammals. *Reprod. Camb. Engl.* *125*, 625–633.
- 1108 Mejos, K.K., Kim, H.W., Lim, E.M., and Chang, N. (2013). Effects of parental folate deficiency
1109 on the folate content, global DNA methylation, and expressions of FR α , IGF-2 and IGF-1R in
1110 the postnatal rat liver. *Nutr. Res. Pract.* *7*, 281–286.
- 1111 Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved Histone Variant H2A.Z
1112 Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* *112*, 725–736.
- 1113 Messerschmidt, D.M., de Vries, W., Ito, M., Solter, D., Ferguson-Smith, A., and Knowles, B.B.
1114 (2012). Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition.
1115 *Science* *335*, 1499–1502.
- 1116 Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B., and Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics
1117 during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.*
1118 *28*, 812–828.
- 1119 Miller, D., Ostermeier, G.C., and Krawetz, S.A. (2005). The controversy, potential and roles of
1120 spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.* *11*, 156–163.
- 1121 Mishra, L.N., Gupta, N., and Rao, S.M.R. (2015). Mapping of post-translational modifications
1122 of spermatid-specific linker histone H1-like protein, HILS1. *J. Proteomics* *128*, 218–230.
- 1123 Montellier, E., Boussoar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H.,
1124 Debernardi, A., Héry, P., Curtet, S., et al. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is
1125 controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* *27*, 1680–1692.
- 1126 Murphy, S.K., and Jirtle, R.L. (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays*
1127 *News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *25*, 577–588.

- 1128 Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T.,
1129 Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA
1130 demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 64–71.
- 1131 Nakamura, T., Liu, Y.-J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M.,
1132 Ogura, A., Shinkai, Y., and Nakano, T. (2012). PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against
1133 conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486, 415–419.
- 1134 Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Laybutt, D.R., Barres, R., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2010). Chronic
1135 high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963–
1136 966.
- 1137 Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Maloney, C.A., Youngson, N.A., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2014).
1138 Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of
1139 retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *FASEB J. Off. Publ.*
1140 *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1830–1841.
- 1141 Niemitz, E.L., and Feinberg, A.P. (2004). Epigenetics and assisted reproductive technology: a
1142 call for investigation. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 599–609.
- 1143 Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez,
1144 F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., et al. (2012). Epididymis Response Partly
1145 Compensates for Spermatozoa Oxidative Defects in *snGpx4* and *GPx5* Double Mutant Mice.
1146 *PLoS ONE* 7, e38565.
- 1147 Noblanc, A., Damon-Soubeyrand, C., Karrich, B., Henry-Berger, J., Cadet, R., Saez, F., Guiton,
1148 R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Alvarez, J.G., et al. (2013). DNA oxidative damage in
1149 mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic. Biol. Med.*
1150 65, 719–723.
- 1151 Nonchev, S., and Tsanev, R. (1990). Protamine-histone replacement and DNA replication in
1152 the male mouse pronucleus. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 72–76.
- 1153 Oliva, R., and Dixon, G.H. (1991). Vertebrate Protamine Genes and the Histone-to-Protamine
1154 Replacement Reaction. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 40, 25–94.
- 1155 Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2004).
1156 Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 429, 154–154.
- 1157 Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W.,
1158 and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr.*
1159 *Biol. CB* 10, 475–478.
- 1160 Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991).
1161 Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a
1162 distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3734–3738.
- 1163 Pantano, L., Jodar, M., Bak, M., Balleascà, J.L., Tommerup, N., Oliva, R., and Vavouri, T.
1164 (2015). The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs
1165 complementary to protein-coding genes. *RNA N. Y. N* 21, 1085–1095.

- 1166 Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone
1167 region. *Science* 257, 1398–1400.
- 1168 Pehrson, J.R., Changolkar, L.N., Costanzi, C., and Leu, N.A. (2014). Mice without MacroH2A
1169 Histone Variants. *Mol. Cell. Biol.* 34, 4523.
- 1170 Pentakota, S.K., Sandhya, S., P Sikarwar, A., Chandra, N., and Satyanarayana Rao, M.R.
1171 (2014). Mapping post-translational modifications of mammalian testicular specific histone
1172 variant TH2B in tetraploid and haploid germ cells and their implications on the dynamics of
1173 nucleosome structure. *J. Proteome Res.* 13, 5603–5617.
- 1174 Perreault, S.D., Barbee, R.R., and Slott, V.L. (1988). Importance of glutathione in the
1175 acquisition and maintenance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster
1176 oocytes. *Dev. Biol.* 125, 181–186.
- 1177 Pittoggi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrassi, F., Giordano, R., Magnano, A.R.,
1178 Lorenzini, R., Lavia, P., and Spadafora, C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is
1179 organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J. Cell Sci.* 112
1180 (*Pt 20*), 3537–3548.
- 1181 Poplinski, A., Tüttelmann, F., Kanber, D., Horsthemke, B., and Gromoll, J. (2010). Idiopathic
1182 male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1.
1183 *Int. J. Androl.* 33, 642–649.
- 1184 Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and
1185 Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is
1186 affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101–1105.
- 1187 Probst, A.V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., and Almouzni, G.
1188 (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for
1189 chromocenter formation and early mouse development. *Dev. Cell* 19, 625–638.
- 1190 Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo,
1191 I., Pedone, P.V., Grimaldi, G., Riccio, A., et al. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1
1192 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting
1193 control regions. *Mol. Cell* 44, 361–372.
- 1194 Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006).
1195 RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441,
1196 469–474.
- 1197 Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics
1198 during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155–168.
- 1199 Reilly, J.N., McLaughlin, E.A., Stanger, S.J., Anderson, A.L., Hutcheon, K., Church, K.,
1200 Mihalas, B.P., Tyagi, S., Holt, J.E., Eamens, A.L., et al. (2016). Characterisation of mouse
1201 epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for
1202 modification of the sperm epigenome. *Sci. Rep.* 6, 31794.
- 1203 Royo, H., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2016). Alternative Computational Analysis
1204 Shows No Evidence for Nucleosome Enrichment at Repetitive Sequences in Mammalian
1205 Spermatozoa. *Dev. Cell* 37, 98–104.

- 1206 Samans, B., Yang, Y., Krebs, S., Sarode, G.V., Blum, H., Reichenbach, M., Wolf, E., Steger,
1207 K., Dansranjav, T., and Schagdarsurengin, U. (2014). Uniformity of nucleosome preservation
1208 pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev. Cell* *30*, 23–
1209 35.
- 1210 Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., and Torres-Padilla, M.-
1211 E. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the
1212 histone variant H3.3. *Nat. Cell Biol.* *12*, 853–862.
- 1213 Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., and Dean, W. (2002). Dynamic Reprogramming of DNA
1214 Methylation in the Early Mouse Embryo. *Dev. Biol.* *241*, 172–182.
- 1215 Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S., and Postberg, J. (2011). H3.5 is a novel hominid-
1216 specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human
1217 testes. *Chromosoma* *120*, 275–285.
- 1218 Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C.,
1219 Thienpont, B., Dean, W., and Reik, W. (2012). The dynamics of genome-wide DNA
1220 methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell* *48*, 849–862.
- 1221 Sexton, T., Yaffe, E., Kenigsberg, E., Bantignies, F., Leblanc, B., Hoichman, M., Parrinello,
1222 H., Tanay, A., and Cavalli, G. (2012). Three-dimensional folding and functional organization
1223 principles of the Drosophila genome. *Cell* *148*, 458–472.
- 1224 Shaman, J.A., Yamauchi, Y., and Ward, W.S. (2007a). Function of the sperm nuclear matrix.
1225 *Arch. Androl.* *53*, 135–140.
- 1226 Shaman, J.A., Yamauchi, Y., and Ward, W.S. (2007b). The sperm nuclear matrix is required
1227 for paternal DNA replication. *J. Cell. Biochem.* *102*, 680–688.
- 1228 Sharma, U., Stefanova, D., and Holmes, S.G. (2013). Histone variant H2A.Z functions in sister
1229 chromatid cohesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 3473–3481.
- 1230 Sharma, U., Conine, C.C., Shea, J.M., Boskovic, A., Derr, A.G., Bing, X.Y., Belleanne, C.,
1231 Kucukural, A., Serra, R.W., Sun, F., et al. (2016). Biogenesis and function of tRNA fragments
1232 during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* *351*, 391–396.
- 1233 Shen, L., Inoue, A., He, J., Liu, Y., Lu, F., and Zhang, Y. (2014). Tet3 and DNA Replication
1234 Mediate Demethylation of Both the Maternal and Paternal Genomes in Mouse Zygotes. *Cell*
1235 *Stem Cell* *15*, 459–470.
- 1236 Shimada, A., Kikuchi, K., Noguchi, J., Akama, K., Nakano, M., and Kaneko, H. (2000).
1237 Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during in vitro fertilization of
1238 pig oocytes. *J. Reprod. Fertil.* *120*, 247–256.
- 1239 Shinagawa, T., Huynh, L.M., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Kwak, H.-G., Dohmae,
1240 N., Noguchi, J., and Ishii, S. (2015). Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in
1241 spermatogenesis. *Development* *142*, 1287–1292.
- 1242 Siklenka, K., Erkek, S., Godmann, M., Lambrot, R., McGraw, S., Lafleur, C., Cohen, T., Xia,
1243 J., Suderman, M., Hallett, M., et al. (2015). Disruption of histone methylation in developing
1244 sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science*.

- 1245 Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., and Meissner, A.
1246 (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*
1247 *484*, 339–344.
- 1248 Sotolongo, B., Lino, E., and Ward, W.S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their
1249 own DNA. *Biol. Reprod.* *69*, 2029–2035.
- 1250 Soubry, A., Schildkraut, J.M., Murtha, A., Wang, F., Huang, Z., Bernal, A., Kurtzberg, J., Jirtle,
1251 R.L., Murphy, S.K., and Hoyo, C. (2013). Paternal obesity is associated with IGF2
1252 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC*
1253 *Med.* *11*, 29.
- 1254 Soubry, A., Murphy, S.K., Wang, F., Huang, Z., Vidal, A.C., Fuemmeler, B.F., Kurtzberg, J.,
1255 Murtha, A., Jirtle, R.L., Schildkraut, J.M., et al. (2015). Newborns of obese parents have altered
1256 DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int. J. Obes.* *2005 39*, 650–657.
- 1257 Steilmann, C., Cavalcanti, M.C.O., Bartkuhn, M., Pons-Kühnemann, J., Schuppe, H.-C.,
1258 Weidner, W., Steger, K., and Paradowska, A. (2010). The interaction of modified histones with
1259 the bromodomain testis-specific (BRDT) gene and its mRNA level in sperm of fertile donors
1260 and subfertile men. *Reprod. Camb. Engl.* *140*, 435–443.
- 1261 Subramanyam, D., and Blesloch, R. (2011). From microRNAs to targets: pathway discovery in
1262 cell fate transitions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 498–503.
- 1263 Sullivan, R., and Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in
1264 mammalian male reproductive physiology. *Reprod. Camb. Engl.* *146*, R21-35.
- 1265 Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a
1266 nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1121–1124.
- 1267 Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant
1268 H3.3. *Cell Res.* *21*, 421–434.
- 1269 Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3
1270 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA
1271 synthesis. *Cell* *116*, 51–61.
- 1272 Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S.,
1273 Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-
1274 hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* *324*, 930–935.
- 1275 Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: substrates for chromatin
1276 dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 115–126.
- 1277 Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux,
1278 S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine
1279 crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* *146*, 1016–1028.
- 1280 Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai,
1281 K., Maekawa, M., Toshimori, K., et al. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein
1282 involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 7107–7119.

- 1283 Tang, W.W.C., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H.G., Floros, V.I., Bradshaw, C.R., Hackett, J.A.,
1284 Chinnery, P.F., and Surani, M.A. (2015). A Unique Gene Regulatory Network Resets the
1285 Human Germline Epigenome for Development. *Cell* *161*, 1453–1467.
- 1286 Tovich, P.R., and Oko, R.J. (2003). Somatic histones are components of the perinuclear theca
1287 in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* *278*, 32431–32438.
- 1288 Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., Nishioka, K., and Bremer, J.W. (1982).
1289 Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis.
1290 *J. Biol. Chem.* *257*, 5560–5567.
- 1291 Turinetto, V., and Giachino, C. (2015). Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA
1292 double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* *43*, 2489–
1293 2498.
- 1294 Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., Makino, Y., Nogami,
1295 J., Horikoshi, N., Osakabe, A., et al. (2017). Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is
1296 Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep.* *18*, 593–600.
- 1297 Vassoler, F.M., White, S.L., Schmidt, H.D., Sadri-Vakili, G., and Pierce, R.C. (2013).
1298 Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. *Nat. Neurosci.* *16*, 42–47.
- 1299 Walsh, C.P., Chaillet, J.R., and Bestor, T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous
1300 retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* *20*, 116–117.
- 1301 Wang, X.-X., Sun, B.-F., Jiao, J., Chong, Z.-C., Chen, Y.-S., Wang, X.-L., Zhao, Y., Zhou, Y.-
1302 M., and Li, D. (2015). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine modification pattern is a novel
1303 epigenetic feature of globozoospermia. *Oncotarget* *6*, 6535–6543.
- 1304 Ward, W.S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and
1305 development. *Mol. Hum. Reprod.* *16*, 30–36.
- 1306 Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1989). Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA
1307 anchor. *Biol. Reprod.* *41*, 361–370.
- 1308 Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian
1309 spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* *44*, 569–574.
- 1310 Weber, M., and Schübeler, D. (2007). Genomic patterns of DNA methylation: targets and
1311 function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 273–280.
- 1312 Weber, A.R., Krawczyk, C., Robertson, A.B., Kuśnierczyk, A., Vågbø, C.B., Schuermann, D.,
1313 Klungland, A., and Schär, P. (2016). Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-
1314 dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat. Commun.*
1315 *7*, 10806.
- 1316 Wei, J., Sun, X., Chen, Y., Li, Y., Song, L., Zhou, Z., Xu, B., Lin, Y., and Xu, S. (2014a).
1317 Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in
1318 male rat offspring fed on a high-fat diet. *J. Endocrinol.* *222*, 313–325.

- 1319 Wei, M., Wei, H., Wu, M., Song, M., Zhang, J., Yu, J., Fan, S., and Yu, S. (2013). Comparative
1320 expression profiling of miRNA during anther development in genetic male sterile and wild type
1321 cotton. *BMC Plant Biol.* *13*, 66.
- 1322 Wei, Y., Yang, C.-R., Wei, Y.-P., Zhao, Z.-A., Hou, Y., Schatten, H., and Sun, Q.-Y. (2014b).
1323 Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc.*
1324 *Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 1873–1878.
- 1325 Wendt, K.D., and Shilatifard, A. (2006). Packing for the germy: the role of histone H4 Ser1
1326 phosphorylation in chromatin compaction and germ cell development. *Genes Dev.* *20*, 2487–
1327 2491.
- 1328 van de Werken, C., van der Heijden, G.W., Eleveld, C., Teeuwssen, M., Albert, M., Baarends,
1329 W.M., Laven, J.S.E., Peters, A.H.F.M., and Baart, E.B. (2014). Paternal heterochromatin
1330 formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone
1331 modifications. *Nat. Commun.* *5*, 5868.
- 1332 Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Schöler, H.,
1333 and Walter, J. (2010). Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in
1334 mouse zygotes. *EMBO J.* *29*, 1877–1888.
- 1335 Wu, F., Caron, C., De Robertis, C., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2008). Testis-specific
1336 histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization.
1337 *J. Reprod. Dev.* *54*, 413–417.
- 1338 Wykes, S.M., and Krawetz, S.A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *J.*
1339 *Biol. Chem.* *278*, 29471–29477.
- 1340 Wykes, S.M., Visscher, D.W., and Krawetz, S.A. (1997). Haploid transcripts persist in mature
1341 human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *3*, 15–19.
- 1342 Wykes, S.M., Miller, D., and Krawetz, S.A. (2000). Mammalian spermatozoal mRNAs: tools
1343 for the functional analysis of male gametes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* *32*, 77–81.
- 1344 Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012).
1345 Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand
1346 break repair. *Mol. Cell* *48*, 723–733.
- 1347 Xue, J.-H., Xu, G.-F., Gu, T.-P., Chen, G.-D., Han, B.-B., Xu, Z.-M., Bjørås, M., Krokan, H.E.,
1348 Xu, G.-L., and Du, Y.-R. (2016). Uracil-DNA Glycosylase UNG Promotes Tet-mediated DNA
1349 Demethylation. *J. Biol. Chem.* *291*, 731–738.
- 1350 Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., and Matzuk, M.M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker
1351 histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian
1352 spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10546–10551.
- 1353 Yang, J.-S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the
1354 interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* *43*, 892–903.
- 1355 Yu, T., Tang, C., Zhang, Y., Zhang, R., and Yan, W. (2017). Microfluidics-based digital
1356 quantitative PCR for single-cell small RNA quantification. *Biol. Reprod.* *97*, 490–496.

- 1357 Yuan, S., Schuster, A., Tang, C., Yu, T., Ortogero, N., Bao, J., Zheng, H., and Yan, W. (2016).
1358 Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation
1359 embryonic development. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 635.
- 1360 Yuen, B.T.K., Bush, K.M., Barrilleaux, B.L., Cotterman, R., and Knoepfler, P.S. (2014).
1361 Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development* *141*,
1362 3483–3494.
- 1363 Zalenskaya, I.A., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Chromatin Structure of
1364 Telomere Domain in Human Sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 213–218.
- 1365 Zama, A.M., and Uzumcu, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on
1366 female reproduction: an ovarian perspective. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 420–439.
- 1367 Zhang, J., Wang, Y., Liu, X., Jiang, S., Zhao, C., Shen, R., Guo, X., Ling, X., and Liu, C.
1368 (2015). Expression and Potential Role of microRNA-29b in Mouse Early Embryo
1369 Development. *Cell. Physiol. Biochem.* *35*, 1178–1187.
- 1370 Zhang, L., Lu, X., Lu, J., Liang, H., Dai, Q., Xu, G.-L., Luo, C., Jiang, H., and He, C. (2012).
1371 Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat.*
1372 *Chem. Biol.* *8*, 328–330.
- 1373 Zhuang, T., Hess, R.A., Kolla, V., Higashi, M., Raabe, T.D., and Brodeur, G.M. (2014). CHD5
1374 is required for spermiogenesis and chromatin condensation. *Mech. Dev.* *131*, 35–46.
- 1375 Zuo, X., Sheng, J., Lau, H.-T., McDonald, C.M., Andrade, M., Cullen, D.E., Bell, F.T.,
1376 Iacovino, M., Kyba, M., Xu, G., et al. (2012). Zinc Finger Protein ZFP57 Requires Its Co-factor
1377 to Recruit DNA Methyltransferases and Maintains DNA Methylation Imprint in Embryonic
1378 Stem Cells via Its Transcriptional Repression Domain. *J. Biol. Chem.* *287*, 2107.
- 1379
1380
1381
1382
1383

Figure 1.TIF

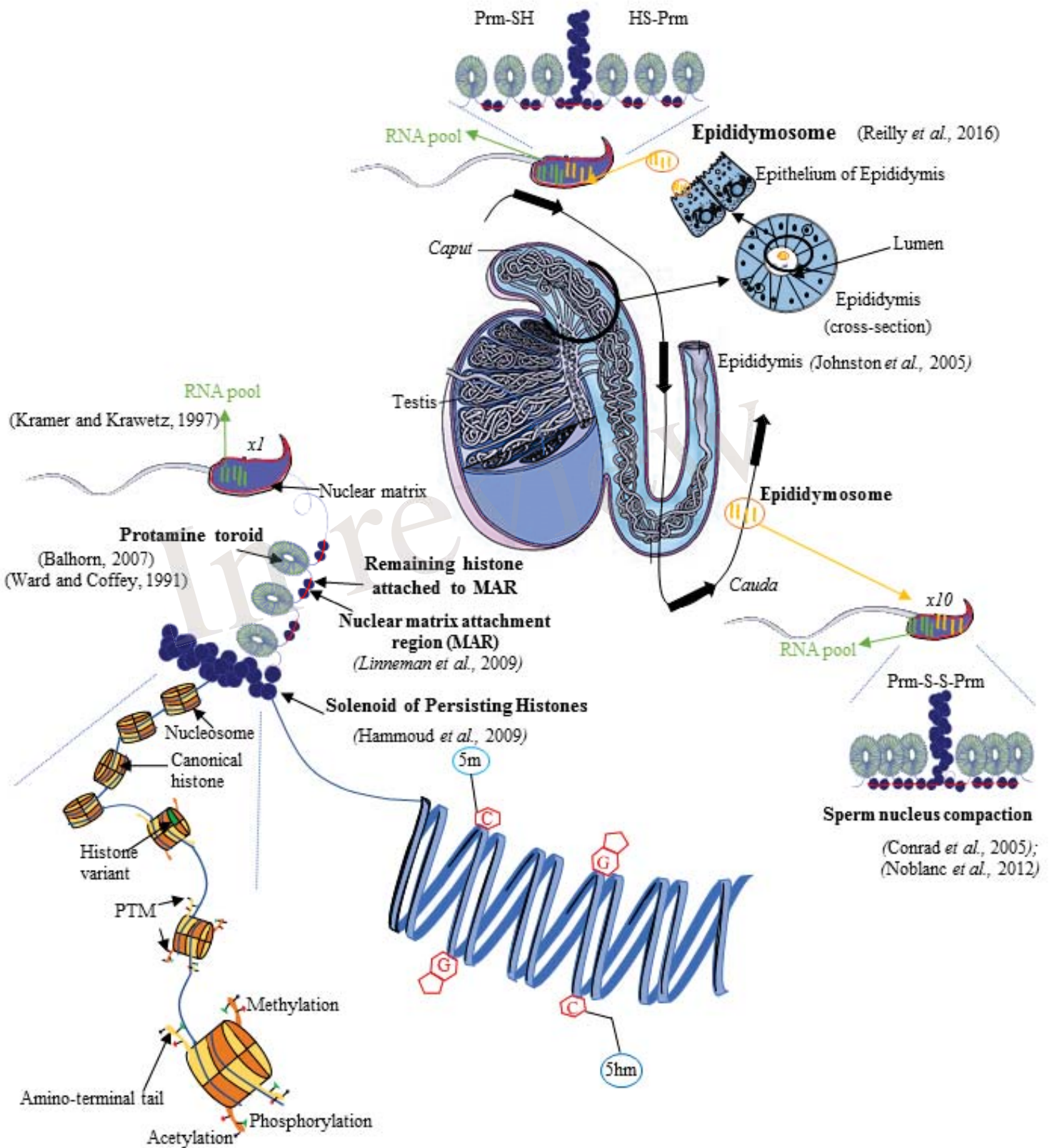


Figure 2.TIF

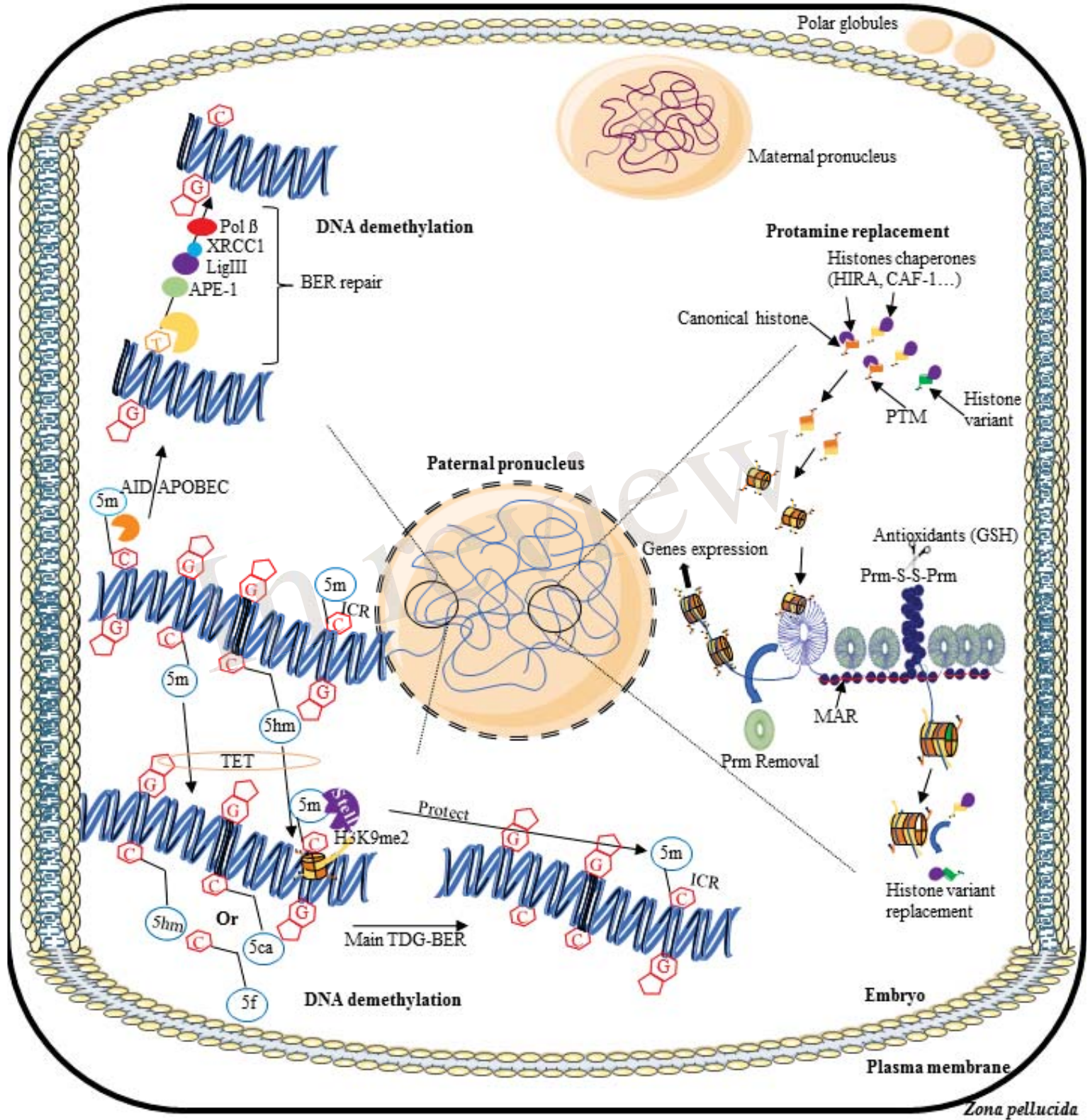


Figure 3.TIF

Variants	Description	Phenotype of invalidation in mouse		Reference
H1t	Testis-specific variant of histone H1	No data		Drabent <i>et al.</i> , 2003
H1t2	H1 histone family, member N, testis-specific (H1fnt)	Infertility due to sperm elongation and nucleus condensation defects.		Martianov <i>et al.</i> , 2005; Tanaka <i>et al.</i> , 2005
H1LS1	Spermatid-specific linker histone H1-like protein	A decrease of human H1LS1 gene expression leading to infertility		Yan <i>et al.</i> , 2003; Jedrzejczak <i>et al.</i> , 2007
γ H2A.X	Specifically induced at DNA breaks during sperm chromatin remodeling	Male infertility due to failure of sex-body formation and meiotic sex chromosome inactivation in spermatocytes		Turinetto and Giachino, 2015; Fernandez-Capetillo <i>et al.</i> , 2003; Blanco-Rodriguez <i>et al.</i> , 2009; Celeste <i>et al.</i> , 2002
H2A.Z	Involved in transcription, DNA repair, chromatin cohesion, centromeres structures and eu/heterochromatine boudaries maintainance	Lethal in early embryo		Suto <i>et al.</i> , 2000; Menegheni <i>et al.</i> , 2003; Greaves <i>et al.</i> , 2007; Xu <i>et al.</i> , 2012; Sharma <i>et al.</i> , 2013
MacroH2A Or mH2A	Associated to heterochromatin and interaction with histones deacetylases, silencing of sexual chromosomes during spermatogenesis	Reduced litter Perinatal death exclusively for knockout of two isoformes of MacroH2A		Pehrson and Fried, 1992 Pehrson <i>et al.</i> , 2014
TH2A	Testis-specific variant of histone H2A	No data	Both invalidation induce infertility Sperm nucleus condensation defects because TP mislocalization	Trostle-Weige <i>et al.</i> , 1982
TH2B	Testis-specific variant of histone H2B	No infertility Canonical H2B compensation		Montellier <i>et al.</i> , 2013; Shinagawa <i>et al.</i> , 2015
H2A.L1 & 2	Found in condensed spermatids on pericentromeric heterochromatin	Invalidation of H2A.L2 leaving to male infertility by sperm chromatin decondensation due to TP absence		Govin <i>et al.</i> , 2007; Barral <i>et al.</i> , 2017
H3.3	Variant of histone H3	Invalidation induces sperm chromatin decondensation by TP mislocalization and Prm absence		Szenker <i>et al.</i> , 2011; Yuen <i>et al.</i> , 2014
H3t	Testis-specific variant of histone H3	Infertility associated with loss of spermatocytes		Govin <i>et al.</i> , 2004; Ueda <i>et al.</i> , 2017
H3.5	Testis-specific variant of histone H3 in human	No data		Schenk <i>et al.</i> , 2011
CENP-A	Centromeres- specific variant of histone H3	embryo died at preimplantation stage		Palmer <i>et al.</i> , 1991

Figure 4.TIF

Paternal transmission of the memory of exposure to environmental factors to subsequent generations.

Paternal environmental

Dietary exposure or malnutrition

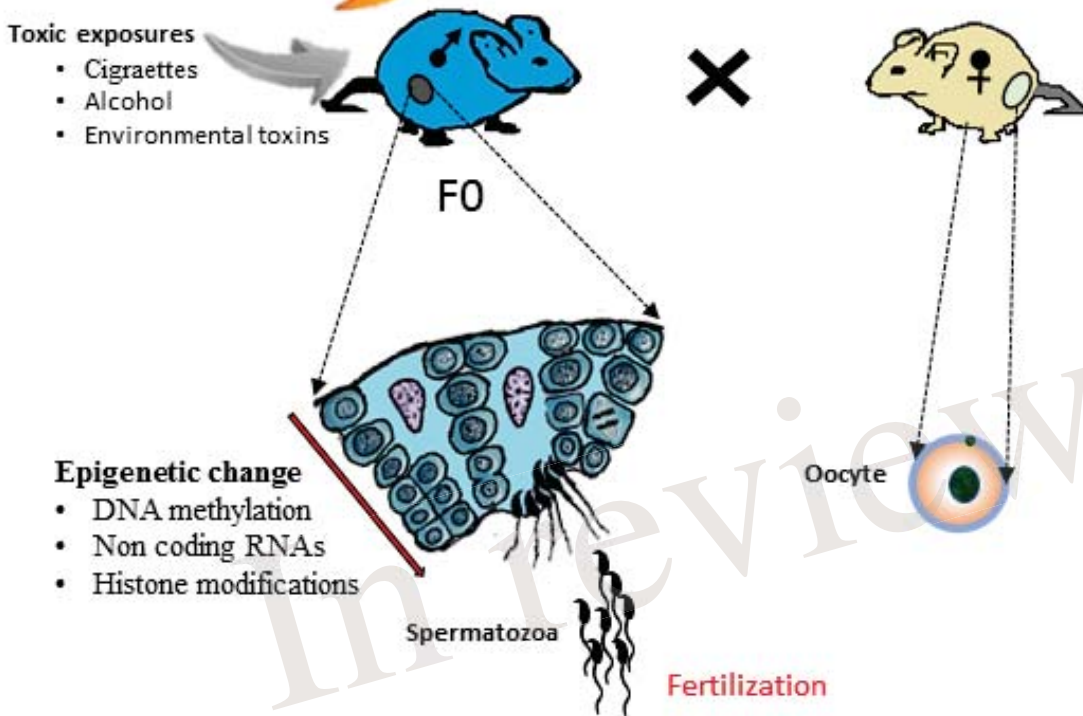
- Quantity and quality (High-fat, low protein)
- Vitamin deficiencies (folate)

Life-style

- Obesity
- Psychosocial stress

Toxic exposures

- Cigarettes
- Alcohol
- Environmental toxins



Epigenetic change

- DNA methylation
- Non coding RNAs
- Histone modifications

Spermatozoa

Fertilization

germline inheritance

Paternal epigenetic transmission

offspring



germline inheritance

offspring



germline inheritance

offspring

F3

Transgenerational phenotypes

Metabolic alterations

- Obesity
- Impaired glucose tolerance
- Impaired Insulin sensitivity

Behavioral disorders

Disturbed Embryonic and fetal development

REVIEW ARTICLE

Open Access



Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities

A. Champroux¹, J. Torres-Carreira², P. Gharagozloo³, J. R. Drevet^{1*} and A. Kocer¹

Abstract

Sperm cells are remarkably complex and highly specialized compared to somatic cells. Their function is to deliver to the oocyte the paternal genomic blueprint along with a pool of proteins and RNAs so a new generation can begin. Reproductive success, including optimal embryonic development and healthy offspring, greatly depends on the integrity of the sperm chromatin structure. It is now well documented that DNA damage in sperm is linked to reproductive failures both in natural and assisted conception (Assisted Reproductive Technologies [ART]). This manuscript reviews recent important findings concerning - the unusual organization of mammalian sperm chromatin and its impact on reproductive success when modified. This review is focused on sperm chromatin damage and their impact on embryonic development and transgenerational inheritance.

Résumé

Les spermatozoïdes sont des cellules particulièrement complexes et très spécialisées comparées aux cellules somatiques. Leur rôle est de délivrer dans l'ovule le patrimoine génétique paternel ainsi qu'un lot de protéines et d'ARNs de façon à initier un nouvel individu. Le succès reproductif qui recouvre les aspects de développement embryonnaire harmonieux et de santé de la descendance repose en partie sur l'intégrité de la chromatine spermatique. Les dommages à l'ADN spermatique sont clairement associés aux échecs reproductifs que ce soit en reproduction naturelle et en procréation médicalement assistée (PMA). Cette revue présente les derniers développements concernant l'organisation très particulière de la chromatine spermatique et ses impacts sur le succès reproductif quand cette organisation est perturbée, en particulier sur le développement embryonnaire et les risques transgénérationnels.

Keywords: Sperm DNA damage, Oxidative stress, Infertility, Developmental impacts

Mots clefs: Dommage à l'AND spermatique, Stress oxydant, Infertilité, Impacts développementaux

Background

In both female and male, the germline is the only heritable lineage that guarantees the continuity of life. Germ cells are generated during gametogenesis, a sex specific differentiation program taking place in the gonads [1]. During this process, male germ cell maturation is characterized by a massive chromatin remodeling and cellular restructuring. This complex process allows the

transformation of diploid spermatogonia into fully cyto-differentiated haploid spermatozoa. Spermatogenesis is highly conserved in mammals and can be subdivided into three major steps: (1) a mitotic amplification step ensuring proliferation and maintenance of spermatogonia, (2) a meiotic step in which spermatogonia evolve into spermatocytes (primary and secondary) ultimately differentiated into spermatids and, finally, (3) a post-meiotic step, also known as spermiogenesis, where spermatids are differentiated into spermatozoa. This last step can be divided into several distinct phases: early spermatids harboring a round nuclei; intermediate spermatids showing an elongated nuclei; and mature spermatozoa

* Correspondence: joel.drevet@univ-bpclermont.fr

¹GREd "Genetics, Reproduction & Development" Laboratory, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, Clermont Université, BP60026 - TSA60026, 63178 Aubière cedex, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

with a condensed nuclei [1]. One of the hallmarks of spermiogenesis is the replacement of nuclear somatic-like histones by protamines (small basic proteins) facilitating compaction of the sperm nucleus and, consequently, of the sperm head. In somatic cells the chromatin is organized in nucleosomes containing 146 bp of DNA wrapped around an octamer of histones [2–4]. Chromatin organization and all its associated modifications, whether it concerns the DNA itself and/or the nuclear histones, are critical for gene expression, cell division, and differentiation [5, 6]. In spermatozoa, during meiotic and post-meiotic phases, most of the histones are gradually replaced by testis-specific histone variants followed by the replacement of most histones, first with DNA-interacting non-histones transition nuclear proteins and, subsequently with protamines [7–13]. Sperm DNA-protamine interaction leads to a unique appearance that involves the coiling of sperm DNA into toroidal subunits, also known as “doughnut loops”, containing 50 to 100 kb of DNA [14, 15]. This structure is the consequence of the presence of high level of arginines and cysteines within protamines that mediates strong DNA binding and the formation of inter- and intra-protamine disulfide bonds critical for the optimal compaction of the paternal genomic material. Sperm nuclear compaction is a crucial factor since it is directly related to the sperm head volume and, therefore to the optimal velocity of this cell, a trait that is important for the success of fertilization. In addition, efficient nuclear compaction is critical for the protection of the paternal genomic material against chemical and physical modifications [16]. The main focus of this review concerns the recent advances in the study of sperm chromatin reorganization, sperm chromatin/DNA damage and how they can affect reproductive outcome.

The male germinal chromatin: a unique and elaborate structure

The somatic chromatin

At the beginning of spermatogenesis, in spermatogonia and in spermatocytes, the chromatin of germinal cells is identical to that of somatic cells chromatin. It consists of a combination of DNA with small basic nuclear proteins, the histones. These proteins are rich in lysine and arginine residues, giving them a global positive charge allowing their interaction with the negatively charged DNA. This interplay neutralizes a large part of the negative charge of the DNA thus facilitating it to fold in on itself and form compact chromatin that is contained within the tiny nucleus of a cell. The nucleosome, the basic unit of somatic chromatin, as mentioned above is composed of a series of 146 bp of DNA wrapped in 1.67 turns around core histone proteins. This unit is made of an octamer of four histone proteins, H2A, H2B, H3, and H4 (each in two copies), the so-called canonical

histones. The full length of the DNA molecule is associated with these nucleosomes and acquires a “beads on a string” structure. A fifth histone, H1, interacts with the DNA sequence bridging nucleosomes and allows for a greater compaction of the chromatin. Histones organize the chromatin into a fiber of 11 nm in diameter, which coils-up upon itself several times into a fiber larger in diameter but shorter in length (for a recent review see: [17]). Each coil corresponds to a new level of organization whose structure is not well understood or controversial because of technical limitations and differences between *in vitro* (ie. diluted chromatin) and *in vivo* (ie. concentrated chromatin) conditions [18–21]. The structure of the chromatin is not homogenous and fixed as it seems. The cell nucleus observed *by* transmitted electronic microscopy (TEM) shows areas of variable density depending on the level of chromatin compaction. Clear and less condensed areas in the center of the nucleus correspond to euchromatin, which is more accessible to protein complexes involved in transcription and then contains more active genes. Dark and condensed areas in the nuclear periphery are called heterochromatin that highly represses gene transcription because of its inaccessibility to the transcriptional machinery. Moreover, these areas are variable in function of the cell types and of the level of cellular differentiation.

The transition between euchromatin and heterochromatin is also based on different processes allowing modifications of the physicochemical properties of histones and DNA. A large part of these changes consists in post-translational modifications (PTM) of histones, occurring principally on their amino-terminal tail protruding from the core nucleosome [22, 23]. To date, different PTMs have been identified, among which histone acetylation, methylation, phosphorylation, and ubiquitination are the most studied. The same histone can be modified on different residues simultaneously and a chemical group can be added up to three times on the same residue, leading to a high number of combinations. Many of these modifications are reversible, giving a great plasticity to chromatin and allowing cells to react and adapt efficiently to their environment. These changes alter the interaction of the nuclear proteins with the DNA and release or condense the chromatin to regulate gene expression and to allow various processes including DNA repair, DNA replication, mitosis, and meiosis. All together these PTM constitute the so-called “histone code” [24–27]. Sperm chromatin remodeling is associated with PTM both before and during the replacement of histones by testicular proteins [8, 17–19]. These histone PTM promote protein-protein interactions such as with the double bromodomain-containing protein Brdt that binds acetylated histone H4 resulting in a more relaxed chromatin structure facilitating histone exchange/removal [19, 20].

During sperm chromatin reorganization, histone exchange, which only supports a supercoiled DNA structure, is accompanied by transient DNA strand breaks that function to relax DNA and eliminate free DNA supercoils formed along the process [24, 25, 28, 29]. These DNA strand breaks have been attributed to the activity of topoisomerase II beta (TOPO2 β) that has the ability to remove DNA supercoiling [30]. DNA strand breaks are recognized by poly(ADP-ribose) [PAR] polymerases, PARP1 and PARP2, which coordinate TOPO2 β -dependent DNA decondensation facilitating histone to protamine exchange [31, 32].

Another level of heterogeneity is signified by the observation that in some cell-types nucleosomes contain histone variants [33]. Each canonical histone corresponds to different histones variants, which are homologous proteins of the same gene family. Sequence identity between a variant and its corresponding canonical histones can vary. For example, H3 shares 96% identity with the H3.3 variant and 46% identity with the centromere-specific protein A (CENP-A), another H3 variant. The different primary amino acid sequences confer to histone variants specific structures and their own physicochemical properties. Consequently, histone variants possess different biological functions when compared with canonical histones. It is interesting to note that most histone variants are testis-specific and only expressed in male germ cells during spermatogenesis. This observation highlights rather well the atypical nature of the sperm chromatin organization.

From a somatic-like chromatin organization to a sperm-specific chromatin organization

During spermatogenesis, germ cells undergo a long process of differentiation to form spermatozoa, highly differentiated cells that consist of a head containing the nucleus and a flagellum allowing them to move towards the oocyte in the female genital tract. This cyto-differentiation process prepares the paternal DNA to be transmitted as a single copy, packaging it tightly to safely withstand the arduous journey in the male and female genital tracts. The transition from a somatic like nucleus to a specific spermatozoa nucleus is a lengthy process that starts during mid-spermatogenesis with the meiosis becoming highly visible afterwards with the great cytological changes accompanying spermiogenesis. Although at the end of the spermiogenesis spermatozoa look completely cyto-differentiated, in reality this does not appear to be the case. In fact sperm structures including the nucleus continue to evolve after spermiation especially during the epididymal transit. The passage from a spermatogonia, a diploid cell, to four haploid spermatids is based on the meiotic process. Like mitosis, meiosis induces the DNA to condense in order to separate

homologous chromosomes and chromatids in identical cells. This remodeling of the chromatin during meiosis is allowed by PTM of histones and by insertion of ubiquitous or testis-specific histones variants. These chromatin modifications take part in multiple steps during meiosis including the condensation of chromatids, the repair of the numerous DNA single strand breaks created for the pairing of homologous chromosomes, the sex (or XY) body formation, the substantial activation of transcription during the pachytene stage, and the formation of the kinetochore facilitated by the Cenp-A variant. The precise function of these chromatin modifications during meiosis is still under study (for reviews on these particular aspects see: [34–36]).

The most striking changes of the male germinal chromatin occur during spermiogenesis. In addition to the great changes of their cell morphology, spermatids also undergo major modifications of their nucleus. Accompanying the marked reduction in cell size, the sperm nucleus volume is also profoundly reduced to approximately 1/7th the size of any somatic cell nucleus. This reduction of the sperm head volume serves two distinct purposes; the acquisition of a more hydrodynamic head shape that will determine the cell optimal velocity, and the protection of the paternal DNA from insult by toxic metabolites. In mammals, to achieve this goal, the chromatin is highly condensed from the periphery to the center and from the apex to the base of the nucleus. Chromatin condensation is due to a deep reorganization of DNA-associated proteins. Initially, various histone modifications and the incorporation of histone variants (in particular, linker histone variants: H1t, H1t2, and Hils) is required to open up the chromatin enabling the exchange of histones with transition proteins (Tnp). This is then followed by Tnp replacement with other basic proteins, the protamines (Prm). Among the histone PTM recorded during spermiogenesis, hyperacetylation and ubiquitination occur simultaneously and appear to play an important role in the histone-protamines exchange. H2A and H2B ubiquitination add a large chemical group to the core histone inducing steric hindrance aiding the chromatin opening. In the meantime, the leftover histone de-acetylases (Hdac) from meiosis prophase I, are degraded [37] resulting in the hyperacetylation of H4 and to a lesser extent of H3 in the entire nucleus. In human, the hyperacetylation consists of a phosphorylation sequence of multiple histone residues in a defined manner that precedes and persists during histone-to-protamine exchange. This process of histone hyperacetylation occurs only in species that utilize histone replacement (trout, mollusks, *Drosophila*, rooster, rodents, human), and not in species that conserve histones in their mature sperm cells. Two modes of action for histone hyperacetylation have been proposed which are not mutually exclusive. Firstly, DNA-histone interaction is

decreased by histone hyperacetylation, allowing the opening of the chromatin and recruitment of factors and proteins. Secondly, bromodomain proteins can recognize and bind hyperacetylated histones. Notably, the bromodomain testis-specific protein (Brdt), is only expressed in male germ cells during the pachytene, the diplotene, the round spermatid, and the elongating phases [38, 39] which coincide with histone hyperacetylation during spermatogenesis. The binding of Brdt to hyperacetylated H4 induces chromatin condensation, independently of ATP [39, 40]. However, this binding also allows the recruitment of Smarce1 [39], an ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling complex, which suggests two alternative mechanisms of action for Brdt: an ATP-dependent and an ATP-independent one.

The transition proteins

In mammals, hyperacetylated histones are first replaced by transition proteins. This is not the case in all species as for example in mollusks; the histone-protamine exchange does not require an intermediary [41]. Transition proteins (Tnp) are small proteins (between 50 and 140 residues), more basic than histones (but still less basic than protamines) and rich in arginine and lysine. Four Tnp are known in mammals but only Tnp1 and Tnp2 have been well studied. Tnp1 and Tnp2 are encoded by two different single-copy genes composed of 2 exons and an intron. In rodents and humans, the *tnp2* gene is part of a cluster along with *prm1*, *prm2*, and *prm3* genes. This cluster is surrounded by 2 matrix attachment regions (MAR) and involved in the transcriptional regulation of these genes during spermiogenesis [42]. The transcription of these clustered genes and *tnp1*, located on another chromosome, occurs at the same time in round spermatids. The corresponding mRNAs are stored as ribonucleoproteins for 3 to 7 days until translation. The proteins involved in this storage recognize the 3'UTR regions of the mRNAs. Moreover, these transcripts possess a long polyA tail (about 150 nucleotides) partially cleaved (around 50 nucleotides remaining) before translation. The Tnp mRNAs are then translated subsequently the Tnp proteins are phosphorylated at their C-terminus. This phosphorylation is a prerequisite for binding to the DNA. It is subsequently removed to increase the Tnp-DNA affinity and the chromatin condensation [43]. Tnp1 protein is 54 amino acids long, composed of 20% lysine, 20% arginine, and no cysteine (except in boars, bulls, and rams) in a highly conserved sequence between species. Tnp1 is strongly expressed and evenly distributed in the nucleus of spermatids. In vitro, Tnp1 decreases the melting temperature of DNA [44], destabilizes the nucleosome-DNA interaction and relaxes the chromatin on addition to nucleosome-binding DNA [45]. Tnp1 also increases the topoisomerase I activity [46] and stimulates single-strand break repair

[47]. In vivo, *tnp1* knock-out in mice did not induce a marked phenotype in sperm nucleus, but was observed to influence fertility [48]. In fact, only 40% of male mice were fertile the litter size was reduced from 7.7 to 1.6 pups/litter when males were mated with females of the same svj129 background. According to the authors, the infertility factor was due to a substantial decrease in sperm motility. In the spermatid nucleus, an abnormal chromatin structure was observed during condensation with the presence of rod-shaped chromatin condensation units in the fine fibrillar chromatin. *In fine*, the chromatin of epididymal spermatozoa was less condensed than in wild-type (WT) mice. The analysis of protein composition in the spermatid nucleus revealed a normal histone withdrawal but an increased incorporation of Tnp2 and a premature production of the Prm2 precursor protein. Moreover, the processing of the Prm2 precursor by cleavage was delayed and stable intermediary forms of Prm2 were detected in cauda epididymal spermatozoa.

Tnp2 is relatively different from Tnp1 in many aspects. This protein is twice as large as Tnp1, with a 117 to 138 amino acids poorly conserved between species. It is composed of 10% lysine, 10% arginine, 5% cysteine, as well as serine and proline. Tnp2 possesses 2 zinc-finger domains in the N-terminal domain and a highly basic C-terminal domain. Its expression levels vary depending on species. In vitro, Tnp2 increases the melting temperature of the DNA and condenses the nucleosome-binding DNA by oligomerization of close DNA strands [49, 50]. In vivo, *Tnp2*-null mice were fertile, however a decrease in litter size was observed (from 7.4 to 3.9 pups/litter; [51]. Epididymal spermatozoa presented flagellar defects and an abnormal chromatin structure that was less condensed than in WT mice, resembling that observed in *tnp1*-null mice. Tnp2 loss was compensated by an increase in Tnp1 expression and maturation defect of the Prm2 precursor (as recorded in *tnp1*-null mice) was observed. The *tnp1/tnp2*-null double mutant mice were found to be infertile [52]. These mice showed a great decrease in epididymal sperm counts, motility, viability, and normal morphology. In addition, the chromatin of the few epididymal sperm cells was weakly condensed. Moreover, in vitro fertilization with these spermatozoa revealed poor fertilizing abilities. Thus, this study underlined that Tnp1 and Tnp2 possess some redundant functions, but cannot fully compensate for one another, suggesting some specificity of function. The opposing in vitro properties of Tnp1 and Tnp2 also support these conclusions.

The protamines

Transition proteins are replaced in their turns by protamines (Prms). These highly basic small proteins are produced by genes evolutionary derived from an ancestral gene that was also at the origin of the histone H1

gene [53]. Over time, the sequence and the structure of the Prms have much diversified between species [54]. Two Prms, Prm1 and Prm2, have been characterized in mammals. Whereas Prm1 is expressed in all mammals, Prm2 is only expressed in some species such as primates, certain rodents, rabbits, hares, and horses. Although pigs and bulls possess a *prm2* gene, it is not functional. *Prm1* and *prm2* are composed of 2 exons and an intron, as is the case for the *tnp* genes. As indicated already above, in rats, mice, and humans, *prm1* and *prm2* form a cluster with *tnp2* and a third *prm* gene, *prm3*. *Prm* genes are expressed at the same time in round spermatids and the corresponding mRNAs are stored and inactivated for around 10 days, until the elongating stage, by the same processes than those described for Tnp mRNAs (for reviews see: [43, 55, 56]). It should be noted that *prm3* encodes a small cytoplasmic acidic protein, not involved in the process of spermatid chromatin condensation [57]. As Tnps, Prms are phosphorylated immediately after mRNA translation, during the translocation of the proteins into the nucleus. This PTM is necessary for DNA binding, but is removed afterward, increasing the Prm-DNA affinity and the chromatin condensation. Prm1 is translated as a mature protein of about 50 amino acids, composed of an arginine-rich central domain and of cysteine-rich short domains. The N-terminal tail possesses some serine residues, which are phosphorylation sites involved in Prm1 incorporation in the spermatid chromatin. For its part, Prm2 is synthesized as a precursor protein of about a hundred amino acids. Poly-arginine domains are interspersed throughout the mature Prm2 and the content in histidine is higher than in Prm1 (up to 20 and 5% or less, respectively; [58]). As with Prm1, Prm2 is rich in cysteines and is also phosphorylated immediately after its synthesis enabling it to bind to DNA. The DNA-bound Prm2 is progressively matured by successive proteolytic cleavages of its N-terminus, a process that takes several days, increasing chromatin condensation step-by-step. This maturation process eliminates about 40% of the N-terminal domain of Prm2. In mice and humans, six cleavages are necessary to produce a mature protein of about 60 residues long. However, some of the intermediate products can persist in the mature sperm nuclei [59, 60]. Finally, another important difference between Prm1 and Prm2 is the ability of Prm2 to bind zinc. It is hypothesized that the zinc complex will participate in the final condensation of the sperm nucleus, protecting a number of protamine thiol groups from oxidation and thus limiting the formation of intra- and inter protamine disulfide bonds [61]. However, zinc is particularly enriched in the seminal plasma while disulfide-bridging of protamine thiols is a process taking place during epididymal maturation suggesting that the later is likely to

be the prominent process driving the final state of compaction of mature spermatozoa (see below).

The final structure of the sperm chromatin

The histone-protamine exchange during the elongating phase of spermiogenesis drastically modifies the structure and the spatial organization of the sperm chromatin. At the end of this process, the sperm chromatin is 6 to 7 times more condensed than in the nucleus of any somatic cells. The high level of sperm DNA condensation almost resembles a crystalline structure, with little room to accommodate even water molecules. The compact structure shields it from mechanical shearing and chemical stressors that may have mutagenic effects. This is particularly important because mature spermatozoa are devoid of any functional DNA repair machinery (see below). Thus, it will be the task of the oocyte after fertilization and prior to the first division of segmentation to repair the paternal DNA in the newly decondensed male pronucleus [62]. Although the processes of sperm nuclear condensation and chromatin reorganization are considered essential, our knowledge of the structural intricacies of the sperm nucleus is scarce. Although it should be pointed out that the sperm nucleus is a highly ordered structure that is well conserved from one sperm cell to another as well as from one individual to another, the organization of the mature sperm nucleus however appears to be species-specific, limiting the ability to translate findings from mouse or bovine to human.

The basal unit of the sperm chromatin and its conformation

The nucleoprotamine structure constitutes the basal unit of the sperm chromatin. The Prms and their interaction with the DNA were first studied in salmon and bull [16, 63]. Unfortunately, no detailed crystallographic data are available as the DNA-Prm complex is insoluble. As shown by Raman Spectroscopy, when Prm1 is free in solution, the protein is unfolded, [64]. Prm1 acquires a stable conformation only when it is bound to DNA. Prm1 wraps around the double stranded DNA in one groove of the double helix *via* electrostatic and hydrogen bond interactions with the DNA backbone. Although, most studies conclude that Prm1 binds to the major groove of the DNA [65, 66], some studies report that it also binds to the minor groove [67]. The interaction of one Prm1 *per* turn of the DNA helix covers about 11 bp [68] allowing the DNA to curve in a conformation unique to the sperm chromatin. After binding, due to the presence of numerous cysteine residues contained in protamines, intramolecular disulfide bridges are initially formed to stabilize the Prm1-DNA interaction. Subsequently the intermolecular disulfide bridges formed between Prms trigger the adjacent DNA fibers to come closer for a tighter compaction of the

sperm chromatin. Atomic force microscopy studies revealed that the addition of bull Prm1 to a free linearized plasmid DNA on a mica surface prompts its condensation into a toroidal structure, called a toroid [69]. Other experiments showed that around 50 kb of DNA can be coiled into a salmon protamine toroid [70]. Toroids were also observed in native human sperm chromatin [71]. The toroid is therefore considered as the first level of organization of the sperm chromatin (see Fig. 1). Similar properties were found for Prm2-DNA interaction with the addition that zinc ions participate in the interaction. Prm2 binds zinc *via* its cysteine residues with one zinc ion mobilizing 4 cysteine residues. The amount of zinc associated to Prm2 is important since it was reported that there is an equimolar ratio of zinc and Prm2 in human sperm [68]. The zinc-mediated thiol bridges then stabilizes the Prm2 and the sperm chromatin complex [61]. These observations are in agreement with the role associated with zinc in male fertility [61]. It is therefore evident that a fine balance is present between the

number of protamine cysteine residues involved in disulfide bridges versus the number of cysteine residues chelated by zinc. This balance is directly linked to the sperm nuclear content in protamines since Prm1 cysteine residues are involved in disulfide bridges while Prm2 cysteine residues are involved in zinc chelation, thus preventing these residues to form disulfides. These observations explain why the sperm nucleus condensation is both sensitive to the redox status and to zinc availability. High levels of zinc will reduce disulfide bond formation leading to a less nuclear compaction while lower concentration of zinc will promote disulfide bridging resulting in a tighter nuclear compaction. Although a tighter sperm nuclear condensation could be perceived as beneficial, it may not be the case since after fertilization a highly condensed paternal DNA will require more time and more energy to be decondensed. Similarly, the redox environment may influence protamine disulfide bridging events consequently sperm nuclear condensation. Thus, we postulate the existence of a fine

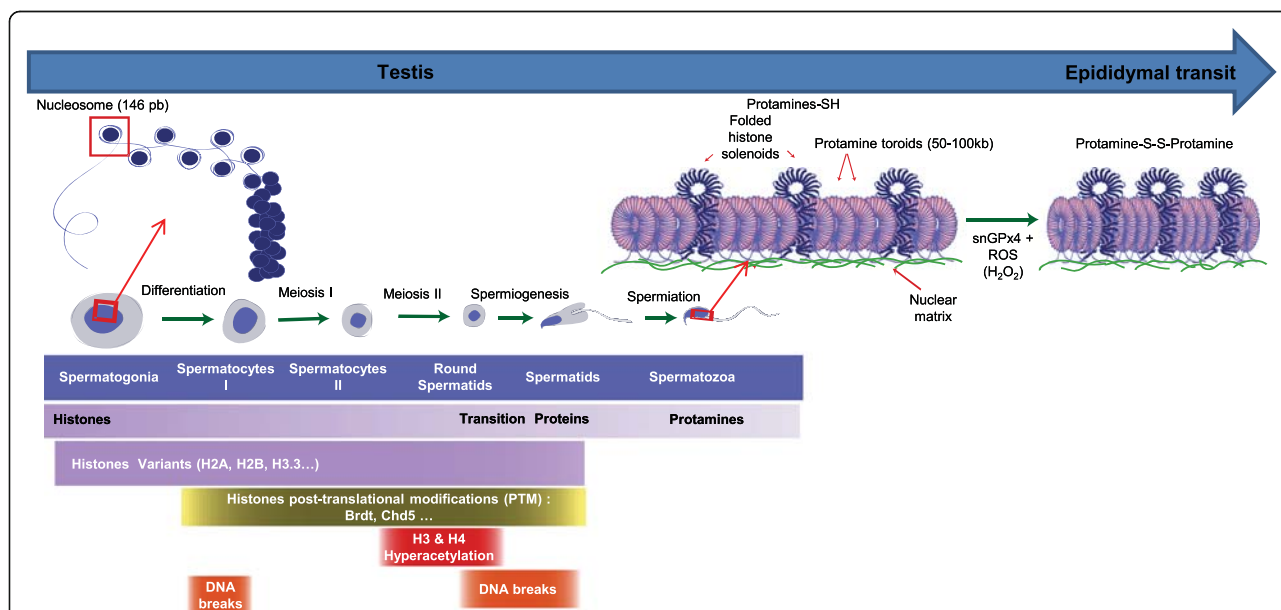


Fig. 1 Schematic representation of the testicular and epididymal events leading to the drastic change in sperm chromatin organization. In testes, spermatogenesis permits to transform diploid spermatogonia into haploid spermatozoa. Spermatogenesis can be subdivided into three major steps: a mitotic amplification which ensures the proliferation and maintenance of spermatogonia, a meiotic step in which spermatogonia undergo to form spermatocytes which differentiate into spermatids and a post-meiotic step also known as spermiogenesis which makes spermatozoa. During spermiogenesis, the round spermatids undergo several morphological and biochemical modifications characterized by the acquisition of final nuclear shape and the replacement of somatic type histones by protamines. Histones that organize the DNA (146 pb) into nucleosomes are gradually replaced by testis-specific histone variants, and sudden post-translational modifications (for example hyperacetylation), followed by the replacement of most histones by at first by DNA interacting non histones, then by transition proteins Tnp1 and Tnp2 and finally by protamines (Prms). Sperm DNA-protamine interaction leads in a unique appearance that involves the coiling of sperm DNA into toroidal subunits, also known as "doughnut loops", that contain around 50 kb to 100 kb of DNA. At the end of spermatogenesis a fraction of the sperm chromatin is still in nucleosomal arrangement. Remaining histone-containing nucleosomes (folded histone solenoids) punctate the toroidal chromatin structure. In addition, the small linker DNA strands going from one toroid to another are also associated with histones. At some locations, these histone-associated strings of DNA are bound to the sperm nuclear matrix. During post-testicular epididymal maturation of spermatozoa, the nucleus is further condensed by means of intense disulfide bridging. A nuclear enzyme (sperm nucleus glutathione GPx4 = snGPx4) working as a disulfide isomerase uses luminal reactive oxygen species (ROS), essentially hydrogen peroxide (H₂O₂) to create inter- and intra-protamine disulfide bounds on thiol groups carried by the cysteine-rich protamines. It further condenses the sperm nucleus and locks it up a condensed state

equilibrium that is critical for optimal sperm nuclear condensation and zinc concentration. The high level of zinc found in the seminal plasma may therefore limit further disulfide bridging events in the sperm nucleus during its journey up to the fertilization site in the female genital tract.

Practically, in high salt conditions and with the use of a reducing agent such as dithiothreitol (DTT) protamines can be extracted from the nucleus of epididymal spermatozoa because of the reduction of the disulfide bridges. This treatment promotes the formation of a halo of DNA loops exiting the sperm nucleus. This halo can be viewed after ethidium bromide staining and its measurement in hamster revealed that average loop length were around 46 kb [72]. This estimate is close to the 50 kb or so of DNA found associated with a toroidal structure of protamines as observed *in vitro* when using plasmid DNA and salmon protamine [70]. Of note is the fact that with human sperm cells the halo revealed a DNA loop size of about 27 kb [73].

The sperm nuclear matrix The formation of a DNA halo around the sperm nucleus after protamine extraction suggests that the DNA loops arranged around the toroids are attached to an internal nuclear scaffold. Ward and colleagues have proposed that the toroids are associated with a protein-rich nuclear matrix. They showed that the DNA strands linking 2 neighboring toroids are sensitive to nucleases (DNAse I, topoisomerase II β , restriction enzymes...), as is the case for the matrix attachment regions (MAR) in the nucleus of somatic cells [74]. In addition, in the sperm nucleus of hamsters, mice, and humans, the same authors isolated, as part of the nuclear matrix, a protein structure bound to specific DNA sequences [73, 75, 76]. This structure is called the nuclear annulus because of its curved ring shape. It is located at the base of the sperm nucleus at the implantation fossa, the junction between flagellum and sperm head. Further studies revealed that sperm nuclear MARs differ from somatic nuclear MARs. As an illustration, in hamsters, MARs found in the region of the rRNA 5S gene cluster were compared between somatic and sperm cells using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in histone- and Prm-depleted halo nuclei [77]. This gene cluster is organized into a single large DNA loop in liver and brain somatic cells, whereas it forms three short DNA loops in sperm cells. Sperm MARs may therefore not be equivalent to somatic cell MARs. As mentioned above for the *Prm-Tnp* gene cluster, the sperm MARs are involved in the regulation of gene transcription in spermatids during spermiogenesis. This may also be the case in the paternal pronucleus of the zygote after fertilization. Additional research in mice underlines the importance of the physical association between these

DNA sequences and the sperm nuclear matrix for the paternal pronucleus formation and the first cycle of DNA replication in the zygote [78, 79]. Data suggest that the zygotic origins of replication are located in sperm MARs, as already shown in somatic cells [80, 81].

Persisting nucleosomes in sperm Several reports have shown that histones could be found in mature sperm in variable quantities depending on the species. For example, it was estimated that around 1% of the sperm DNA is still associated with histones in mice, hamster, stallion, and bull spermatozoa [82–84] while it may go up to 10–15% in human sperm [85]. More recent immunoprecipitation studies (yet to be published) narrowed this difference down and reported that in human sperm persisting histones constitute about 5 to 7% of the DNA sequences. This is still substantially more than the other mammals studied to date. The reason for the higher percentage of histones in humans sperm is not yet understood. Some authors suggest an inefficient spermatogenetic program in human as a possible reason. Others postulate that human sperm needs to maintain more paternal chromosomal regions to be readily accessible for the onset of the developmental programme post-fertilization. Initially considered as remnants of an incomplete histone replacement process during spermatogenesis these persisting histones are now considered critical for the early transcriptional reactivation of the paternal genome [86, 87]. This notion is backed by the observation that the persisting histones in sperm can be found in the zygote [88].

The presence of paternal persisting histones after protamine-histone exchange, fertilization followed by decondensation [89, 90] may reveal an important functional role for these proteins in the early embryo development [91, 92].

In mice and human spermatozoa, immunocytochemical approaches reveal localized histones at the periphery of the nucleus as well as in the post-acrosomal and basal domains of the sperm head [93–95]. The basal localization of the histone signal resembles that of the nuclear annulus [75]. This structure is seen as a component of the sperm nuclear matrix, acting as an anchor for the sperm DNA *via* the sperm MARs (localized among toroids) and the histone-rich telomeres [94, 96]. In mouse sperm we recently reported that nuclear domains rich in matrix proteins are also histone-rich regions of lower compaction [95, 97].

The fact that specific locations in the mature sperm nucleus house these histones supports the notion of an ordered process for the maintenance. This is backed by genome-wide analyses including chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies, DNA microarrays and

high-throughput sequencing revealing organized specific regions in mouse and human sperm. Nucleosomes were found enriched in 2 types of genomic regions. One region concerns large areas of DNA up to 100 kb in length that punctuate the protamine-associated chromatin (see Fig. 1). Ward [98] suggested that these segments of DNA are organized in a less condensed state with a solenoid-like conformation resembling the somatic chromatin. Additionally, high histone levels were found in interspersed short DNA sequences (around 1 kb-long) that correspond to the small DNA linkers bridging toroids together [95, 97, 98]. Interestingly, the latter regions were also reported to be associated with the sperm nuclear matrix [95, 97, 98]. ChIP studies utilizing histone antibodies to recover the histone-associated DNA sequences in mature sperm revealed histones to be significantly enriched at the promoters of: genes coding for microRNAs, genes involved in early embryonic development (e.g. transcription factors, HOX genes, signaling protein, etc...), genes subjected to genomic imprinting, and genes involved in spermatogenesis [99]. However, conflicting data from different groups showed that persisting histones were associated with intergenic sequences outside of the gene regulatory regions [95, 100]. To date, there is no consensus as to what specific DNA sequences in sperm are associated with nucleosomes. This is essentially due to the way DNA sequences were recovered from mature sperm during the ChIP assays. Due to the extreme difficulty in recovering mature sperm DNA associated with the intrinsic properties of the compacted nucleus, strong reducing conditions are required to obtain the halo sperm phenotype followed by micrococcal nuclease (Mnase) digestion to retrieve the long loops of DNA exiting the sperm nucleus. The soluble DNA fraction is then separated from the insoluble portion that also contains the nuclear debris. This operation leads to the recovery of sperm DNA sequences associated with histones which mainly corresponds to the solenoid regions embedded within the toroids of protamines (see above). Following this type of sperm DNA retrieval protocol it is not possible to recover the sperm DNA associated with the nuclear matrix as it is discarded during the preparation. However, with more aggressive sperm DNA retrieval conditions such as sonication, it is possible to obtain some of the histone-associated DNA sequences attached to the sperm nuclear matrix. The use of different extraction techniques may thus explain the present discrepancy in the literature of sperm DNA histone-associated sequences in the species that have been investigated.

Another important question is why peripheral regions of the mature sperm nucleus maintain association with histones? Due to their lower state of compaction and

their peripheral localization, these nuclear domains will be the first ones to be susceptible to DNA damage from external stressors. So what is the evolutionary reason for the maintenance of such regions of fragility? One reason could be that these peripheral regions are the first ones targeted by the oocyte-driven centripetal decondensing processes of the sperm nucleus after fertilization. Accordingly, these regions may have to be retained in a pre-decondensed state either to facilitate the decondensation process or/and to remain transcriptionally active very early in the zygote developmental program. Regardless of the reasons, the paternal DNA present in these peripheral less tightly packed regions of the sperm nucleus will be more likely to incur damage. This observation has been verified experimentally in transgenic mouse models where it was observed that the regions sensitive to high post-testicular oxidative damage match the distribution of nucleosomes [95, 98].

A more detailed analysis of histone variants in these loci, where histones are maintained, showed a precise distribution of these epigenetic marks. For example, the testis-specific H2B variant (TH2B) was found enriched in the promoters of genes involved in sperm cell maturation, function, capacitation and fertilization, but never in the promoters of genes controlling embryonic development [89]. As another example, the H2A.Z variant was mainly found in pericentromeric heterochromatin domains [101]. Conversely, the promoters of developmental transcription factors genes were found enriched in H3K4me2 marks (transcriptionally permissive marks consisting in dimethylation of histone H3 on lysine 4) while H3K9me3 marks (transcriptionally repressive marks consisting in trimethylation of histone H3 on lysine 9) were not found localized near genes, but in pericentromeric genomic regions [99]. In conclusion, histone content and PTM of these paternal-borne nucleosomes represent distinct epigenetic characteristics that are unique to the sperm nucleus. Notably, protamines (Prm1 and Prm2) also carry multiple PTM that have led some authors to propose that like the somatic cell "histone code", there might also be a sperm "protamine code", unique to the sperm nucleus [102]. Thus, PTM of sperm persisting histones as well as protamines may constitute a complex epigenetic signature driving embryo development and potentially transgenerational inheritance, as persisting paternal histones may be transmitted to the next generation.

The sperm chromosomal organization Additional studies provide further evidence for the highly conserved sperm chromatin organization at the chromosomal level in the sperm cells of the same individual but also across the individuals of the same species. Studies over the last two decades with the FISH technique applied to sperm

cells revealed distinct positioning of the chromosomes in the nucleus. Indeed, in humans, the centromeres of chromosomes are localized in the center of the sperm nucleus, whereas the telomeres are at the periphery [103] where they can dimerize. The use of fluorescence in situ hybridization (FISH) probes for each arms of the same chromosome showed the q- and t-arms co-localize in the same region of the sperm nucleus. It was proposed that the two arms of a chromosome interweave or juxtapose in an anti-parallel manner. In this way, each chromosome has a hairpin structure on a center-periphery axis [104]. Moreover, the chromosomes are not tangled and their position relative to each other appear to be specific occupying a precise location in the sperm nucleus. Statistically, the relative localizations of autosomal and sex chromosomes are preserved between sperm cells of an individual and within the species [105–107]. In humans, the organization of several chromosomes (namely chromosomes 17, 1, X, 19, Y) was partially established along the antero-posterior axis of the sperm nucleus [107, 108], however, to date there is no complete location mapping of all the chromosome in one species.

Sperm nuclear/DNA alterations have many faces

Chromatin defects

There is a growing body of evidence supporting the hypothesis that sperm chromatin integrity is an important factor in determining reproductive success. Disruption and alterations of sperm chromatin organization have been associated with various developmental impairments as well as post conception issues such as increased miscarriages, increased perinatal mortality and increased susceptibility to pathologies in the progeny [109–112]. As already described, chromatin compaction in sperm nucleus is a long and complex process leading to a nucleus approximately 7 times smaller than a somatic cell nucleus. Sperm nuclear compaction involves a major and a minor step. The major step involves the replacement of histones by protamines during spermiogenesis and, the “minor” step (relative to the modifications introduced to the sperm nucleus), occurs during epididymal maturation. The latter step involves inter- and intra-protamines cross-linking through formation of disulfide-bonds by numerous thiol groups present in protamines. In each of these compartments (testicular or epididymal) defects may alter sperm nuclear organization and essentially its compaction.

Chromatin defects occurring during spermatogenesis

There are numerous ways in which the sperm nuclear structure could be compromised frequently resulting in local or global abnormal sperm nuclear condensation. When local, it is often associated with nuclear vacuoles usually visible at high magnification (above x6000)

depending on their size and number. It is now well accepted that these sperm head vacuoles are indeed nuclear in nature and relate to local impairment in nuclear condensation [113, 114]. Local defects in protamination are likely the cause, however, even with the phenotype characterized, the mechanisms involved are not well understood and requires further research. To avoid the selection of spermatozoa with vacuoles for IntraCytoplasmic Sperm Injection (ICSI) procedure, some clinicians now recommend the use of differential interference contrast microscopy (also called Normarski contrast) that allows the observation of live sperm at high magnification. The use of the Motile Sperm Organelle Morphology Examination (MSOME) technique allows the detection of sperm head vacuoles that otherwise would go unnoticed at the regular magnification (x300) used in routine for the selection of sperm for ICSI. However, the use of this protocol in improving ICSI outcome is not yet confirmed due to the paucity of comparative studies [115–121]. Indeed only a few studies comparing the results of IMSI (Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) with regular ICSI have been reported with the blastocyst implantation rate, miscarriages and birth rates as the end points. The sole indication of the presence of chromatin defects that prevails to date is when clinicians face recurrent implantation failures while performing ICSI [122]. The drawback of such sperm selection protocols is the time they require and the exposure of sperm to bright light and media that may lead to oxidative DNA damage.

In addition to these local alterations of the sperm nuclear condensation, there are instances of global sperm nuclear decondensation. These may have several causes such as defective protamination and excessive DNA fragmentation. The latter may be due to unrepaired meiotic strand breaks, mechanical shearing during the cytodifferentiation step at spermiogenesis, or/and the result of oxidative damage essentially in response to environmental conditions (chemical and physical stressors). To better understand the histone to protamine exchange process and the importance of an optimal sperm chromatin organization and compaction on male fertility, different mutant mice were generated. Mice deleted for the two poly(ADP-ribose) polymerases (Parp1 and Parp2), essential proteins involved during the replacement of histone by Prm, are infertile and show increased amount of histones in spermatocytes along with reduced sperm chromatin condensation [123, 124]. Mice knockout for Brdt (Bromodomain-containing protein) which recognizes hyperacetylated histones allowing their replacement by transition proteins (Tpn) are also infertile. They present a severe reduction both in sperm counts and sperm motility associated with high percentage of sperm morphological abnormalities including misshaped heads and failure of nuclear condensation [125]. A similar phenotype was

observed in the chromodomain helicase DNA binding protein 5 (Chd5) mutant mice. This was not a surprise since Chd5, similarly to Brdt, orchestrates histone replacement, histone H4 hyperacetylation, histone variant expression and nucleosome eviction [126]. It is worth noting that CHD5 was found highly expressed in the human testis during spermiogenesis and that low CHD5 expression was associated with some human infertile situations [126]. Another knockout model, the *rnf8*^{-/-} mouse, associates sperm chromatin compaction defect with male infertility. Rnf8 is a ubiquitin E3 ligase that ubiquitinates in particular histones H2A and H2B. This PTM appears to promote histone H4K16 acetylation, a critical modification for the replacement of histones by protamines during spermiogenesis. As a consequence, rounded germ cell nuclei of *Rnf8*-deficient male mice contained histones but no Prm leading to severely impaired sperm chromatin compaction. In addition, Tnp1 and Tnp2 levels were dramatically reduced and a mild elevation of germ cell apoptosis was recorded in both testes and epididymis. *rnf8*^{-/-} sperm also displayed abnormal rounded heads and retained residual cytoplasm [127]. Likewise, Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice present with fertility problems associated with abnormal sperm chromatin condensation due to incomplete protamination, a decrease in sperm count as well as a decrease in sperm motility [128]. With respect to the mammalian protamines Prm1 and Prm2, we have seen above that the incorporation of these two proteins into the sperm chromatin is strictly regulated, resulting in a species-specific, tightly controlled Prm1/Prm2 ratio. In human sperm the ratio of PRM1/PRM2 is approximately equal (1:1) in fertile men whereas it was found to be displaced in some infertile situations [129–131]. Patients with altered P1/P2 ratio were shown to be more likely to display decreased sperm concentration, decreased motility, a higher frequency of abnormal sperm morphology and an elevated level of DNA damage. In mice, the knockout of Prm1, Prm2 or both is associated with infertility and non-functional spermatozoa showing abnormal morphology, reduced sperm counts and motility as well as increased DNA fragmentation [57, 132–134]. Recently, Prm1-deficient female chimeric mice carrying Prm1-deficient oocytes were generated. These mice successfully produced Prm1(+/-) male mice. Via in vitro fertilization (IVF) healthy Prm1(+/-) offspring were produced demonstrating that spermatozoa lacking Prm1 can fertilize and produce viable embryos. However a detailed survey of the offspring showed modification in expression profiles [135].

Chromatin defects due to chromosomal abnormalities

Sperm aneuploidy originates from segregation errors during the meiotic divisions of spermatogenesis, though the exact causes of sperm aneuploidy are unknown. Perrin et al. [136] found that men with structural chromosomal

abnormalities (reciprocal translocations, Robertsonian translocations and pericentric inversions) had higher rates of DNA fragmentation than men without abnormal karyotypes. DNA fragmentation was significantly correlated with the percentage of aneuploidy in chromosomes X, Y, 13, 18 and 21 [137]. Muriel et al. [138] and Enciso et al. [139], have confirmed these findings and shown that sperm aneuploidy may lead to an increase in sperm DNA damage. This is consistent with the fact that sperm DNA integrity partly depends on the structural organization of the sperm nucleus and that chromosome alterations may lead to local architecture modifications [140]. To date, it is not clear whether DNA damage and aneuploidy in sperm are causally linked or associated by a common mechanism of damage, or if it is just the consequence of a disrupted nuclear architecture [141]. It should be noted that recent findings report that chromosome structural aberrations (disomy, translocation) found in the offspring can be also caused by the oocyte attempt to repair DNA alterations accumulated on sperm DNA after spermatogenesis [142].

Post-testicular chromatin defects

Leaving the testes, spermatozoa are not completely mature both at the structural and functional levels. Amongst the numerous modifications that occur on spermatozoa while going down the epididymal tubule up to the storage compartment one concerns the completion of the sperm nucleus compaction. We and others have demonstrated that during the epididymal journey, the sperm nuclear protamines rich in cysteine thiol-containing residues are modified by oxidative events resulting in the formation of intra and inter-protamine disulfide bridges. This nuclear process requires the activity of an enzyme located in the sperm nuclear compartment, the snGpx4 protein (sperm nucleus glutathione peroxidase 4, [143]) that uses hydrogen peroxide (H₂O₂) to make disulfide bonds, thus working as a disulfide isomerase. There is now a large body of evidence showing that a finely tuned level of oxidation is required to further condense the sperm nucleus. Absence of *sngpx4* induces a delay in post-testicular sperm nuclear compaction with abnormal chromatin condensation and sperm head fragility when cells are eventually challenged by mild reducing conditions, resulting in a giant head phenotype [143, 144]. We have shown earlier that in mouse an epididymal luminal scavenger, the glutathione peroxidase 5 protein (Gpx5) is critical in this post-testicular disulfide bridging process since it contributes to fixing the optimal H₂O₂ concentration in the epididymal fluid [145]. Consequently it also determines the optimal level of disulfide bridging on the sperm nucleus [146]. When Gpx5 is absent (in *gpx5*^{-/-} animals) it results in DNA oxidative damage, mainly to the sperm

nucleus, a cell compartment that is difficult to protect even though the epididymis of *gpx5*-deficient animals does it best to limit the increase of luminal oxidative attacks on the sperm plasma membrane [145]. Sperm DNA oxidation was associated with reproductive failures including an increase in miscarriages, an increase in abnormal embryonic development and an increase in perinatal mortality. When both *sngpx4* and *gpx5* were knocked out we recorded cumulative effects on sperm cells that show both nuclear susceptibility to decondensation and nuclear oxidation [144]. Therefore, when the testis is not at the origin of the defect, the sperm nuclear condensation can also be challenged in its post-testicular life especially during epididymal transit where oxidative processes are at work to complete it [146, 147]. Any disruption of the oxidative balance in or around sperm cells in their post-testicular life may thus affect the level of nuclear condensation. Oxidative stress, but also reductive stress, may end-up having the same effects on the sperm nucleus state of condensation. Excessive oxidation while it may serve nuclear condensation at first will lead to DNA fragmentation, resulting ultimately in decondensation [148]. Reductive stress will destroy the disulfide bridges sticking the nuclear protamines together and therefore will result in decondensation of the sperm nucleus [148].

DNA damage

The most well known and measured sperm DNA damage is DNA fragmentation or DNA strand breaks (DSB). DSBs, either single strand break (SSB) and double strand breaks (DSB), can occur during sperm generation or/and during the post-testicular journey. In the testicular compartment it may be the result of apoptosis, defective DNA repair mechanisms, mechanical shearing as well as the result of oxidative attacks. In the post-testicular compartment DNA strand breaks essentially originate from oxidative attacks.

Germ cell apoptosis and DNA fragmentation during spermatogenesis

Apoptosis is a major feature of male germ cell development. Apoptosis is used as a mechanism for the removal of damaged germ cells from seminiferous tubules so that they do not continue to differentiate into spermatozoa. During spermiogenesis, Sertoli cells are responsible for the induction of apoptosis in 50 to 60% of all germ cells that enter meiosis. Germ cells marked with apoptotic markers of the Fas type are eliminated by the Sertoli cell *via* a phagocytic process [149, 150]. However, this mechanism may not always operate efficiently and a variable percentage of apoptotic germ cells enter the process of sperm remodeling and appear later in the ejaculate. They present DNA strands-breaks associated to the apoptotic

process (=abortive apoptosis). Apoptosis during spermatogenesis has been suggested to play a role in the etiology of spontaneous male infertility in light of the excessively high numbers of apoptotic germ cells observed in the testes of some infertile males [151]. In addition, apoptotic markers including caspase activation and phosphatidylserine exteriorization have been detected in mature spermatozoa from infertile males [152]. Besides the apoptotic process there is another way by which DNA fragmentation may occur during spermatogenesis. During spermiogenesis it was shown that chromatin packaging requires endogenous nuclease and ligase activities to create and ligate nicks that facilitate the protamination step. McPherson and Longo [153] hypothesized that the presence of high level of DNA nicks in ejaculated sperm may be indicative of impaired spermiogenesis [153]. These nicks are thought to provide relief of torsional stress to support chromatin arrangement during the displacement of histones by the protamines [154]. If not repaired completely in a timely manner they may affect sperm chromatin packaging and render spermatozoa more susceptible to post-testicular damage. As an illustration, mice deficient for poly(ADP-ribose) show a high level of unrepaired DNA nicks that are associated with male infertility [31].

Sperm DNA fragmentation induced by Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS are natural products of cellular metabolism. In physiological concentrations, sperm cells require ROS at different moments of their life. During epididymal maturation ROS (especially H_2O_2) participates in the processes of sperm maturation (disulfide bridges on sperm proteins). ROS are also required for successful oocyte fertilization acting as second messengers in the capacitation processes including hyperactivated motility and acrosomal exocytosis. However, when ROS generation exceeds ROS recycling it contributes to a large proportion of instances of male infertility [155, 156]. ROS target the polyunsaturated fatty acid (PUFA) rich sperm plasma membrane altering membrane fluidity and mitochondria functions resulting in impaired mobility and decreased fusogenic capacity with the oocyte. ROS, especially hydrogen peroxide (H_2O_2) may also reach the sperm nucleus leading to oxidative DNA damage that may lead to mutagenic effects which may be transmitted. There are many common situations that may lead to sperm exposure to ROS whether it is secondary to aging, environmental factors (exposures to toxicants, drugs, UV, ionizing radiations, heat...), pathological situations (infection, inflammation, metabolic disorders...), lifestyle (unbalanced diet, smoking, alcohol addiction...) [157–162]. In addition, sperm exposure to ROS may happen during assisted reproductive technologies (ART) procedures for example

during sperm cryopreservation, exposure to culture media or sperm handling during selection processes, especially for ICSI (intracytoplasmic Sperm Injection) [163]. As we have seen above, because ROS and especially H_2O_2 are such important contributors to the completion of the sperm nucleus compaction during epididymal transit and beyond, it is no surprise to find them involved in nearly all situations of defective spermatozoa.

Oxidative alterations of cellular components are a very common problem of aerobic cells which are usually well-equipped in enzymatic and non-enzymatic primary and secondary antioxidants to deal with it. Oxidative alterations can affect the nuclear compartment of any cells, especially because reactive oxygen species such as H_2O_2 can freely pass through plasma membranes. When this happens and when ROS reaches the nucleus it may be at the origin of modified bases, abasic sites, chromatin protein cross-linking and DNA strand breaks (both single and double) depending on the intensity of the oxidative attack [148]. In any somatic cell as well as in an oocyte, the base excision repair (BER) pathway will replace these oxidized bases by non-oxidized bases correcting the alterations. Mature sperm cells cannot do that as they have been shown to lack the necessary equipment [62]. Only the first player of the Base Excision Repair (BER) pathway, the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (Ogg1/OGG1) was shown to work in rodent and human spermatozoa [62]. OGG1 activity marks the oxidized base to be removed [62]. Sperm cells will then rely on the oocyte BER equipment that will correct the paternal genome after fertilization upon the decondensation step of the male pronucleus and before the first division of segmentation. The consequence of sperm DNA damage with respect to normal embryo development is therefore the result of an equilibrium between the extent of nuclear oxidation and the DNA repair capacity of the oocyte [164, 165]. It has been shown that the zygote responds to sperm DNA damage through a non-apoptotic mechanism that acts by slowing paternal DNA replication and ultimately leads to the arrest of embryonic development [164, 166–168]. After induction of DNA oxidative damage on Rhesus sperm using xanthine and xanthine oxidase, Burruel et al. [169] have shown that ICSI-produced embryos present severe fragmentation, multi-nucleation, and early cell arrest essentially around the four-cell stage. Because of this inability to repair its DNA the mature spermatozoa is very sensitive to DNA oxidative alterations. Paradoxically, mature spermatozoa are prone to suffer oxidative attacks because they harbor a peculiar plasma membrane rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) that is highly susceptible to ROS. When oxidized in situations with an excess of ROS or weakness in the antioxidant protective activities, these PUFA will amplify the generation of ROS in a vicious

oxidative stress circle [170]. In addition, even-though they are most sensitive to oxidative stress we have seen above that mature spermatozoa are physiologically exposed to ROS. We, and others have demonstrated that part of their post-testicular (ie. epididymal) maturation step utilizes a finely tuned concentration of H_2O_2 to complete the condensation of the sperm nucleus *via* disulfide bridging events on the thiol-containing protamines. How relevant sperm DNA oxidation is with respect to male infertility is difficult to say at this stage in the absence of clinical trials in which the level of sperm DNA oxidation is correlated with reproductive success. However, there are recent reports suggesting that it is a major concern since it was shown that over 60% of male entering ART programs present medium to high levels of sperm DNA oxidative alterations [171]. The oxidized base adduct, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) has been used in studies to demonstrate that oxidative DNA damage is significantly elevated in the spermatozoa of patients attending infertility clinics [172]. Robust clinical trials are necessary to correlate reproductive success with sperm DNA oxidation.

A common belief is to think that sperm nuclear fragmentation is always associated with sperm nuclear oxidation. Although this is true when the oxidative stress around sperm cells is high, in many situations a mild oxidative stress will not lead to sperm DNA fragmentation. Therefore, one cannot simply say that there is no sperm DNA oxidative damage by assessing the level of sperm DNA fragmentation. This is clearly demonstrated in transgenic animal models having medium sperm DNA oxidative alterations that are not associated with DNA fragmentation [145]. In these models the level of sperm DNA oxidation is sufficient to lead to reproductive failures when transgenic males are crossed with WT females [145]. The reproductive problems recorded ranged from increased miscarriages, increased abnormal development and increased perinatal mortality, all classical issues in reproductive defects both in natural and artificial reproduction.

Other discrete sperm nuclear alterations

Beside the above-mentioned issues, there are other more subtle sperm DNA/nuclear alterations that may affect reproductive success and the health of the progeny. Apart from oxidation, sperm DNA as in somatic cells may suffer damage affecting nitrogenous bases. While somatic cells are able to repair to a certain extent these altered bases, the highly condensed sperm chromatin cannot. These chemical modifications of nitrogenous bases (alkylation or oxidation) affect mainly the guanine bases. It includes the alkyl DNA adduct known as N7-methyldeoxyguanosine (N7-MedG). N7-MedG is a biomarker signifying environmental exposure to alkylating

agents either from diet (industrially processed and preserved foods), well-cooked meat, smoking or various alkylating drugs. It was reported that men diagnosed with male factor infertility had significantly higher mean levels of N7MedG in their sperm DNA [173]. Logistic regression analysis showed that N7-MedG levels were significantly negatively associated with the proportion of oocytes successfully fertilized irrespective of the method of fertilization used IVF or ICSI intra-cytoplasmic sperm injection [173]. Likewise, acrylamide exposition induces formation of N-7(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl-) guanine (or N7-GA-Gua). Such situation was not associated with a decrease in fertility but an impact on future generations was reported [174].

The sperm epigenetic information with its multiple carriers: chromatin, DNA and the vast array of coding and non-coding RNAs (small and long) may also be the subject of alterations because of both genetic reasons and in response to environmental situations [175, 176]. Changes in sperm persisting histone acetylation, DNA methylation, and sperm-associated microRNAs were recently shown to be causal for offspring's diseases in later life, suggesting that a paternal programming does exist [177]. Jenkins et al. [178] found that age-related changes in sperm DNA methylation are located at genes previously associated with schizophrenia, bipolar disorder [178–180] and lesser intelligence. In a recent review [179] the evidence of sperm histone and protamine packing involvement on epigenetic inheritance was reaffirmed, the proper compaction of sperm DNA being necessary to avoid access to nucleases and appropriate transcriptional and translational activities. Any alteration in sperm histone retention would affect DNA integrity and could lead to chromatin rearrangements in developmental loci and genes with impacts on embryo development [166, 167]. In addition, very recent data have shown that sperm microRNAs as well as sperm small non-coding RNAs contents may respond to environmental conditions ([181, 182], Chu C. personal communication). After transmission to the oocyte through fertilization these different epigenetic characteristics may modify the next generations [176, 183].

Consequences of sperm nuclear damage

Sperm nuclear alteration has multiple consequences among which the detrimental impact it has on the success of reproduction may not be the biggest problem. As painful and frustrating it is for a couple having difficulties to conceive because of detrimental sperm nuclear factors, the acceptance of sterility might be somehow easier to deal with than the possibility of having an abnormal embryo development or having a child plagued with a debilitating/incapacitating/life threatening disease (Fig. 2).

The consequence of sperm nuclear/DNA damage with respect to normal embryo development is the result of an equilibrium between the damage contained in the sperm and the DNA repair capacity of the oocyte [165]. As an example oxidative DNA lesions (8-OHdG residues) may lead to transversion mutations (G-C to T-A) which can alter gene expression if not repaired by the oocyte BER enzymes prior to zygote S-phase [184]. The zygote responds to sperm DNA damage through non-apoptotic mechanisms that act by slowing paternal DNA replication. Ultimately, this leads to an arrest in embryonic development [167, 168]. As said above already, the induction of oxidative damage on Rhesus sperm prior to their use in resulted in severe fragmentation, multinucleation, and cell arrest before the eight-cell stage, mainly at the four cell stage [169]. This demonstrates well how detrimental to an optimal embryonic program sperm DNA oxidative alterations can be. Kocer et al. [95] found that not every mouse sperm chromosome were susceptible to DNA oxidative damage. The chromosomes or chromosomal regions that are more peripheral in the mouse sperm nucleus were found more susceptible to oxidative damage [95]. In particular, the Y chromosome was found very vulnerable to oxidative attacks. Because of its intrinsic characteristics (rich in repetitive sequences, not repaired by homologous recombination, poorly corrected by the oocyte BER pathway after fertilization) the Y chromosome is at risk of transmitting *de novo* mutations to the progeny that may lead to infertility and an increased risk of cancers in the offspring [185].

Fernandez-Gonzalez et al. [168] evaluated long-term consequences on health and behaviour of mice generated by ICSI using DNA damaged sperm and the results were disturbing. Early effects were a delay in male pronucleus demethylation, lower birth rates while long term effects were lung and dermis tumors, premature aging and death when compared to controls. In addition, they noted that male mice displayed higher emotional reactivity compared with control mice, while female mice showed memory deficits, hypolocomotion, anxiety, and increased adiposity. Similar results on adiposity alterations and glucose metabolism were found [186], by inducing oxidative damage on mice sperm DNA prior to ICSI. One obvious consequence of sperm DNA damage is the increase risk in the frequency of *de novo* mutations in the offspring. In a recent study [187], induced DNA damage (nucleotide modifications, single and double strand breaks) in mice sperm via the exposure to ionizing radiation revealed that the number of *de novo* mutations and clustered mutations were higher in the exposed group when compared to control group. This type of sperm DNA alterations has been associated with autism spectrum syndrome in humans [179, 188].

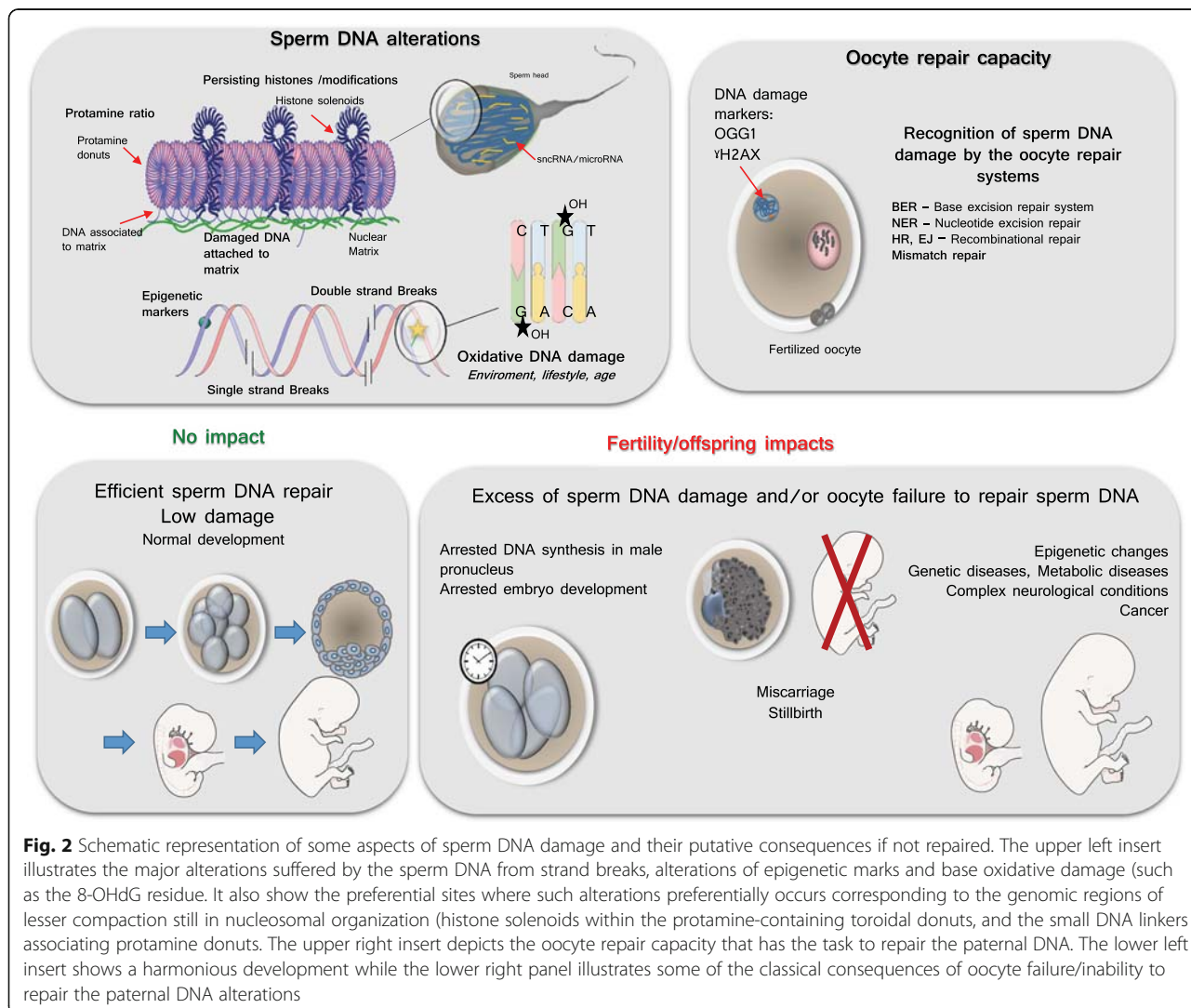


Fig. 2 Schematic representation of some aspects of sperm DNA damage and their putative consequences if not repaired. The upper left insert illustrates the major alterations suffered by the sperm DNA from strand breaks, alterations of epigenetic marks and base oxidative damage (such as the 8-OHdG residue). It also shows the preferential sites where such alterations preferentially occur corresponding to the genomic regions of lesser compaction still in nucleosomal organization (histone solenoids within the protamine-containing toroidal donuts, and the small DNA linkers associating protamine donuts). The upper right insert depicts the oocyte repair capacity that has the task to repair the paternal DNA. The lower left insert shows a harmonious development while the lower right panel illustrates some of the classical consequences of oocyte failure/inability to repair the paternal DNA alterations

Similarly, sperm DNA damage was suspected to be involved in behavior or mental alterations in mice [168].

Evaluation of sperm nuclear integrity

Regardless of controversies, it has been exhaustively shown that paternal gamete integrity has a huge impact on fertility, pregnancy rates and offspring health, independently of the ART used, making the determination of reliable sperm DNA quality test essential as a predictor of health and pregnancy success. Despite the fact that DNA damage in human sperm cells has been linked to a variety of important altered outcomes such as subfertility & infertility [189], an increased incidence of abortions and an increased risk of diseases in the offspring [190] it is still rather difficult to have a clear picture of how detrimental to reproductive success and to the progeny sperm DNA/nuclear damage is. The main reason is that “sperm DNA/nuclear damage” covers a large variety of situations, as we have seen above, is largely underestimated

essentially because not routinely monitored. Even though nowadays there is a rather solid consensus among scientists and clinicians that sperm DNA integrity is a determining factor for reproductive success there is a very limited number of infertility clinics monitoring it. There is no shortage of scientific evidence and as an example in the last 20 years we observe more than 1500 reports dealing with sperm DNA fragmentation alone with more than a thousand of these in the last 6 years, indicating how pertinent this topic has become. Still, sperm DNA integrity is rarely part of the routine clinical evaluation of the male partner in the infertile couple. Why is it that so difficult to have international health agencies enforce or at least recommend that it should be the case? The main reason for this inconsistency is that there is no strong consensus as to which of the currently available assays allowing some kind of evaluation of sperm DNA/nuclear integrity is/are predictive of reproductive success. For that reason, international recommendations for pre-ART male check-up

still indicate that a classical investigation to evaluate the fertilizing ability of the male partner is based on sperm count, sperm morphology and gross sperm mobility despite that none of these parameters address directly the important criteria of the quality/integrity of the sperm nucleus.

Over the years, a number of tests have been made available to assess sperm nuclear/DNA integrity. Globally, they fall in two categories, direct assays or indirect assays.

Indirect assays

These indirect assays essentially evaluate the sperm nuclear compaction. They include the:

- Chromomycin A3 (CMA3) assay: CMA3 is a fluorochrome that competes with protamines in the sperm nucleus giving an indirect indication of the protamine level and consequently of the sperm nucleus condensation [191].
- Toluidine blue and aniline blue staining assays: these are common assays used to assess sperm chromatin structure and packaging. With toluidine blue, sperm nuclei with normal chromatin compaction are stained in light blue while those with abnormal chromatin condensation are stained in deep violet (purple, [192]). This is essentially due to the facility with which the intercalating dye penetrates the sperm nucleus. Aniline blue is another dye commonly used to assess sperm nuclear condensation. Aniline blue shows affinity for histones. If sperm cells are stained it indirectly reveals protamination defects and the presence of high level of persisting histones [192, 193].
- MSOME (or Motile Sperm Organelle Morphology Examination) is based on a morphological analysis of isolated motile spermatozoa in real-time at high-magnification (up to x6600). MSOME is able to identify not only conventional morphological sperm alterations with a definition close to that of scanning electron microscopy, but also more specifically sperm head vacuoles, considered as nuclear defects [194–197]. Although MSOME may be helpful in revealing abnormal sperm head morphology and the presence of nuclear defects, it is associated with a high exposure of sperm cells to light during microscopy selection that is known to promote oxidative damage.
- Acridine orange (AO) assay. With acridine orange, a normally condensed sperm nucleus shows green fluorescence while sperm cells with abnormal chromatin condensation are red-orange [198]. Acridine orange is an organic compound used as a nucleic acid-selective fluorescent cationic dye. It is cell-permeable and it interacts with DNA and RNA by intercalation or electrostatic attractions, respectively. When bound to double strand DNA, it has an excitation maximum at 502 nm and an emission maximum at 525 nm (green) similar to fluorescein. However, when single strand DNA is bound by AO there is a wavelength shift since the excitation and emission maxima are reached respectively at 460 nm (blue) and 650 nm (red). When mild acid denaturation of sperm DNA is carried out AO binds to dsDNA (green fluorescence, corresponding to non-denatured DNA) and to ssDNA (red fluorescence corresponding to denatured DNA since only DNA with single stranded breaks can be denatured with acid). A correlation was shown between the ratio of red to green fluorescence and sperm nuclear abnormalities such as morphological defects and lack of DNA condensation [198]. A flow cytometry development of AO staining is commercially known as the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA^R). It is the pioneering assay for the detection of sperm DNA damage and altered proteins in sperm nuclei via flow cytometry of acridine orange (AO) stained sperm. The SCSA^{*} is considered to be the most friendly, precise, repeatable, time- and cost-efficient, precise DNA fragmentation assay with the most data accumulated. It provides very unique, dual parameter data (red vs green fluorescence) on a 1.024x1.024 channel scale, not only on DNA fragmentation but also on abnormal sperm characterized by a lack of normal exchange of histones to protamines [199, 200]. It is also the only fragmentation assay with an accepted clinical threshold (DNA fragmentation Index or DFI) for placing a man at risk for infertility.
- TUNEL assay (or Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate Nick End Labeling) uses an independent DNA polymerase called terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) that non preferentially adds deoxyribonucleotides in 3' hydroxyl (3' -OH) of single or double DNA strand breaks [201]. Although the TUNEL assay is a rather solid assay, in some situations it may lead to an underestimation of the true level of DNA breaks since it will not take into account the abasic sites (promoted by oxidative stress) because of the absence of 3-OH protruding ends.
- Comet assay or single-cell gel electrophoresis. It is a simple and sensitive technique to measure DNA

Direct assays

These direct assays essentially evaluate the level of sperm DNA fragmentation and the level of DNA oxidation. They include the:

breaks in individual sperm. During this procedure, sperm cells are embedded in a thin layer of agarose on a microscope slide and lysed with detergent under high salt concentration conditions. This process removes protamines and histones allowing the nucleus to form a nucleoid-like structure containing supercoiled loops of DNA. Alkaline pH conditions relaxing double-stranded DNA, and subsequent electrophoresis result in the migration of broken strands towards the anode, forming a comet tail, when observed under fluorescence microscopy. The amount of DNA in the head and tail is reflected by its fluorescent intensity. The relative fluorescence in the tail compared with its head serves as a measure of the level of fragmented DNA [202].

- SCD or sperm chromatin dispersion assay. This assay is based on the principle that sperm with fragmented DNA fail to produce the characteristic halo of dispersed DNA loops that is observed in sperm with non-fragmented DNA, following acid denaturation and removal of nuclear proteins [203].
- DBD-FISH or DNA breakage detection fluorescence *in situ* hybridization [204]. This assay allows *in situ* detection and quantification of DNA breaks in single cells. Cells embedded within an agarose matrix on a slide are exposed to an alkaline unwinding solution that transforms DNA strand breaks into ssDNA (single strand DNA) motifs. After neutralizing and protein removal, ssDNA are accessible to hybridization with whole genome or specific DNA probes. The probes highlight the chromatin area to be analyzed. As DNA breaks increase in the targeted region, more ssDNA are produced by the alkaline solution and more probes hybridize, resulting in an increase in the fluorescence intensity and in the surface area of the FISH signal.
- 8-OHdG assay. One of the latest assays reported is the evaluation of the level of oxidized guanine residue that gives an indication as to the degree of sperm DNA oxidative damage. To date it is essentially used for research purpose and has yet to be developed for clinical routine testing. Sperm 8-OHdG evaluation is of interest because it is known to be associated with the level of de novo mutation in the germline [205].

The present current minimum standard is assessment of seminal plasma by volume, appearance and liquefaction of the ejaculate, and, for spermatozoa, measurement of concentration, motility and morphology [206]. The above mentioned techniques are rarely used in routine clinical evaluation because the tested spermatozoa are unsuitable for clinical purpose afterwards. However, for some of them they do allow the establishment of a DNA

fragmentation rate, a useful marker in the prediction of fertility. Studies have shown that the chance of spontaneous conception starts to decline at sperm DNA damage (DFI) values above 20% and are close to zero for readings over 30–40% [207]. In another study using the Comet assay, the authors also showed that there was a strong correlation between sperm DNA fragmentation and fertility status of men [134]. Thus, there is robust evidence from all the DNA fragmentation assays that the chance of spontaneous pregnancy is reduced when sperm DNA damage is excessive.

Conclusions

Thus, it appears that sperm defective nuclear condensation and sperm nuclear fragmentation are nowadays easy situations to assess with trustable/reliable direct and/or indirect assays (see above). Since Evenson et al. [208] highlighted the importance of sperm DNA damage evaluation our knowledge on the causes and consequences of the sperm DNA damage has increased, as well as the use of ART. In some countries, ART represents almost 5% of births, and the latest report indicates that to date approximately 5 million children were born from ART worldwide [209]. As part of the ART toolbox, ICSI was introduced in 1992 and currently represents 60 to 80% of the cycles performed worldwide [210]. This is because the injection of a sperm into an oocyte bypasses all the selection processes that occurs in natural fertilization. This allows clinicians to cover more infertile situations especially those where the male partner is key due to low sperm numbers, morphologically abnormal sperm and hardly or no motile sperm. Because of the predominance of ICSI clinicians have to be very cautious as to the quality of the spermatozoa they select, especially concerning the integrity of the nuclear material. They also have to be cautious that by the selection protocols they use they do not further alter the sperm nuclear compartment. Despite the precautions taken in today sperm selection protocols, no one is able to tell that the spermatozoa chosen is free of nuclear alterations. Animal studies have shown that a morphologically normal sperm can present nuclear alterations that are detrimental to reproductive success. It is likely that this situation exists also in humans and that such spermatozoa can be selected for ICSI [211]. This issue is aggravated by the fact that it is difficult to separate the risk derived from the technique itself from the contribution of the integrity of the sperm nucleus to the offspring health after ART [212]. This renders animal models extremely important and valuable to evaluate more deeply the impact of the sperm nuclear alterations on the health of the progeny when ART is used. However, with the assays available today to evaluate the integrity of the sperm nucleus/DNA and consequently the quality of the

paternal chromosomal material prior to ART, one could improve its safety and success rate. Even-though these assays will not solve the primary question of ICSI; whether the spermatozoa being used is in a perfect nuclear condition? they surely will be helpful in assessing the overall level of DNA damage existing in the sperm sample. It certainly will put ART clinicians in a challenging situation since what would be the answer to provide to a couple where the male is diagnosed with a very high level of DNA damage? Despite this difficulty, to our minds, the principle of caution should here prevail. Definitely, more research is needed to establish reliable thresholds that would lower the risk taken when using such DNA damaged spermatozoa. More research is also needed to investigate potential therapeutic actions that could improve the quality of the sperm nucleus. Simple therapeutic actions such as the correction of lifestyles and/or oral supplementations may prove useful in some situations [213, 214]. Some argue, why are we asking ART to do better than natural conception? We think that this is incorrect thinking, since we mainly would like ART (and especially ICSI) not to do worse. In natural conception, notwithstanding the female component, with all the existing barriers there are very few chances that a morphologically and functionally defective spermatozoa will fertilize an oocyte. With ICSI, a morphologically and functionally abnormal sperm cell may be allowed to fertilize. The integrity of the sperm nucleus being so tightly linked with the head morphology and in consequence the mobility of the cell it is very likely that an abnormal spermatozoa bears an abnormal nucleus. Therefore, monitoring the quality of the sperm nucleus by various means should be an integral part of the routine check-up of the male partner prior to ART.

Abbreviations

3'-OH: 3' hydroxyl; AO: Acridine orange; ART: Assisted reproductive technologies; BER: Base Excision Repair; CENP-A: Centromere-specific protein A; ChIP: Chromatin immunoprecipitation; CMA3: Chromomycin A3; DBD-FISH: DNA breakage detection fluorescence *in situ* hybridization; DFI: DNA fragmentation Index; DTT: Dithiothreitol; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; H₂O₂: Hydrogen peroxide; ICSI: IntraCytoplasmic Sperm Injection; IVF: In vitro fertilization; MAR: Matrix attachment regions; MSOME: Motile Sperm Organelle Morphology Examination; PARP: poly(ADP-ribose) [PAR] polymerases; Prm: Protamine; PTM: Post-translational modifications; PUFA: Polyunsaturated fatty acids; ROS: Reactive oxygen species; SCD: Sperm chromatin dispersion assay; SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay; ssDNA: Single strand DNA; TEM: Transmitted electronic microscopy; TH2B: Testis-specific H2B variant; Tnp: Transition proteins; TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate Nick End Labeling

Acknowledgements

Not applicable.

Funding

State grants from the INSERM, CNRS and the French Ministry of Higher Education support the activities of the research team headed by Prof. Drevet.

Availability of data and materials

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Authors' contributions

AC, JTC, PG, AK helped JRD to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. English grammar and syntax copy editing was done by PG.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Author details

¹GREd "Genetics, Reproduction & Development" Laboratory, UMR CNRS 6293, INSERM U1103, Clermont Université, BP60026 - TSA60026, 63178 Aubière cedex, France. ²Centro Universitário Rio Preto, UNIRP, Rodovia Br153, Km 69, CEP15093-450 São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ³CellOxess LLC, 830 Bear Tavern Road, Ewing, NJ 08628, USA.

Received: 29 September 2016 Accepted: 12 November 2016

Published online: 21 December 2016

References

- Russell LD, Ettl RA, Hikim APS, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Int J Androl*. 1993;16(1):83–93.
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*. 1975;4(4):281–300.
- Finch JT, Klug A. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(6):1897–901.
- Carter CW. Histone packing in the nucleosome core particle of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(8):3649–53.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
- Campos EI, Reinberg D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet*. 2009;43(1):559–99.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003;111:483–8.
- Govin J, Caron C, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem*. 2004;271(17):3459–69.
- Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, Meistrich ML. Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol Reprod*. 2004;71(3):1016–25.
- Kimmins S, Sassone-Corsi. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 2005;433(7033):583–9.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*. 2007;8(9):227.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*. 2009;460(7254):473–8.
- Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, Beisel C, Schübeler D, Stadler MB, Peters AHFM. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17(6):679–87.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*. 1991;44(4):569–74.
- Ward WS. Regulating DNA supercoiling: sperm points the way. *Biol Reprod*. 2011;84(5):841–3.
- Balhorn R, Brewer L, Corzett M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev*. 2000;56(25):230–4.
- Li G, Zhu P. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Lett*. 2015;589(20):2893–904.

18. Downs JA, Allard S, Jobin-Robitaille O, Javaheri A, Auger A, Bouchard N, Kron SJ, Jackson SP, Côté J. Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell*. 2004;16(6):979–90.
19. Gaucher J, Reynold N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J*. 2010;277(3):599–604.
20. Maeshima K, Hihara S, Eltsov M. Chromatin structure: does the 30-nm fiber exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22:291–7.
21. Daban JR. Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and metaphase chromosome structure. *Micron Oxf Engl*. 2011;42:733–50.
22. Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol*. 2003;23(15):5354–65.
23. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(11):703–8.
24. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem*. 1993;37(2):109–28.
25. Smith A, Haaf T. DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence in situ end labeling during functional spermiogenesis. *Biotechniques*. 1998;25(3):496–502.
26. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693–705.
27. Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A. Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao*. 2009;36:75–88.
28. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod*. 2004;70(4):910–8.
29. Laberge RM, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod*. 2005;73(2):289–96.
30. Chen JL, Longo FJ. Expression and localization of DNA topoisomerase II during rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev*. 1996;45(1):61–71.
31. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Credidio C, Ihara M, Li Y, Wang ZQ, Meyer RG. Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol Reprod*. 2009;81(1):46–55.
32. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Meistrich ML, Austin CA, Meyer RG. Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*. 2011;84(5):900–9.
33. Talbert PB, Henikoff S. Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:264–75.
34. Lewis JD, Abbott DW, Ausió J. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol*. 2003;81:131–40.
35. Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 2005;434:583–9.
36. Kota SK, Feil R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Dev Cell*. 2010;19:675–86.
37. Fenic I, Sonnack V, Failing K, Bergmann M, Steger K. In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J Androl*. 2004;25(5):811–8.
38. Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development*. 2007;134:3507–15.
39. Dhar S, Thota A, Rao MRS. Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J Biol Chem*. 2012;287:6387–405.
40. Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol*. 2003;23:5354–65.
41. Chiva M, Saperas N, Ribes E. Complex chromatin condensation patterns and nuclear protein transitions during spermiogenesis: examples from mollusks. *Tissue Cell*. 2011;43:367–76.
42. Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem*. 2004;279:51862–8.
43. Dadoune JP. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech*. 2003;61:56–75.
44. Singh J, Rao MR. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J Biol Chem*. 1987;262:734–40.
45. Singh J, Rao MR. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochem Int*. 1988;17:701–10.
46. Akama K, Kondo M, Sato H, Nakano M. Transition protein 4 from boar late spermatid nuclei is a topological factor that stimulates DNA-relaxing activity of topoisomerase I. *FEBS Lett*. 1999;442:189–92.
47. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatid TP1 protein. *Mol Reprod Dev*. 2001;58:437–43.
48. Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, et al. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:4683–8.
49. Baskaran R, Rao MRS. Interaction of spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1. *J Biol Chem*. 1990;265:21039–47.
50. Lévesque D, Veilleux S, Caron N, Boissonneault G. Architectural DNA-Binding Properties of the Spermatid Transition Proteins 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252:602–9.
51. Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, et al. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol*. 2001;21:7243–55.
52. Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod*. 2004;71:1220–9.
53. Eirín-López JM, Ausió J. Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. 2009;31:1062–70.
54. Rooney AP, Zhang J, Nei M. An unusual form of purifying selection in a sperm protein. *Mol Biol Evol*. 2000;17(2):278–83.
55. Aoki WW, Carrell DT. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl*. 2003;5:315–24.
56. Hermo L, Pelletier R-M, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: Changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microsc Res Tech*. 2010;73:279–319.
57. Martin-Coello J, Gomendio M, Roldan ERS. Protamine 3 shows evidence of weak, positive selection in mouse species (genus *Mus*), but it is not a protamine. *Biol Reprod*. 2011;84:320–6.
58. Balhorn R. Mammalian protamines: structure and molecular interactions. In: Adolph KW, editor. *Molecular biology of chromosome function*. New York: Springer; 1989. p. 366–95.
59. Debarle M, Martinage A, Sautiere P, Chevillier P. Persistence of protamine precursors in mature sperm nuclei of the mouse. *Mol Reprod Dev*. 1995;40:84–90.
60. Yoshii T, Kuji N, Komatsu S, Iwahashi K, Tanaka Y, Yoshida H, et al. Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol Hum Reprod*. 2005;11:677–81.
61. Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod*. 2010;16:23–9.
62. Smith TB, Dun MD, Smith ND, Curry BJ, Connaughton HS, Aitken RJ. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J Cell Sci*. 2013;126(6):1488–97.
63. Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV. Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem*. 2004;279(19):20088–95.
64. Hud NV, Milanovich FP, Balhorn R. Evidence of novel secondary structure in DNA-bound protamine is revealed by Raman spectroscopy. *Biochemistry (Mosc)*. 1994;33:7528–35.
65. Fita I, Campos JL, Puigjaner LC, Subirana JA. X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure. *J Mol Biol*. 1983;167:157–77.
66. Prieto MC, Maki AH, Balhorn R. Analysis of DNA – protamine interactions by optical detection of magnetic resonance. *Biochemistry (Mosc)*. 1997;36:11944–51.
67. Balhorn R, Kellaris K, Corzett M, Clancy C. 7-aminoactinomycin D binding and the final stages of sperm chromatin processing in the mouse. *Gamete Res*. 1985;12:411–22.
68. Bench G, Corzett M, Kramer C, Grant PG, Balhorn R. Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. *Mol Reprod Dev*. 2000;56:512–9.

69. Allen MJ, Bradbury EM, Balhorn R. AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2221–6.
70. Brewer LR, Corzett M, Balhorn R. Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Science.* 1999;286:120–3.
71. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007;8:227.
72. Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 1989;98:153–9.
73. Barone JG, De Lara J, Cummings KB, Ward WS. DNA organization in human spermatozoa. *J Androl.* 1994;15:139–44.
74. Sotolongo B, Lino E, Ward WS. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol Reprod.* 2003;69:2029–35.
75. Ward WS, Coffey DS. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol Reprod.* 1989;41:361–70.
76. McCarthy S, Ward WS. Functional aspects of mammalian sperm chromatin. *Hum Fertil Camb Engl.* 1999;2:56–60.
77. Nadel B, Lara J, Finkernagel SW, Ward WS. Cell-specific organization of the 5S ribosomal RNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. *Biol Reprod.* 1995;53:1222–8.
78. Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. Function of the sperm nuclear matrix. *Arch Androl.* 2007;53:135–40.
79. Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem.* 2007;102:680–8.
80. Anachkova B, Djeliova V, Russev G. Nuclear matrix support of DNA replication. *J Cell Biochem.* 2005;96:951–61.
81. Wilson RHC, Coverley D. Relationship between DNA replication and the nuclear matrix. *Genes Cells.* 2013;18:17–31.
82. Balhorn R, Gledhill BL, Wyrobek AJ. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry (Mosc).* 1977;16:4074–80.
83. Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry.* 1996;23:263–71.
84. Tovich PR, Oko RJ. Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J Biol Chem.* 2003;278(34):32431–8.
85. Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res.* 1978;117:347–56.
86. Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, et al. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 2009;19:1338–49.
87. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* 2009;460:473–8.
88. Van der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, van den Berg IM, Derijck AA, van der Vlag J, et al. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BioMed Cent Dev Biol.* 2008;8:34.
89. Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debenardi A, Hery P, Curtet S, Jamshidikia M, Barral S, Holota H, Bergon A, Lopez F, Guardiola P, Pernet K, Imbert J, Petosa C, Tan M, Zhao Y, Gerard M, Kochbin S. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* 2013;27(15):1680–92.
90. Ajduk A, Yamauchi Y, Ward MA. Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 2008;75:442–51.
91. Jenkins TG, Carrell DT. Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front Genet.* 2012;3:143.
92. Jenkins TG, Carrell DT. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. *Reproduction.* 2012;143:727–34.
93. Zalensky AO, Siino JS, Ginetis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, et al. Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem.* 2002;277:43474–80.
94. Li Y, Lalancette C, Miller D, Krawetz SA. Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. *Asian J Androl.* 2008;10:535–41.
95. Kocer A, Henry-Berger J, Noblanc, Champroux A, Pogorelnik, Guiton R, et al. Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: size matters. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:993–1002.
96. Zalenskaya IA, Bradbury EM, Zalensky AO. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279:213–8.
97. Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic Biol Med.* 2013;65:719–23.
98. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 2010;16:30–6.
99. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature.* 2009;460:473–8.
100. Erkek S, Hisano M, Liang CY, Gill M, Murr R, Dieker J, Schübeler D, van der Vlag J, Stadler MB, Peters AHFM. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(7):868–75.
101. Greaves IK, Rangasamy D, Devoy M, Marshall Graves JA, Tremethick DJ. The X and Y chromosomes assemble into H2AZ-containing facultative heterochromatin following meiosis. *Mol Cell Biol.* 2006;26(14):5394–405.
102. Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin.* 2014;7(1):2.
103. Zalensky AO, Breneman JW, Zalenskaya IA, Brinkley BR, Bradbury EM. Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma.* 1993;102:509–18.
104. Mudrak O, Tomilin N, Zalensky A. Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus. *J Cell Sci.* 2005;118:4541–50.
105. Hazzouri M, Rousseaux S, Mongelard F, Usson Y, Pelletier R, Faure AK, et al. Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol Reprod Dev.* 2000;55:307–15.
106. Zalenskaya IA, Zalensky AO. Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res.* 2004;12:163–73.
107. Mudrak OS, Nazarov IB, Jones EL, Zalensky AO. Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement. *PLoS One.* 2012;7:e52944.
108. Millan NM, Lau P, Hann M, Ioannou D, Hoffman D, Barrionuevo M, et al. Hierarchical radial and polar organisation of chromosomes in human sperm. *Chromosome Res.* 2012;20:875–87.
109. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reprod Camb Engl.* 2010;139(2):287–301.
110. Carrell DT. Epigenetics of the male gamete. *Fertil Steril.* 2012;97(2):267–74.
111. Dada R, Kumar M, Jesudasan R, Fernández JL, Gosálvez J, Agarwal A. Epigenetics and its role in male infertility. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29(3):213–23.
112. Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl.* 2015;17(4):601–9.
113. Boitrelle F, Albert M, Petit JM, Ferfour F, Wainer R, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Selva J. Small human sperm vacuoles observed under high magnification are pocket-like nuclear concavities linked to chromatin condensation failure. *Reprod Biomed Online.* 2013;27(2):201–11.
114. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, Selice R, Engl B, Foresta C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(5):610–6.
115. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med.* 2001;345(14):1067–8.
116. Knez K, Tomazevic T, Zorn B, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection improves development and quality of preimplantation embryos in teratozoospermia patients. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(2):168–79.
117. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, Uher P, Zintz M, Lejeune B, Vanderzwalmen S, Cassuto G, Zech NH. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(5):617–27.
118. de Almeida Ferreira Braga DP, Setti AS, Figueira RCS, Nichi M, Martinhago CD, Iaconelli A, Borges E. Sperm organelle morphologic abnormalities: contributing factors and effects on intracytoplasmic sperm injection cycles outcomes. *Urology.* 2011;78(4):786–91.
119. Tanaka A, Nagayoshi M, Tanaka I, Kusunoki H. Human sperm head vacuoles are physiological structures formed during the sperm development and maturation process. *Fertil Steril.* 2012;98(2):315–20.

120. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(1):19–25.
121. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SEM. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2010;25(7):1594–608.
122. Boitrelle F, Guthäuser B, Alter L, Bailly M, Bergere M, Wainer R, Vialard F, Albert M, Selva J. High-magnification selection of spermatozoa prior to oocyte injection: confirmed and potential indications. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(1):6–13.
123. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Bader JJ, Meyer RG. Alteration of poly(ADP-ribose) metabolism affects murine sperm nuclear architecture by impairing pericentric heterochromatin condensation. *Chromosoma*. 2013;122(4):319–35.
124. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Meistrich ML, Austin CA, Meyer RG. Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod*. 2011;84(5):900–9.
125. Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Dev Camb Engl*. 2007;134(19):3507–15.
126. Li W, Wu J, Kim SY, Zhao M, Hearn SA, Zhang MQ, Meistrich ML, Mills AA. Chd5 orchestrates chromatin remodeling during sperm development. *Nat Commun*. 2014;5:3812.
127. Lu LY, Wu J, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu X. RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev Cell*. 2010;18(3):371–84.
128. Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod*. 2004;71(4):1220–9.
129. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):417–35.
130. Nanassy L, Liu L, Griffin J, Carrell DT. The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept Lett*. 2011;18(8):772–7.
131. de Yebra L, Ballescà JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10553–7.
132. Aoki WW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod*. 2005;20(5):1298–306.
133. Aoki WW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl*. 2005;6(26):741–8.
134. Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online*. 2011;23(6):724–34.
135. Takeda N, Yoshinaga K, Furushima K, Takamune K, Li Z, Abe S, Aizawa S, Yamamura K. Viable offspring obtained from Prm1-deficient sperm in mice. *Sci Rep*. 2016;2(6):27409. doi:10.1038/srep27409.
136. Perrin A, Caer E, Oliver-Bonet M, Navarro J, Benet J, Amice V, de Braekeleer M, Morel F. DNA fragmentation and meiotic segregation in sperm of carriers of a chromosomal structural abnormality. *Fertil Steril*. 2009;92(2):583–9.
137. Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L, Peterson CM, Jones KP, Erickson L, Campbell B, Branch DW, Hatasaka HH. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol*. 2003;101(6):1229–35.
138. Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Alvarez JG, Fernández JL. Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *J Androl*. 2007;28(1):38–49.
139. Enciso M, Alfarawati S, Wells D. Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Hum Reprod*. 2013;28(6):1707–15.
140. Acloque H, Bonnet-Garnier A, Mompert F, Pinton A, Yerle-Bouissou M. Sperm nuclear architecture is locally modified in presence of a robertsonian translocation t(13;17). *PLoS One*. 2013;8(10):e78005.
141. McAuliffe ME, Williams PL, Korrick SA, Dadd R, Marchetti F, Martenies SE, Perry MJ. Human sperm sex chromosome disomy and sperm DNA damage assessed by the neutral comet assay. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2014;29(10):2148–55.
142. Marchetti F, Bishop J, Gingerich J, Wyrobek AJ. Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci Rep*. 2015;5:7689.
143. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kölle S, Roveri A, Brielmeier M, Wurst W, Maiorino M, Bornkamm GW. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol*. 2005;25(17):7637–44.
144. 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 JR, Kocer A. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGpx4 and Gpx5 double mutant mice. *PLoS One*. 2012;7(6):e38565.
145. Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, Schoor M, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(7):2074–85.
146. Noblanc A, Kocer A, Drevet JR. Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of the epididymis. *Med Sci (Paris)*. 2012;28(5):519–25.
147. Noblanc A, Kocer A, Drevet JR. Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge. *Basic Clin Androl*. 2014;24:6. doi:10.1186/2051-4190-24-6.
148. Aitken RJ, Gibb Z, Baker MA, Drevet J, Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*. 2015;28(2):1–10.
149. Pentikäinen V, Erkkilä K, Dunkel L. Fas regulates germ cell apoptosis in the human testis in vitro. *Am J Physiol*. 1999;276(2):310–6.
150. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2011;13(1):36–42.
151. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol*. 1997;158(5):1791–3.
152. Almeida C, Sousa M, Barros A. Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(6):770–7.
153. McPherson SM, Longo FJ. Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev Biol*. 1993;158(1):122–30.
154. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod*. 2004;70(4):910–8.
155. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*. 1993;16(3):183–8.
156. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update*. 2008;14(3):243–58.
157. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res*. 1996;351(2):199–203.
158. Villalta J, Ballescà JL, Nicolás JM, de Osaba MJ M, Antúñez E, Pimentel C. Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(1):128–33.
159. Palmer NP, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis*. 2012;2(4):253–63.
160. Hauser R, Meeker JD, Singh NP, Silva MJ, Ryan L, Duty S, Calafat AM. DNA damage in human sperm is related to urinary levels of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007;22(3):688–95.
161. Chitra KC, Sujatha R, Latchoumycandane C, Mathur PP. Effect of lindane on antioxidant enzymes in epididymis and epididymal sperm of adult rats. *Asian J Androl*. 2001;3(3):205–8.
162. Brackett NL, Ibrahim E, Grotas JA, Aballa TC, Lynne CM. Higher sperm DNA damage in semen from men with spinal cord injuries compared with controls. *J Androl*. 2008;29(1):93–9.
163. Shekarriz M, DeWire DM, Thomas AJ, Agarwal A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol*. 1995;28(1):31–5.
164. Gozálviz J, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Esteves SC, Johnston SD. Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: Ten frequently asked questions. *J Reprod Biotechnol Fertil*. 2015;4:1–16. doi:10.1177/2058915815594454.

165. Menezo YJ, Russo G, Tosti E, Mouatassim SE, Benkhalifa M. Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(11):513–20.
166. Hammoud SS, Nix DA, Hammoud AO, Gibson M, Cairns BR, Carrell DT. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011;26(9):2558–69.
167. Gawecka JE, Marh J, Ortega M, Yamauchi Y, Ward MA, Ward WS. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PLoS One.* 2013;8(2):e56385.
168. Fernández-González R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramírez MA, Pericuesta E, Bilbao A, Bermejo-Alvarez P, Hourcade JD, de Fonseca FR, Gutiérrez-Adán A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod.* 2008;78(4):761–72.
169. Burruev V, Klooster KL, Chitwood J, Ross PJ, Meyers SA. Oxidative damage to rhesus macaque spermatozoa results in mitotic arrest and transcript abundance changes in early embryos. *Biol Reprod.* 2013;89(3):72.
170. Moazamian R, Polhemus A, Connaughton H, Fraser B, Whiting S, Gharagozloo P, Aitken RJ. Oxidative stress and human spermatozoa: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. *Mol Hum Reprod.* 2015;21(6):502–15.
171. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod.* 2011;26(7):1628–40.
172. De Iulius GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod.* 2009;81(3):517–24.
173. Stocks SJ, Agius RM, Cooley N, Harrison KL, Brison DR, Horne G, Gibbs A, Povey AC. Alkylation of sperm DNA is associated with male factor infertility and a reduction in the proportion of oocytes fertilised during assisted reproduction. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2010;698(1–2):18–23.
174. Katen AL, Roman SD. The genetic consequences of paternal acrylamide exposure and potential for amelioration. *Mutat Res.* 2015;777:91–100.
175. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* 2005;308(5727):1466–9.
176. Sharma U, Rando OJ. Father-son chats: inheriting stress through sperm RNA. *Cell Metab.* 2014;19(6):894–5.
177. Li J, Tsuprykov O, Yang X, Hoche B. Paternal programming of offspring cardiometabolic diseases in later life. *J Hypertens.* 2016. Epub ahead of print.
178. Jenkins TG, Aston KI, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet.* 2014;10(7):e1004458.
179. Malaspina D, Gilman C, Kranz TM. Paternal age and mental health of offspring. *Fertil Steril.* 2015;103(6):1392–6.
180. Castillo J, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian J Androl.* 2015;17(4):601–9.
181. Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr AG, Bing XY, Belleannee C, Kucukural A, Serra RW, Sun F, Song L, Carone BR, Ricci EP, Li XZ, Fauquier L, Moore MJ, Sullivan R, Mello CC, Garber M, Rando OJ. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science.* 2016;351(6271):391–6.
182. Chen Q, Yan M, Cao Z, Li X, Zhang Y, Shi J, Feng GH, Peng H, Zhang X, Zhang Y, Qian J, Duan E, Zhai Q, Zhou Q. Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science.* 2016;351(6271):397–400.
183. Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci.* 2014;17(5):667–9.
184. Lord T, Aitken RJ. Fertilization stimulates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine repair and antioxidant activity to prevent mutagenesis in the embryo. *Dev Biol.* 2015;406(1):1–13.
185. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001;122(4):497–506.
186. Lane M, McPherson NO, Fullston T, Spillane M, Sandeman L, Kang WX, Zander-Fox DL. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PLoS One.* 2014;9(7):e100832.
187. Adeyoye AB, Lindsay SJ, Dubrova YE, Hurles ME. The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nat Commun.* 2015;6:6684.
188. Feinberg JI, Bakulski KM, Jaffe AE, Tryggvadottir R, Brown SC, Goldman LR, Croen LA, Hertz-Picciotto I, Newschaffer CJ, Fallin MD, Feinberg AP. Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort. *Int J Epidemiol.* 2015;44(4):1109–210.
189. Benchaib M. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;18(5):1023–8.
190. Aitken RJ, De Iulius GN. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 2010;16(1):3–13.
191. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(3):139–44.
192. Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Kim SH, Moon SY, Choi YM. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med.* 2013;40(1):23–8.
193. Terquem A, Dadoune JP. Aniline blue staining of human spermatozoon chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In: André J, editor. *The sperm cell.* Netherlands: Springer; 1983. p. 249–52.
194. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011;26(1):47–58.
195. Franco Jr JG, Mauri AL, Petersen CG, Massaro FC, Silva LFI, Felipe V, Cavagna M, Pontes A, Baruffi RLR, Oliveira JBA, Vagnini LD. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2012;35(1):46–51.
196. Franco JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Petersen CG, Oliveira JBA, Vagnini L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. *Reprod Biomed Online.* 2008;17(1):42–5.
197. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med.* 2001;345(14):1067–8.
198. Erenpreisa J, Freivalds T, Roach H, Alston R. Apoptotic cell nuclei favour aggregation and fluorescence quenching of DNA dyes. *Histochem Cell Biol.* 1997;108(1):67–75.
199. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod Oxf Engl.* 1999;14(4):1039–49.
200. Evenson DP. Sperm chromatin structure assay, SCSA[®]. *Methods Mol Biol.* 2013;927:147–64.
201. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res.* 1993;207(1):202–5.
202. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 1996;363(2):89–96.
203. Fernández JL, Muriel M, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003;24(1):59–66.
204. Fernández JL, Vázquez-Gundín F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J, de la Torre J, Gosálvez J. DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res.* 2000;453(1):77–82.
205. Ohno M, Sakumi K, Fukumura R, Furuichi M, Iwasaki Y, Hokama M, Ikemura T, Tsuzuki T, Gondo Y, Nakabeppu Y. 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci Rep.* 2014;4:4689.
206. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. WHO. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf.
207. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, Rylander L. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int J Androl.* 2010;33(1):221–7.
208. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980;210(4474):1131–3.
209. Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, de Mouzon J. International Committee for Monitoring Assisted

- Reproductive Technology (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2003. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2209–22.
210. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med*. 2009;27(2):191–201.
211. Hourcade JD, Pérez-Crespo M, Fernández-González R, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:9.
212. Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2015;30(2):120–7.
213. Kumar SB. Improvement in Sperm DNA Quality Following Simple Life Style Intervention: A Study in Fathers of Children with Non-Familial Sporadic Heritable Retinoblastoma. *J Clin Case Rep*. 2015;5:509. doi:10.4172/2165-7920.1000509.
214. Gharagozloo P, Gutiérrez-Adán A, Champroux A, Noblanc A, Kocer A, Calle A, Pérez-Cerezales S, Pericuesta E, Polhemus A, Moazamian A, Drevet JR, Aitken RJ. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Hum Reprod*. 2016;31(2):252–62.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



*Références
Bibliographiques*

- Aarabi, M., San Gabriel, M.C., Chan, D., Behan, N.A., Caron, M., Pastinen, T., Bourque, G., MacFarlane, A.J., Zini, A., and Trasler, J. (2015). High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 6301–6313.
- Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A.M., Hammadeh, M., and Meese, E. (2014a). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertil. Steril.* *101*, 78–86.e2.
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A.M., Keller, A., and Meese, E. (2014b). Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertil. Steril.* *102*, 989–997.e1.
- Adewoye, A.B., Lindsay, S.J., Dubrova, Y.E., and Hurles, M.E. (2015). The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline. *Nat. Commun.* *6*, 6684.
- Agarwal, A., Saleh, R.A., and Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* *79*, 829–843.
- Agarwal, A., Said, T.M., Bedaiwy, M.A., Banerjee, J., and Alvarez, J.G. (2006). Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.* *86*, 503–512.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A., and Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *10*, 49.
- Agrawal, A., and Mabalirajan, U. (2016). Rejuvenating cellular respiration for optimizing respiratory function: targeting mitochondria. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *310*, L103-113.
- Ahmadi, S., Bashiri, R., Ghadiri-Anari, A., and Nadjarzadeh, A. (2016). Antioxidant supplements and semen parameters: An evidence based review. *Int. J. Reprod. Biomed. Yazd Iran* *14*, 729–736.
- Aitken, R.J. (2016). Oxidative stress and the etiology of male infertility. *J. Assist. Reprod. Genet.* *33*, 1691–1692.
- Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* *81*, 459–469.
- Aitken, R.J., and De Iuliis, G.N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* *16*, 3–13.
- Aitken, R.J., Clarkson, J.S., and Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.* *41*, 183–197.
- Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., and McLachlan, R.I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* *32*, 46–56.

- Akama, K., Oka, S., Tobita, T., and Hayashi, H. (1994). The amino acid sequence of a boar transition protein 3. *J. Biochem. (Tokyo)* *115*, 58–65.
- Akama, K., Ichimura, H., Sato, H., Kojima, S., Miura, K., Hayashi, H., Komatsu, Y., and Nakano, M. (1995). The amino acid sequence and interaction with the nucleosome core DNA of transition protein 4 from boar late spermatid nuclei. *Eur. J. Biochem.* *233*, 179–185.
- Akama, K., Kondo, M., Sato, H., and Nakano, M. (1999). Transition protein 4 from boar late spermatid nuclei is a topological factor that stimulates DNA-relaxing activity of topoisomerase I. *FEBS Lett.* *442*, 189–192.
- Akhtar, A., and Becker, P.B. (2000). Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell* *5*, 367–375.
- Akiyama, T., Suzuki, O., Matsuda, J., and Aoki, F. (2011). Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet.* *7*, e1002279.
- Allen, M.J., Bradbury, E.M., and Balhorn, R. (1997). AFM analysis of DNA-protamine complexes bound to mica. *Nucleic Acids Res.* *25*, 2221–2226.
- Almeida, R.D., Loose, M., Sottile, V., Matsa, E., Denning, C., Young, L., Johnson, A.D., Gering, M., and Ruzov, A. (2012). 5-hydroxymethyl-cytosine enrichment of non-committed cells is not a universal feature of vertebrate development. *Epigenetics* *7*, 383–389.
- Alvarez, J.G., and Storey, B.T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* *13*, 232–241.
- Amor, D.J., and Halliday, J. (2008). A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *23*, 2826–2834.
- Amouroux, R., Nashun, B., Shirane, K., Nakagawa, S., Hill, P.W., D'Souza, Z., Nakayama, M., Matsuda, M., Turp, A., Ndjetehe, E., et al. (2016). De novo DNA methylation drives 5hmC accumulation in mouse zygotes. *Nat. Cell Biol.* *18*, 225–233.
- Aoki, V.W., Moskovtsev, S.I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J.B.M., and Carrell, D.T. (2005a). DNA Integrity Is Compromised in Protamine-Deficient Human Sperm. *J. Androl.* *26*, 741–748.
- Aoki, V.W., Liu, L., and Carrell, D.T. (2005b). Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum. Reprod.* *20*, 1298–1306.
- Aoshima, K., Inoue, E., Sawa, H., and Okada, Y. (2015). Paternal H3K4 methylation is required for minor zygotic gene activation and early mouse embryonic development. *EMBO Rep.* *16*, 803–812.
- Arand, J., Spieler, D., Karius, T., Branco, M.R., Meilinger, D., Meissner, A., Jenuwein, T., Xu, G., Leonhardt, H., Wolf, V., et al. (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* *8*, e1002750.

- Aravin, A.A., Hannon, G.J., and Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318, 761–764.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Bourc'his, D., Schaefer, C., Pezic, D., Toth, K.F., Bestor, T., and Hannon, G.J. (2008). A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol. Cell* 31, 785–799.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10148–10152.
- Arias, M.E., Andara, K., Briones, E., and Felmer, R. (2017). Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod. Biol.* 17, 126–132.
- Armstrong, V.L., Clulow, J., Murdoch, R.N., and Jones, R.C. (1994). Intracellular signal transduction mechanisms of rat epididymal spermatozoa and their relationship to motility and metabolism. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 77–84.
- Arope, S., Harraghy, N., Pjanic, M., and Mermod, N. (2013). Molecular characterization of a human matrix attachment region epigenetic regulator. *PloS One* 8, e79262.
- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M., Steger, K., Tedder, P., and Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* 19, 1338–1349.
- Attaran, M., Pasqualotto, E., Falcone, T., Goldberg, J.M., Miller, K.F., Agarwal, A., and Sharma, R.K. (2000). The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int. J. Fertil. Womens Med.* 45, 314–320.
- Aveldaño, M.I. (1992). Long and very long polyunsaturated fatty acids of retina and spermatozoa: the whole complement of polyenoic fatty acid series. *Adv. Exp. Med. Biol.* 318, 231–242.
- Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2010). Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56, 44–61.
- Azpiazu, R., Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J.M., Guimerà, M., Ballescà, J.L., Balasch, J., and Oliva, R. (2014). High-throughput sperm differential proteomics suggests that epigenetic alterations contribute to failed assisted reproduction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 29, 1225–1237.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.
- Balhorn, R., Gledhill, B.L., and Wyrobek, A.J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry (Mosc.)* 16, 4074–4080.
- Balhorn, R., Corzett, M., Mazrimas, J., and Watkins, B. (1991). Identification of bull protamine disulfides. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 175–181.

- Bao, J., and Bedford, M.T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reprod. Camb. Engl.* *151*, R55–R70.
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., and Bourc'his, D. (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science* *354*, 909–912.
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M., Charbonnier, G., Couté, Y., Puthier, D., Buchou, T., et al. (2017). Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol. Cell* *66*, 89–101.e8.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* *129*, 823–837.
- Basrai, M.A., and Hieter, P. (1995). Is there a unique form of chromatin at the *Saccharomyces cerevisiae* centromeres? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *17*, 669–672.
- Baumgarten, H.G., Holstein, A.F., and Rosengren, E. (1971). Arrangement, ultrastructure, and adrenergic innervation of smooth musculature of the ductuli efferentes, ductus epididymidis and ductus deferens of man. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *1948 120*, 37–79.
- Bedford, M.T., and Richard, S. (2005). Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* *18*, 263–272.
- Belleannée, C., Thimon, V., and Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res.* *349*, 717–731.
- Bench, G.S., Friz, A.M., Corzett, M.H., Morse, D.H., and Balhorn, R. (1996). DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* *23*, 263–271.
- Benedetti, S., Tagliamonte, M.C., Catalani, S., Primiterra, M., Canestrari, F., De Stefani, S., Palini, S., and Bulletti, C. (2012). Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. *Reprod. Biomed. Online* *25*, 300–306.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* *128*, 669–681.
- Bestor, T. (1988). Structure of mammalian DNA methyltransferase as deduced from the inferred amino acid sequence and direct studies of the protein. *Biochem. Soc. Trans.* *16*, 944–947.
- Bhatnagar, Y.M., McCullar, K., Faulkner, R.D., and Ghai, R.D. (1983). Biochemical and immunological characterization of a histone variant associated with spermatogenesis in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* *760*, 25–33.
- Bhattacharyya, S., Pradhan, K., Campbell, N., Mazdo, J., Vasantkumar, A., Maqbool, S., Bhagat, T.D., Gupta, S., Suzuki, M., Yu, Y., et al. (2017). Altered hydroxymethylation is seen

- at regulatory regions in pancreatic cancer and regulates oncogenic pathways. *Genome Res.* 27, 1830–1842.
- Bhutani, N., Burns, D.M., and Blau, H.M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866–872.
- Bianchi, P.G., Manicardi, G.C., Urner, F., Campana, A., and Sakkas, D. (1996). Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 139–144.
- Biliya, S., and Bulla, L.A. (2010a). Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. *Exp. Biol. Med.* 235, 139–147.
- Biliya, S., and Bulla, L.A. (2010b). Genomic imprinting: the influence of differential methylation in the two sexes. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 235, 139–147.
- Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209–213.
- Bisht, S., and Dada, R. (2017). Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventive strategies. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 9, 420–447.
- Björk, J.K., Sandqvist, A., Elsing, A.N., Kotaja, N., and Sistonen, L. (2010). miR-18, a member of Oncomir-1, targets heat shock transcription factor 2 in spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3177–3184.
- Björndahl, L., and Kvist, U. (2010). Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol. Hum. Reprod.* 16, 23–29.
- Blake, G.E., and Watson, E.D. (2016). Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 33, 101–107.
- Blanco-Rodríguez, J. (2009). gammaH2AX marks the main events of the spermatogenic process. *Microsc. Res. Tech.* 72, 823–832.
- Blencowe, B.J., Nickerson, J.A., Issner, R., Penman, S., and Sharp, P.A. (1994). Association of nuclear matrix antigens with exon-containing splicing complexes. *J. Cell Biol.* 127, 593–607.
- Blobel, C.P. (2000). Functional processing of fertilin: evidence for a critical role of proteolysis in sperm maturation and activation. *Rev. Reprod.* 5, 75–83.
- Boe-Hansen, G.B., Fedder, J., Ersbøll, A.K., and Christensen, P. (2006). The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 21, 1576–1582.
- Bogdanović, O., and Veenstra, G.J.C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549–565.

- Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J.M., Gut, I., Vaiman, D., Jouannet, P., Tost, J., and Jammes, H. (2010). Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 18, 73–80.
- Boitani, C., and Puglisi, R. (2009). Selenium, a Key Element in Spermatogenesis and Male Fertility. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, (Springer, New York, NY), pp. 65–73.
- Boitrelle, F., Guthauser, B., Alter, L., Bailly, M., Wainer, R., Vialard, F., Albert, M., and Selva, J. (2013). The nature of human sperm head vacuoles: a systematic literature review. *Basic Clin. Androl.* 23, 3.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., et al. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 3, e157.
- Booth, M.J., Ost, T.W.B., Beraldi, D., Bell, N.M., Branco, M.R., Reik, W., and Balasubramanian, S. (2013). Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nat. Protoc.* 8, 1841–1851.
- Bouhallier, F., Allioli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M.-H., Durand, P., Samarut, J., Pain, B., and Rouault, J.-P. (2010). Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *RNA N. Y. N* 16, 720–731.
- Bourc'his, D., and Bestor, T.H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99.
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., and Bestor, T.H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536–2539.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–956.
- Boyle, S., Gilchrist, S., Bridger, J.M., Mahy, N.L., Ellis, J.A., and Bickmore, W.A. (2001). The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 211–219.
- Bramlage, B., Kosciessa, U., and Doenecke, D. (1997). Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differ. Res. Biol. Divers.* 62, 13–20.
- Branco, M.R., Ficz, G., and Reik, W. (2011). Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* 13, 7–13.
- Brewer, L., Corzett, M., Lau, E.Y., and Balhorn, R. (2003). Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J. Biol. Chem.* 278, 42403–42408.
- Brunner, A.M., Nanni, P., and Mansuy, I.M. (2014). Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* 7, 2.

- Bryant, J.M., Donahue, G., Wang, X., Meyer-Ficca, M., Luense, L.J., Weller, A.H., Bartolomei, M.S., Blobel, G.A., Meyer, R.G., Garcia, B.A., et al. (2015). Characterization of BRD4 during mammalian postmeiotic sperm development. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 1433–1448.
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schübeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 679–687.
- Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L., and Giwercman, A. (2004). The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum. Reprod.* *19*, 1401–1408.
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., and Giwercman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.* *22*, 174–179.
- Burrue, V., Klooster, K.L., Chitwood, J., Ross, P.J., and Meyers, S.A. (2013). Oxidative Damage to Rhesus Macaque Spermatozoa Results in Mitotic Arrest and Transcript Abundance Changes in Early Embryos. *Biol. Reprod.* *89*, 72.
- Calvi, A., Wong, A.S.W., Wright, G., Wong, E.S.M., Loo, T.H., Stewart, C.L., and Burke, B. (2015). SUN4 is essential for nuclear remodeling during mammalian spermiogenesis. *Dev. Biol.* *407*, 321–330.
- Canovas, S., Ross, P.J., Kelsey, G., and Coy, P. (2017). DNA Methylation in Embryo Development: Epigenetic Impact of ART (Assisted Reproductive Technologies). *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *39*.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* *298*, 1039–1043.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell* *12*, 503–514.
- Caron, C., Col, E., and Khochbin, S. (2003). The viral control of cellular acetylation signaling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *25*, 58–65.
- Caron, N., Veilleux, S., and Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.* *58*, 437–443.
- Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., et al. (2010). Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* *143*, 1084–1096.
- Carone, B.R., Hung, J.-H., Hainer, S.J., Chou, M.-T., Carone, D.M., Weng, Z., Fazio, T.G., and Rando, O.J. (2014). High-Resolution Mapping of Chromatin Packaging in Mouse Embryonic Stem Cells and Sperm. *Dev. Cell* *30*, 11–22.

- Carr, D.W., Usselman, M.C., and Acott, T.S. (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol. Reprod.* *33*, 588–595.
- Casanova, M., Pasternak, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., Probst, A.V., and Almouzni, G. (2013). Heterochromatin reorganization during early mouse development requires a single-stranded noncoding transcript. *Cell Rep.* *4*, 1156–1167.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J., et al. (2002). Genomic Instability in Mice Lacking Histone H2AX. *Science* *296*, 922–927.
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., et al. (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 2074–2085.
- Chakravarthy, S., Gundimella, S.K.Y., Caron, C., Perche, P.-Y., Pehrson, J.R., Khochbin, S., and Luger, K. (2005). Structural characterization of the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 7616–7624.
- Chang, A.S., Moley, K.H., Wangler, M., Feinberg, A.P., and Debaun, M.R. (2005). Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil. Steril.* *83*, 349–354.
- Chattopadhyay, S., and Pavithra, L. (2007). MARs and MARBPs: key modulators of gene regulation and disease manifestation. *Subcell. Biochem.* *41*, 213–230.
- Check, J.H., Adelson, H.G., Schubert, B.R., and Bollendorf, A. (1992). Evaluation of sperm morphology using Kruger's strict criteria. *Arch. Androl.* *28*, 15–17.
- Chedin, F., Lieber, M.R., and Hsieh, C.-L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16916–16921.
- Chen, T., and Li, E. (2004). Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* *60*, 55–89.
- Chen, P., Zhao, J., Wang, Y., Wang, M., Long, H., Liang, D., Huang, L., Wen, Z., Li, W., Li, X., et al. (2013). H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev.* *27*, 2109–2124.
- Chen, Q., Yan, M., Cao, Z., Li, X., Zhang, Y., Shi, J., Feng, G., Peng, H., Zhang, X., Zhang, Y., et al. (2016). Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* *351*, 397–400.
- Chia, N., Wang, L., Lu, X., Senut, M.-C., Brenner, C., and Ruden, D.M. (2011). Hypothesis: environmental regulation of 5-hydroxymethylcytosine by oxidative stress. *Epigenetics* *6*, 853–856.

- Chirat, F., Arkhis, A., Martinage, A., Jaquinod, M., Chevaillier, P., and Sautière, P. (1993). Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim. Biophys. Acta* 1203, 109–114.
- Chiva, M., Saperas, N., and Ribes, E. (2011). Complex chromatin condensation patterns and nuclear protein transitions during spermiogenesis: examples from mollusks. *Tissue Cell* 43, 367–376.
- Clermont Y. ; Lalli M. & Bencsath-Makkai Z., 2009. Light-microscopic histology atlas [WWW Document]. *Light-microscopic histology atlas*. URL <http://audilab.bmed.mcgill.ca/HA/>
- Cho, C., Bunch, D.O., Faure, J.E., Goulding, E.H., Eddy, E.M., Primakoff, P., and Myles, D.G. (1998). Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281, 1857–1859.
- Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82–86.
- Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W.D., Goulding, E.H., Stein, P., Xu, Z., Schultz, R.M., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2003). Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol. Reprod.* 69, 211–217.
- Chopra, M., Amor, D.J., Sutton, L., Algar, E., and Mowat, D. (2010). Russell-Silver syndrome due to paternal H19/IGF2 hypomethylation in a patient conceived using intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Biomed. Online* 20, 843–847.
- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W.M., Coleman, P.D., Rutten, B.P.F., and van den Hove, D.L.A. (2013). Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* 34, 2091–2099.
- Chu, C., Yu, L., Henry-Berger, J., Ru, Y., Kocer, A., Champroux, A., Li, Z-T., He, M., Xie, S., Ma, W., Ni, M., Ni, Z., Guo, Y., Gou, L-T., Liu, Q., Liu, M-F., Degui Chen, C., Zhou, Y., Drevet, J.R. and Zhang, Y. (2018). A group of piRNA-like RNAs (pilRNAs) associated with oxidative stress in the caput epididymis of aging mice.
- Clapier, C.R., Iwasa, J., Cairns, B.R., and Peterson, C.L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 407–422.
- Cocquet, J., Ellis, P.J.I., Yamauchi, Y., Mahadevaiah, S.K., Affara, N.A., Ward, M.A., and Burgoyne, P.S. (2009). The Multicopy Gene Sly Represses the Sex Chromosomes in the Male Mouse Germline after Meiosis. *PLoS Biol* 7, e1000244.
- Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W. (2005). The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7637–7644.

- Cooper, T.G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 119–136.
- Cooper, T.G., and Hamilton, D.W. (1977). Observations on destruction of spermatozoa in the cauda epididymidis and proximal vas deferens of non-seasonal male mammals. *Am. J. Anat.* 149, 93–110.
- Corless, S., and Gilbert, N. (2016). Effects of DNA supercoiling on chromatin architecture. *Biophys. Rev.* 8, 51.
- Cornwall, G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update* 15, 213–227.
- Corzett, M., Mazrimas, J., and Balhorn, R. (2002). Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 519–527.
- Crabo, B. (1965). STUDIES ON THE COMPOSITION OF EPIDIDYMAL CONTENT IN BULLS AND BOARS. *Acta Vet. Scand.* 22, SUPPL 5:1-94.
- Cremer, T., and Cremer, M. (2010). Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Cremer, M., Küpper, K., Wagler, B., Wizelman, L., von Hase, J., Weiland, Y., Kreja, L., Diebold, J., Speicher, M.R., and Cremer, T. (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J. Cell Biol.* 162, 809–820.
- Creyghton, M.P., Markoulaki, S., Levine, S.S., Hanna, J., Lodato, M.A., Sha, K., Young, R.A., Jaenisch, R., and Boyer, L.A. (2008). H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell* 135, 649–661.
- Croft, J.A., Bridger, J.M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W.A. (1999). Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol.* 145, 1119–1131.
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y., and Wang, Z. (2016). DNA methylation in spermatogenesis and male infertility. *Exp. Ther. Med.* 12, 1973–1979.
- Curry, E., Safranski, T.J., and Pratt, S.L. (2011). Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology* 76, 1532–1539.
- Da Ros, V.G., Muñoz, M.W., Battistone, M.A., Brukman, N.G., Carvajal, G., Curci, L., Gómez-Ellas, M.D., Cohen, D.B.J., and Cuasnicu, P.S. (2015). From the epididymis to the egg: participation of CRISP proteins in mammalian fertilization. *Asian J. Androl.* 17, 711–715.
- Dacheux, J.-L., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61, 7–17.

- Dacheux, J.-L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J.L., and Dacheux, F. (2009). Mammalian epididymal proteome. *Mol. Cell. Endocrinol.* *306*, 45–50.
- Dadoune, J.-P. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.* *61*, 56–75.
- Dar, S., Grover, S.A., Moskovtsev, S.I., Swanson, S., Baratz, A., and Librach, C.L. (2013). In vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (>50%). *Fertil. Steril.* *100*, 75–80.
- Dawlaty, M.M., Ganz, K., Powell, B.E., Hu, Y.-C., Markoulaki, S., Cheng, A.W., Gao, Q., Kim, J., Choi, S.-W., Page, D.C., et al. (2011). Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell* *9*, 166–175.
- Dawlaty, M.M., Breiling, A., Le, T., Barrasa, M.I., Raddatz, G., Gao, Q., Powell, B.E., Cheng, A.W., Faull, K.F., Lyko, F., et al. (2014). Loss of Tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Dev. Cell* *29*, 102–111.
- Deaton, A.M., and Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* *25*, 1010–1022.
- Debarle, M., Martinage, A., Sautiere, P., and Chevaillier, P. (1995). Persistence of protamine precursors in mature sperm nuclei of the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* *40*, 84–90.
- Delatte, B., Jeschke, J., Defrance, M., Bachman, M., Creppe, C., Calonne, E., Bizet, M., Deplus, R., Marroquí, L., Libin, M., et al. (2015). Genome-wide hydroxymethylcytosine pattern changes in response to oxidative stress. *Sci. Rep.* *5*, 12714.
- Delaval, K., Wagschal, A., and Feil, R. (2006). Epigenetic deregulation of imprinting in congenital diseases of aberrant growth. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *28*, 453–459.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2289–2301.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* *2*, 819–830.
- Denomme, M.M., McCallie, B.R., Parks, J.C., Schoolcraft, W.B., and Katz-Jaffe, M.G. (2017). Alterations in the sperm histone-retained epigenome are associated with unexplained male factor infertility and poor blastocyst development in donor oocyte IVF cycles. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *32*, 2443–2455.
- Dhar, S., Thota, A., and Rao, M.R.S. (2012). Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 6387–6405.

- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380.
- Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R.R., and Richmond, T.J. (2004). Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 306, 1571–1573.
- Dorostghoal, M., Kazeminejad, S.R., Shahbazian, N., Pourmehdi, M., and Jabbari, A. (2017). Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Andrologia* n/a-n/a.
- Dottermusch-Heidel, C., Gärtner, S.M.K., Tegeder, I., Rathke, C., Barckmann, B., Bartkuhn, M., Bhushan, S., Steger, K., Meinhardt, A., and Renkawitz-Pohl, R. (2014a). H3K79 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-protamine transition in *Drosophila* and rat. *Biol. Open* 3, 444–452.
- Dottermusch-Heidel, C., Klaus, E.S., Gonzalez, N.H., Bhushan, S., Meinhardt, A., Bergmann, M., Renkawitz-Pohl, R., Rathke, C., and Steger, K. (2014b). H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology* 2, 655–665.
- Doussau, M., Lasserre, A., Hammami-Hamza, S., Massaad, C., Gasc, J.M., and Finaz, C. (2008). Testicular and epididymal dual origin of hCAP-18/SOB3, a human sperm protein. *Fertil. Steril.* 90, 853–856.
- Drabent, B., Benavente, R., and Hoyer-Fender, S. (2003). Histone H1t is not replaced by H1.1 or H1.2 in pachytene spermatocytes or spermatids of H1t-deficient mice. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 307–313.
- Drevet, J.R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 70–79.
- Drevet, J.R., Lareyre, J.J., Schwaab, V., Vernet, P., and Dufaure, J.P. (1998). The PEA3 protein of the Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene *gpx5*. *Mol. Reprod. Dev.* 49, 131–140.
- Drevet, J.R. (2017). Sperm DNA integrity testing: a valuable addition to the tool box of infertility clinicians. *Transl. Androl. Urol.* 6, S590–S591.
- Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137, 485–497.
- Ebisch, I.M.W., Thomas, C.M.G., Peters, W.H.M., Braat, D.D.M., and Steegers-Theunissen, R.P.M. (2007). The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Hum. Reprod. Update* 13, 163–174.
- Efimova, O., Pendina, A., Tikhonov, A., E. Parfenyev, S., D. Mekina, I., M. Komarova, E., A. Mazilina, M., Daev, E., G. Chiryayeva, O., A. Galembo, I., et al. (2017). Genome-wide 5-

hydroxymethylcytosine patterns in human spermatogenesis are associated with semen quality. *Oncotarget*.

Eirín-López, J.M., and Ausió, J. (2009). Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *31*, 1062–1070.

El-Domyati, M.M., Al-Din, A.-B.M., Barakat, M.T., El-Fakahany, H.M., Xu, J., and Sakkas, D. (2009). Deoxyribonucleic acid repair and apoptosis in testicular germ cells of aging fertile men: the role of the poly(adenosine diphosphate-ribosyl)ation pathway. *Fertil. Steril.* *91*, 2221–2229.

Eltsov, M., Maclellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J. (2008). Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 19732–19737.

Erenpreisa, J., Freivalds, T., Roach, H., and Alston, R. (1997). Apoptotic cell nuclei favour aggregation and fluorescence quenching of DNA dyes. *Histochem. Cell Biol.* *108*, 67–75.

Erenpreiss, J., Bars, J., Lipatnikova, V., Erenpreisa, J., and Zalkalns, J. (2001). Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J. Androl.* *22*, 45–53.

Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 868–875.

Evenson, D.P., and Wixon, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection

Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., and Claussen, O.P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *14*, 1039–1049.

Evgeni, E., Charalabopoulos, K., and Asimakopoulos, B. (2014). Human Sperm DNA Fragmentation and its Correlation with Conventional Semen Parameters. *J. Reprod. Infertil.* *15*, 2–14.

Faast, R., Thonglairoam, V., Schulz, T.C., Beall, J., Wells, J.R.E., Taylor, H., Matthaei, K., Rathjen, P.D., Tremethick, D.J., and Lyons, I. (2001). Histone variant H2A.Z is required for early mammalian development. *Curr. Biol.* *11*, 1183–1187.

Farthing, C.R., Ficz, G., Ng, R.K., Chan, C.-F., Andrews, S., Dean, W., Hemberger, M., and Reik, W. (2008). Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet.* *4*, e1000116.

Feinberg, J.I., Bakulski, K.M., Jaffe, A.E., Tryggvadottir, R., Brown, S.C., Goldman, L.R., Croen, L.A., Hertz-Picciotto, I., Newschaffer, C.J., Fallin, M.D., et al. (2015). Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort. *Int. J. Epidemiol.* dyv028.

- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., and Alvarez, J.G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *J. Androl.* *24*, 59–66.
- Fernández-Gonzalez, R., Moreira, P.N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramirez, M.A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Alvarez, P., Hourcade, J. de D., Fonseca, F.R. de, et al. (2008). Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring. *Biol. Reprod.* *78*, 761–772.
- Feuer, S.K., Camarano, L., and Rinaudo, P.F. (2013). ART and health: clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. *Mol. Hum. Reprod.* *19*, 189–204.
- Flohé, L. (2007). Selenium in mammalian spermiogenesis. *Biol. Chem.* *388*, 987–995.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* *137*, 472–484.
- Foster, H.A., Abeydeera, L.R., Griffin, D.K., and Bridger, J.M. (2005). Non-random chromosome positioning in mammalian sperm nuclei, with migration of the sex chromosomes during late spermatogenesis. *J. Cell Sci.* *118*, 1811–1820.
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Wyrobek, A.J., Rempel, D.M., and Ames, B.N. (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.* *351*, 199–203.
- Friemel, C., Ammerpohl, O., Gutwein, J., Schmutzler, A.G., Caliebe, A., Kautza, M., von Otte, S., Siebert, R., and Bens, S. (2014). Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertil. Steril.* *101*, 1097–1103.e1.
- Fu, S., Wu, H., Zhang, H., Lian, C.G., and Lu, Q. (2017). DNA methylation/hydroxymethylation in melanoma. *Oncotarget* *8*, 78163–78173.
- Fullston, T., Ohlsson Teague, E.M.C., Palmer, N.O., DeBlasio, M.J., Mitchell, M., Corbett, M., Print, C.G., Owens, J.A., and Lane, M. (2013). Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 4226–4243.
- Fussner, E., Ching, R.W., and Bazett-Jones, D.P. (2011). Living without 30nm chromatin fibers. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 1–6.
- Gan, H., Wen, L., Liao, S., Lin, X., Ma, T., Liu, J., Song, C.-X., Wang, M., He, C., Han, C., et al. (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine during mouse spermatogenesis. *Nat. Commun.* *4*, 1995.
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., Bohacek, J., Pelczar, P., Prados, J., Farinelli, L., Miska, E., and Mansuy, I.M. (2014). Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* *17*, 667–669.

- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Schmid, C.W., and Bradbury, E.M. (1990). Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J. Biol. Chem.* *265*, 20662–20666.
- Gatti, J.-L., Castella, S., Dacheux, F., Ecroyd, H., Métayer, S., Thimon, V., and Dacheux, J.-L. (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* *82–83*, 321–339.
- Gawecka, J.E., Marh, J., Ortega, M., Yamauchi, Y., Ward, M.A., and Ward, W.S. (2013). Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. *PloS One* *8*, e56385.
- Gharagozloo, P., and Aitken, R.J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *26*, 1628–1640.
- Gharagozloo, P., Gutiérrez-Adán, A., Champroux, A., Noblanc, A., Kocer, A., Calle, A., Pérez-Cerezales, S., Pericuesta, E., Polhemus, A., Moazamian, A., et al. (2016). A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *31*, 252–262.
- Ghazali, S., Talebi, A.R., Khalili, M.A., Aflatoonian, A., and Esfandiari, N. (2015). Large nuclear vacuoles in spermatozoa negatively affect pregnancy rate in IVF cycles. *Iran. J. Reprod. Med.* *13*, 425–432.
- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Colombo, R., Milzani, A., and Rossi, R. (2008). Is ascorbate able to reduce disulfide bridges? A cautionary note. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* *19*, 252–258.
- Giwercman, A., Lindstedt, L., Larsson, M., Bungum, M., Spano, M., Levine, R.J., and Rylander, L. (2010). Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: a case-control study. *Int. J. Androl.* *33*, e221-227.
- Gluch, A., Vidakovic, M., and Bode, J. (2008). Scaffold/matrix attachment regions (S/MARs): relevance for disease and therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* *67–103*.
- Gomez, E., Irvine, D.S., and Aitken, R.J. (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int. J. Androl.* *21*, 81–94.
- Gong, S., San Gabriel, M.C., Zini, A., Chan, P., and O’Flaherty, C. (2012). Low amounts and high thiol oxidation of peroxiredoxins in spermatozoa from infertile men. *J. Androl.* *33*, 1342–1351.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., and Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.* *207*, 202–205.
- Goto, Y., Noda, Y., Mori, T., and Nakano, M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* *15*, 69–75.

- Gou, L.-T., Kang, J.-Y., Dai, P., Wang, X., Li, F., Zhao, S., Zhang, M., Hua, M.-M., Lu, Y., Zhu, Y., et al. (2017). Ubiquitination-Deficient Mutations in Human Piwi Cause Male Infertility by Impairing Histone-to-Protamine Exchange during Spermiogenesis. *Cell* *169*, 1090–1104.e13.
- Goutte-Gattat, D., Shuaib, M., Ouararhni, K., Gautier, T., Skoufias, D.A., Hamiche, A., and Dimitrov, S. (2013). Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 8579–8584.
- 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. FEBS* *271*, 3459–3469.
- Govin, J., Caron, C., Escoffier, E., Ferro, M., Kuhn, L., Rousseaux, S., Eddy, E.M., Garin, J., and Khochbin, S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* *281*, 37888–37892.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., et al. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* *176*, 283–294.
- Govin, J., Dorsey, J., Gaucher, J., Rousseaux, S., Khochbin, S., and Berger, S.L. (2010). Systematic screen reveals new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev.* *24*, 1772–1786.
- Gowher, H., Stockdale, C.J., Goyal, R., Ferreira, H., Owen-Hughes, T., and Jeltsch, A. (2005a). De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases. *Biochemistry (Mosc.)* *44*, 9899–9904.
- Gowher, H., Liebert, K., Hermann, A., Xu, G., and Jeltsch, A. (2005b). Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J. Biol. Chem.* *280*, 13341–13348.
- Grandjean, V., Fourné, S., De Abreu, D.A.F., Derieppe, M.-A., Remy, J.-J., and Rassoulzadegan, M. (2015). RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci. Rep.* *5*, 18193.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006). The X and Y Chromosomes Assemble into H2A.Z, Containing Facultative Heterochromatin, following Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 5394–5405.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P., and Tremethick, D.J. (2007). H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 525–530.
- Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., and Tesarik, J. (2005). Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J. Androl.* *26*, 349–353.
- Grimes, S.R., and Henderson, N. (1984). Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp. Cell Res.* *152*, 91–97.

- Gu, A., Ji, G., Shi, X., Long, Y., Xia, Y., Song, L., Wang, S., and Wang, X. (2010). Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *25*, 2955–2961.
- Gu, T.-P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.-P., Xu, G.-F., Liu, W., Xie, Z.-G., Shi, L., He, X., Jin, S., et al. (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* *477*, 606–610.
- Guibert, S., Forné, T., and Weber, M. (2012). Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res.* *22*, 633–641.
- Gupta, N., Madapura, M.P., Bhat, U.A., and Rao, M.R.S. (2015). Mapping of Post-translational Modifications of Transition Proteins, TP1 and TP2, and Identification of Protein Arginine Methyltransferase 4 and Lysine Methyltransferase 7 as Methyltransferase for TP2. *J. Biol. Chem.* *290*, 12101.
- Hackett, J.A., Zyllicz, J.J., and Surani, M.A. (2012). Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline. *Trends Genet. TIG* *28*, 164–174.
- Hackett, J.A., Sengupta, R., Zyllicz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., and Surani, M.A. (2013). Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* *339*, 448–452.
- Hada, M., Masuda, K., Yamaguchi, K., Shirahige, K., and Okada, Y. (2017). Identification of a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis. *Sci. Rep.* *7*, 46228.
- Haffner, M.C., Chau, A., Meeker, A.K., Esopi, D.M., Gerber, J., Pellakuru, L.G., Toubaji, A., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Nelson, W.G., et al. (2011). Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* *2*, 627–637.
- Haidl, G., and Opper, C. (1997). Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *12*, 2720–2723.
- Haidl, G., Allam, J.P., and Schuppe, H.-C. (2008). Chronic epididymitis: impact on semen parameters and therapeutic options. *Andrologia* *40*, 92–96.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* *117*, 15–23.
- Hajkova, P., Jeffries, S.J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S.P., and Surani, M.A. (2010). Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science* *329*, 78–82.
- Hall, J.C., Hadley, J., and Doman, T. (1991). Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl.* *12*, 76–87.

- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Hammoud, A.O., Gibson, M., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2011). Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 26, 2558–2569.
- Hampton, M.B., and O'Connor, K.M. (2016). Peroxiredoxins and the Regulation of Cell Death. *Mol. Cells* 39, 72–76.
- Hartmann, S., Bergmann, M., Bohle, R.M., Weidner, W., and Steger, K. (2006). Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 12, 407–411.
- Harton, G.L., and Tempest, H.G. (2012). Chromosomal disorders and male infertility. *Asian J. Androl.* 14, 32–39.
- Hawkes, W.C., and Turek, P.J. (2001). Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *J. Androl.* 22, 764–772.
- Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Kaneda, M., Tang, F., Hajkova, P., Lao, K., O'Carroll, D., Das, P.P., Tarakhovsky, A., Miska, E.A., et al. (2008). MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS One* 3, e1738.
- Hayashi-Takanaka, Y., Yamagata, K., Wakayama, T., Stasevich, T.J., Kainuma, T., Tsurimoto, T., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kurumizaka, H., Nozaki, N., et al. (2011). Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Res.* 39, 6475–6488.
- Hazzouri, M., Rousseaux, S., Mongelard, F., Usson, Y., Pelletier, R., Faure, A.K., Vourc'h, C., and Sèle, B. (2000). Genome organization in the human sperm nucleus studied by FISH and confocal microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 307–315.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303–1307.
- Hecht, N.B. (1990). Regulation of “haploid expressed genes” in male germ cells. *J. Reprod. Fertil.* 88, 679–693.
- Hedger, M.P. (2011). Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J. Androl.* 32, 625–640.
- van der Heijden, G.W., Derijck, A. a. H.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Dev. Biol.* 298, 458–469.
- Hess, R.A., and Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 1–15.

- Higgins, L.G., and Hayes, J.D. (2011). Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* 43, 92–137.
- Hirasawa, R., Chiba, H., Kaneda, M., Tajima, S., Li, E., Jaenisch, R., and Sasaki, H. (2008). Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development. *Genes Dev.* 22, 1607–1616.
- Hisano, M., Erkek, S., Dessus-Babus, S., Ramos, L., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2013). Genome-wide chromatin analysis in mature mouse and human spermatozoa. *Nat. Protoc.* 8, 2449–2470.
- Holliday, R., and Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226–232.
- Holstein A.-F., 1994. Männliche Geschlechtsorgane ; Dans : Graumann W., Holstein A.-F., Sasse D. *et al.* (Éd.), *Taschenbuch der Anatomie. Innere Organe, Kreislaufsystem, Abwehrsystem.* Elsevier, München, Stuttgart, p. 714.
- Horsthemke, B. (2014). In brief: genomic imprinting and imprinting diseases. *J. Pathol.* 232, 485–487.
- Houben, J.M.J., Moonen, H.J.J., van Schooten, F.J., and Hageman, G.J. (2008). Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic. Biol. Med.* 44, 235–246.
- Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Chaillet, J.R. (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104, 829–838.
- Hoyer-Fender, S., Singh, P.B., and Motzkus, D. (2000). The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 254, 72–79.
- Hud, N.V., Allen, M.J., Downing, K.H., Lee, J., and Balhorn, R. (1993). Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 1347–1354.
- Hud, N.V., Downing, K.H., and Balhorn, R. (1995). A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3581–3585.
- Huh, N.E., Hwang, I.W., Lim, K., You, K.H., and Chae, C.B. (1991). Presence of a bi-directional S phase-specific transcription regulatory element in the promoter shared by testis-specific TH2A and TH2B histone genes. *Nucleic Acids Res.* 19, 93–98.
- Hutcheon, K., McLaughlin, E.A., Stanger, S.J., Bernstein, I.R., Dun, M.D., Eamens, A.L., and Nixon, B. (2017). Analysis of the small non-protein-coding RNA profile of mouse spermatozoa reveals specific enrichment of piRNAs within mature spermatozoa. *RNA Biol.* 0.

- Ichiyanagi, K. (2013). Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs. *Genes Genet. Syst.* *88*, 19–29.
- Iguchi-Arigo, S.M., and Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* *3*, 612–619.
- Iliadou, A.N., Janson, P.C.J., and Cnattingius, S. (2011a). Epigenetics and assisted reproductive technology. *J. Intern. Med.* *270*, 414–420.
- Iliadou, A.N., Janson, P.C.J., and Cnattingius, S. (2011b). Epigenetics and assisted reproductive technology. *J. Intern. Med.* *270*, 414–420.
- Ioannou, D., Kandukuri, L., Quadri, A., Becerra, V., Simpson, J.L., and Tempest, H.G. (2015). Spatial positioning of all 24 chromosomes in the lymphocytes of six subjects: evidence of reproducible positioning and spatial repositioning following DNA damage with hydrogen peroxide and ultraviolet B. *PloS One* *10*, e0118886.
- Ioannou, D., Miller, D., Griffin, D.K., and Tempest, H.G. (2016). Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *J. Assist. Reprod. Genet.* *33*, 157–166.
- Ioannou, D., Millan, N.M., Jordan, E., and Tempest, H.G. (2017). A new model of sperm nuclear architecture following assessment of the organization of centromeres and telomeres in three-dimensions. *Sci. Rep.* *7*, 41585.
- Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., and Szabó, P.E. (2011). Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 3642–3647.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* *333*, 1300–1303.
- Izzo, A., and Schneider, R. (2016). The role of linker histone H1 modifications in the regulation of gene expression and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* *1859*, 486–495.
- Jain, D., Meydan, C., Lange, J., Claeys Bouuaert, C., Lailier, N., Mason, C.E., Anderson, K.V., and Keeney, S. (2017). rahu is a mutant allele of Dnmt3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. *PLoS Genet.* *13*, e1006964.
- Jason, L.J.M., Moore, S.C., Lewis, J.D., Lindsey, G., and Ausió, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *24*, 166–174.
- Jedrzejczak, P., Kempisty, B., Bryja, A., Mostowska, M., Depa-Martynow, M., Pawelczyk, L., and Jagodzinski, P.P. (2007). Quantitative assessment of transition proteins 1, 2 spermatid-specific linker histone H1-like protein transcripts in spermatozoa from normozoospermic and asthenozoospermic men. *Arch. Androl.* *53*, 199–205.

- Jena, N.R. (2012). DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* *37*, 503–517.
- Jha, R., Agarwal, A., Mahfouz, R., Paasch, U., Grunewald, S., Sabanegh, E., Yadav, S.P., and Sharma, R. (2009). Determination of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) homologues in human ejaculated sperm and its correlation with sperm maturation. *Fertil. Steril.* *91*, 782–790.
- Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A., and Cheng, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* *449*, 248–251.
- Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* *21*, 1519–1529.
- Jirtle, R.L., and Skinner, M.K. (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 253–262.
- Johnson, A.L., and Howards, S.S. (1975). Intratubular hydrostatic pressure in testis and epididymis before and after vasectomy. *Am. J. Physiol.* *228*, 556–564.
- Johnston, D.S., Jelinsky, S.A., Bang, H.J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., and Turner, T.T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biol. Reprod.* *73*, 404–413.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 484–492.
- Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* *53*, 73–84.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., and European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur. Urol.* *62*, 324–332.
- Kalitsis, P., MacDonald, A.C., Newson, A.J., Hudson, D.F., and Choo, K.H. (1998). Gene structure and sequence analysis of mouse centromere proteins A and C. *Genomics* *47*, 108–114.
- Kang, J., Lienhard, M., Pastor, W.A., Chawla, A., Novotny, M., Tsagaratou, A., Lasken, R.S., Thompson, E.C., Surani, M.A., Koralov, S.B., et al. (2015). Simultaneous deletion of the methylcytosine oxidases Tet1 and Tet3 increases transcriptome variability in early embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, E4236.
- Katari, S., Turan, N., Bibikova, M., Erinle, O., Chalian, R., Foster, M., Gaughan, J.P., Coutifaris, C., and Sapienza, C. (2009). DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3769–3778.
- Kelley-Quon, L.I., Tseng, C.-H., Janzen, C., and Shew, S.B. (2013). Congenital malformations associated with assisted reproductive technology: A California statewide analysis. *J. Pediatr. Surg.* *48*, 1218–1224.

- Kennedy, B.P., and Davies, P.L. (1980). Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins. *J. Biol. Chem.* *255*, 2533–2539.
- Kennedy, C., Ahlering, P., Rodriguez, H., Levy, S., and Sutovsky, P. (2011). Sperm chromatin structure correlates with spontaneous abortion and multiple pregnancy rates in assisted reproduction. *Reprod. Biomed. Online* *22*, 272–276.
- Keskes-Ammar, L., Feki-Chakroun, N., Rebai, T., Sahnoun, Z., Ghazzi, H., Hammami, S., Zghal, K., Fki, H., Damak, J., and Bahloul, A. (2003). Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. *Arch. Androl.* *49*, 83–94.
- Khare, T., Pai, S., Koncevicius, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., Irimia, M., Jia, P., Ptak, C., Xia, M., et al. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1037–1043.
- Khazaie, Y., and Nasr Esfahani, M.H. (2014). MicroRNA and Male Infertility: A Potential for Diagnosis. *Int. J. Fertil. Steril.* *8*, 113–118.
- Khoeiry, R., Sohni, A., Thienpont, B., Luo, X., Velde, J.V., Bartocetti, M., Boeckx, B., Zwijsen, A., Rao, A., Lambrechts, D., et al. (2017). Lineage-specific functions of TET1 in the postimplantation mouse embryo. *Nat. Genet.* *49*, 1061–1072.
- Kim, H.-S., Kang, M.J., Kim, S.A., Oh, S.K., Kim, H., Ku, S.-Y., Kim, S.H., Moon, S.Y., and Choi, Y.M. (2013). The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin. Exp. Reprod. Med.* *40*, 23–28.
- Kim, J., Zhao, H., Dan, J., Kim, S., Hardikar, S., Hollowell, D., Lin, K., Lu, Y., Takata, Y., Shen, J., et al. (2016a). Maternal Setdb1 Is Required for Meiotic Progression and Preimplantation Development in Mouse. *PLoS Genet.* *12*, e1005970.
- Kim, J., Zhao, H., Dan, J., Kim, S., Hardikar, S., Hollowell, D., Lin, K., Lu, Y., Takata, Y., Shen, J., et al. (2016b). Maternal Setdb1 Is Required for Meiotic Progression and Preimplantation Development in Mouse. *PLoS Genet.* *12*, e1005970.
- Kino, K., Hirao-Suzuki, M., Morikawa, M., Sakaga, A., and Miyazawa, H. (2017). Generation, repair and replication of guanine oxidation products. *Genes Environ. Off. J. Jpn. Environ. Mutagen Soc.* *39*, 21.
- Kirchhoff, C. (1999). Gene expression in the epididymis. *Int. Rev. Cytol.* *188*, 133–202.
- Kirschner, K., Krueger, F., Green, A.R., and Chandra, T. (2018). Multiplexing for Oxidative Bisulfite Sequencing (oxBS-seq). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1708*, 665–678.
- Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* *85*, 1077–1088.

- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., and Ahnström, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* 363, 89–96.
- Kobayashi, H., Hiura, H., John, R.M., Sato, A., Otsu, E., Kobayashi, N., Suzuki, R., Suzuki, F., Hayashi, C., Utsunomiya, T., et al. (2009). DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 17, 1582–1591.
- Kocer, A., Henry-Berger, J., Noblanc, A., Champroux, A., Pogorelcnik, R., Guiton, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Saez, F., Johnson, G.D., et al. (2015). Oxidative DNA damage in mouse sperm chromosomes: Size matters. *Free Radic. Biol. Med.*
- Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–479.
- Kolasa, A., Marchlewicz, M., Adler, G., Ciecchanowicz, A., Głabowski, W., and Wiszniewska, B. (2008). Expression of E-SOD, GPX5 mRNAs and immunoexpression of Cu/ZnSOD in epididymal epithelial cells of finasteride-treated rats. *Andrologia* 40, 303–311.
- Komiya, A., Watanabe, A., Kawauchi, Y., and Fuse, H. (2013). Sperm with large nuclear vacuoles and semen quality in the evaluation of male infertility. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 59, 13–20.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868–871.
- Kramer, J.A., and Krawetz, S.A. (1997). RNA in spermatozoa: implications for the alternative haploid genome. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 473–478.
- Krausz, C., and Casamonti, E. (2017). Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum. Genet.* 136, 637–655.
- Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W.L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C.D., Guacci, V., Khochbin, S., et al. (2006). Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.* 20, 2580–2592.
- Kullisaar, T., Türk, S., Punab, M., Korrovits, P., Kisand, K., Rehemaa, A., Zilmer, K., Zilmer, M., and Mändar, R. (2008). Oxidative stress in leucocytospermic prostatitis patients: preliminary results. *Andrologia* 40, 161–172.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., et al. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 131, 839–849.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917.

- La Salle, S., and Trasler, J.M. (2006). Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev. Biol.* 296, 71–82.
- La Spina, F.A., Romanato, M., Brugo-Olmedo, S., De Vincentiis, S., Julianelli, V., Rivera, R.M., and Buffone, M.G. (2014). Heterogeneous distribution of histone methylation in mature human sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.* 31, 45–49.
- Laberge, R.-M., and Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 73, 289–296.
- 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.
- Lambrot, R., Xu, C., Saint-Phar, S., Chountalos, G., Cohen, T., Paquet, M., Suderman, M., Hallett, M., and Kimmins, S. (2013). Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat. Commun.* 4.
- Lamirande, E. de, and O’Flaherty, C. (2012). Sperm Capacitation as an Oxidative Event. In *Studies on Men’s Health and Fertility*, (Humana Press), pp. 57–94.
- de Lamirande, E., and O’Flaherty, C. (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 106–115.
- Lane, M., McPherson, N.O., Fullston, T., Spillane, M., Sandeman, L., Kang, W.X., and Zander-Fox, D.L. (2014). Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PloS One* 9, e100832.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., and Reik, W. (2003). Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35, 88–93.
- Langemeijer, S.M.C., Aslanyan, M.G., and Jansen, J.H. (2009). TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 4044–4048.
- Lanzafame, F.M., La Vignera, S., Vicari, E., and Calogero, A.E. (2009). Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod. Biomed. Online* 19, 638–659.
- Larsen, E., Kwon, K., Coin, F., Egly, J.-M., and Klungland, A. (2004). Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. *DNA Repair* 3, 1457–1468.
- Lee, W., Wells, T., and Kantorow, M. (2007). Localization and H₂O₂-specific induction of PRDX3 in the eye lens. *Mol. Vis.* 13, 1469–1474.
- Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865–873.
- Lévesque, D., Veilleux, S., Caron, N., and Boissonneault, G. (1998). Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252, 602–609.

- Lewis, S.E.M., and Aitken, R.J. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* 322, 33–41.
- Lewis, S.E., Sterling, E.S., Young, I.S., and Thompson, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 67, 142–147.
- Lewis, S.E.M., John Aitken, R., Conner, S.J., Iuliis, G.D., Evenson, D.P., Henkel, R., Giwercman, A., and Gharagozloo, P. (2013). The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online* 27, 325–337.
- Li, J., and Jiang, D. (2015). The role of epigenomics in the neurodegeneration of ataxia-telangiectasia. *Epigenomics* 7, 137–141.
- Li, S., Papale, L.A., Zhang, Q., Madrid, A., Chen, L., Chopra, P., Keleş, S., Jin, P., and Alisch, R.S. (2016). Genome-wide alterations in hippocampal 5-hydroxymethylcytosine links plasticity genes to acute stress. *Neurobiol. Dis.* 86, 99–108.
- Li, W., Wu, J., Kim, S.-Y., Zhao, M., Hearn, S.A., Zhang, M.Q., Meistrich, M.L., and Mills, A.A. (2014). Chd5 orchestrates chromatin remodeling during sperm development. *Nat. Commun.* 5, 3812.
- Lian, J., Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., Li, X., and Sun, F. (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 7, 13.
- Lin, M.-H., Kuo-Kuang Lee, R., Li, S.-H., Lu, C.-H., Sun, F.-J., and Hwu, Y.-M. (2008). Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil. Steril.* 90, 352–359.
- Linnemann, A.K., Platts, A.E., and Krawetz, S.A. (2009). Differential nuclear scaffold/matrix attachment marks expressed genes. *Hum. Mol. Genet.* 18, 645–654.
- Liu, D.Y., and Baker, H.W.G. (2007). Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Hum. Reprod.* 22, 1597–1602.
- Liu, W.-M., Pang, R.T.K., Chiu, P.C.N., Wong, B.P.C., Lao, K., Lee, K.-F., and Yeung, W.S.B. (2012). Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 490–494.
- Lombardo, F., Sansone, A., Romanelli, F., Paoli, D., Gandini, L., and Lenzi, A. (2011). The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J. Androl.* 13, 690–697.
- López, V., Fernández, A.F., and Fraga, M.F. (2017). The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* 37, 28–38.

- Lu, L.-Y., Wu, J., Ye, L., Gavrilina, G.B., Saunders, T.L., and Yu, X. (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Dev. Cell* 18, 371–384.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Luo, L.-F., Hou, C.-C., and Yang, W.-X. (2016). Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene* 578, 141–157.
- Ly, L., Chan, D., Aarabi, M., Landry, M., Behan, N.A., MacFarlane, A.J., and Trasler, J. (2017). Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 461–477.
- Maatouk, D.M., Loveland, K.L., McManus, M.T., Moore, K., and Harfe, B.D. (2008). Dicer1 is required for differentiation of the mouse male germline. *Biol. Reprod.* 79, 696–703.
- Madugundu, G.S., Cadet, J., and Wagner, J.R. (2014). Hydroxyl-radical-induced oxidation of 5-methylcytosine in isolated and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.* 42, 7450–7460.
- Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010). Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 291–297.
- Makker, K., Agarwal, A., and Sharma, R. (2009). Oxidative stress & male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129, 357–367.
- Malaspina, D., Gilman, C., and Kranz, T.M. (2015). Paternal age and mental health of offspring. *Fertil. Steril.* 103, 1392–1396.
- Malone, C.D., and Hannon, G.J. (2009). Molecular evolution of piRNA and transposon control pathways in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 74, 225–234.
- Maltseva, D.V., Baykov, A.A., Jeltsch, A., and Gromova, E.S. (2009). Impact of 7,8-dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG site by Dnmt3a. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 1361–1368.
- Marchetti, F., Bishop, J., Gingerich, J., and Wyrobek, A.J. (2015). Meiotic interstrand DNA damage escapes paternal repair and causes chromosomal aberrations in the zygote by maternal misrepair. *Sci. Rep.* 5, 7689.
- Marcon, L., and Boissonneault, G. (2004). Transient DNA Strand Breaks During Mouse and Human Spermiogenesis: New Insights in Stage Specificity and Link to Chromatin Remodeling. *Biol. Reprod.* 70, 910–918.
- Marees, T., Dommering, C.J., Imhof, S.M., Kors, W.A., Ringens, P.J., van Leeuwen, F.E., and Moll, A.C. (2009). Incidence of retinoblastoma in Dutch children conceived by IVF: an expanded study. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 24, 3220–3224.

- Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., and Sousa, M. (2008). Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol. Hum. Reprod.* *14*, 67–74.
- 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.
- de Mateo, S., Gázquez, C., Guimerà, M., Balasch, J., Meistrich, M.L., Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2009). Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil. Steril.* *91*, 715–722.
- Matrisciano, F., Tueting, P., Dalal, I., Kadriu, B., Grayson, D.R., Davis, J.M., Nicoletti, F., and Guidotti, A. (2013). Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology* *68*, 184–194.
- Mattiroli, F., D’Arcy, S., and Luger, K. (2015). The right place at the right time: chaperoning core histone variants. *EMBO Rep.* *16*, 1454–1466.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* *403*, 501–502.
- McGhee, J.D., Nickol, J.M., Felsenfeld, G., and Rau, D.C. (1983). Higher order structure of chromatin: Orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length. *Cell* *33*, 831–841.
- McPherson, S.M., and Longo, F.J. (1993). Nicking of rat spermatid and spermatozoa DNA: possible involvement of DNA topoisomerase II. *Dev. Biol.* *158*, 122–130.
- McPherson, N.O., Fullston, T., Kang, W.X., Sandeman, L.Y., Corbett, M.A., Owens, J.A., and Lane, M. (2016). Paternal under-nutrition programs metabolic syndrome in offspring which can be reversed by antioxidant/vitamin food fortification in fathers. *Sci. Rep.* *6*, 27010.
- Meinke, P., and Schirmer, E.C. (2015). LINC’ing form and function at the nuclear envelope. *FEBS Lett.* *589*, 2514–2521.
- Meistrich, M.L., Hughes, T.H., and Bruce, W.R. (1975). Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature* *258*, 145–147.
- Meistrich, M.L., Trostle-Weige, P.K., Lin, R., Allis, C.D., and Bhatnagar, Y.M. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* *31*, 170–181.
- Mejos, K.K., Kim, H.W., Lim, E.M., and Chang, N. (2013). Effects of parental folate deficiency on the folate content, global DNA methylation, and expressions of FR α , IGF-2 and IGF-1R in the postnatal rat liver. *Nutr. Res. Pract.* *7*, 281–286.

- Melis, J.P.M., Steeg, H. van, and Luijten, M. (2013). Oxidative DNA Damage and Nucleotide Excision Repair. *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 2409.
- Mender, I., and Shay, J.W. (2015). Telomere Restriction Fragment (TRF) Analysis. *Bio-Protoc.* *5*.
- Meneghini, M.D., Wu, M., and Madhani, H.D. (2003). Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell* *112*, 725–736.
- Menezo, Y., Evenson, D., Cohen, M., and Dale, B. (2014). Effect of antioxidants on sperm genetic damage. *Adv. Exp. Med. Biol.* *791*, 173–189.
- Messerschmidt, D.M., de Vries, W., Ito, M., Solter, D., Ferguson-Smith, A., and Knowles, B.B. (2012). Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. *Science* *335*, 1499–1502.
- Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B., and Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev.* *28*, 812–828.
- Meyer-Ficca, M.L., Lonchar, J., Credidio, C., Ihara, M., Li, Y., Wang, Z.-Q., and Meyer, R.G. (2009). Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol. Reprod.* *81*, 46–55.
- 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., Ihara, M., Bader, J.J., Leu, N.A., Beneke, S., and Meyer, R.G. (2015). Spermatid head elongation with normal nuclear shaping requires ADP-ribosyltransferase PARP11 (ARTD11) in mice. *Biol. Reprod.* *92*, 80.
- Microscopy & Imaging Facility, Hamilton College, Clinton, NY, Etats-Unis*
- Millan, N.M., Lau, P., Hann, M., Ioannou, D., Hoffman, D., Barrionuevo, M., Maxson, W., Ory, S., and Tempest, H.G. (2012). Hierarchical radial and polar organisation of chromosomes in human sperm. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *20*, 875–887.
- Miller, D., Ostermeier, G.C., and Krawetz, S.A. (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol. Med.* *11*, 156–163.
- Mishra, L.N., Gupta, N., and Rao, S.M.R. (2015). Mapping of post-translational modifications of spermatid-specific linker histone H1-like protein, HILS1. *J. Proteomics* *128*, 218–230.
- Mital, P., Hinton, B.T., and Dufour, J.M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol. Reprod.* *84*, 851–858.

- Mladenov, E., and Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat. Res.* 711, 61–72.
- Molaro, A., Hodges, E., Fang, F., Song, Q., McCombie, W.R., Hannon, G.J., and Smith, A.D. (2011). Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates. *Cell* 146, 1029–1041.
- Montellier, E., Rousseaux, S., Zhao, Y., and Khochbin, S. (2012). Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: post-meiotic male-specific gene expression. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 34, 187–193.
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Héry, P., Curtet, S., et al. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* 27, 1680–1692.
- Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., et al. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. *Cancer Cell* 20, 11–24.
- Moreno, S.G., Laux, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., and Conrad, M. (2003). Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem.* 384, 635–643.
- Morris, J., Bell, T.J., Buckley, P.T., and Eberwine, J.H. (2014). Antisense RNA amplification for target assessment of total mRNA from a single cell. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2014, 1149–1160.
- Morton, B.E., Sagadraca, R., and Fraser, C. (1978). Sperm motility within the mammalian epididymis: species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. *Fertil. Steril.* 29, 695–698.
- Mudrak, O.S., Nazarov, I.B., Jones, E.L., and Zalensky, A.O. (2012). Positioning of chromosomes in human spermatozoa is determined by ordered centromere arrangement. *PloS One* 7, e52944.
- Murphy, S.K., and Jirtle, R.L. (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 25, 577–588.
- Nadel, B., de Lara, J., Finkernagel, S.W., and Ward, W.S. (1995). Cell-specific organization of the 5S ribosomal RNA gene cluster DNA loop domains in spermatozoa and somatic cells. *Biol. Reprod.* 53, 1222–1228.
- Nagele, R., Freeman, T., McMorrow, L., and Lee, H.Y. (1995). Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order. *Science* 270, 1831–1835.
- Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 64–71.

- Nakamura, T., Liu, Y.-J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y., and Nakano, T. (2012). PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486, 415–419.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386–389.
- Nanassy, L., and Carrell, D.T. (2011). Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertil. Steril.* 95, 2310–2314.
- Nanassy, L., Liu, L., Griffin, J., and Carrell, D.T. (2011). The clinical utility of the protamine 1/protamine 2 ratio in sperm. *Protein Pept. Lett.* 18, 772–777.
- Nashun, B., Yukawa, M., Liu, H., Akiyama, T., and Aoki, F. (2010). Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Dev. Camb. Engl.* 137, 3785–3794.
- Navarro-Costa, P., Nogueira, P., Carvalho, M., Leal, F., Cordeiro, I., Calhaz-Jorge, C., Gonçalves, J., and Plancha, C.E. (2010). Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 2647–2654.
- Nekrasov, M., Soboleva, T.A., Jack, C., and Tremethick, D.J. (2013). Histone variant selectivity at the transcription start site: H2A.Z or H2A.Lap1. *Nucleus* 4, 431–437.
- Netto, L.E.S., and Antunes, F. (2016). The Roles of Peroxiredoxin and Thioredoxin in Hydrogen Peroxide Sensing and in Signal Transduction. *Mol. Cells* 39, 65–71.
- Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Laybutt, D.R., Barres, R., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2010). Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 467, 963–966.
- Ng, S.-F., Lin, R.C.Y., Maloney, C.A., Youngson, N.A., Owens, J.A., and Morris, M.J. (2014). Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1830–1841.
- Nickerson, J.A., Krockmalnic, G., Wan, K.M., and Penman, S. (1997). The nuclear matrix revealed by eluting chromatin from a cross-linked nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4446–4450.
- Niemitz, E.L., and Feinberg, A.P. (2004). Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 599–609.
- Noack-Füller, G., De Beer, C., and Seibert, H. (1993). Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. *Andrologia* 25, 7–12.
- Noblanc, A., Peltier, M., Damon-Soubeyrand, C., Kerchkove, N., Chabory, E., Vernet, P., Saez, F., Cadet, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., et al. (2012). Epididymis response partly compensates

for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *PLoS One* 7, e38565.

Noblanc, A., Damon-Soubeyrand, C., Karrich, B., Henry-Berger, J., Cadet, R., Saez, F., Guiton, R., Janny, L., Pons-Rejraji, H., Alvarez, J.G., et al. (2013). DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radic. Biol. Med.* 65, 719–723.

Noblanc, A., Kocer, A., and Drevet, J.R. (2014). Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge. *Basic Clin. Androl.* 24, 6.

Öberg, C., Izzo, A., Schneider, R., Wrangé, Ö., and Belikov, S. (2012). Linker histone subtypes differ in their effect on nucleosomal spacing in vivo. *J. Mol. Biol.* 419, 183–197.

O’Flaherty, C., and de Souza, A.R. (2011). Hydrogen peroxide modifies human sperm peroxiredoxins in a dose-dependent manner. *Biol. Reprod.* 84, 238–247.

Ohno, M., Sakumi, K., Fukumura, R., Furuichi, M., Iwasaki, Y., Hokama, M., Ikemura, T., Tsuzuki, T., Gondo, Y., and Nakabeppu, Y. (2014). 8-oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci. Rep.* 4, 4689.

Okamura, K., and Lai, E.C. (2008). Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 673–678.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.

Oleszczuk, K., Giwercman, A., and Bungum, M. (2016). Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. *Andrology* 4, 290–296.

Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update* 12, 417–435.

Oliva, R., and Mezquita, C. (1982). Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally inactive rooster testis spermatids. *Nucleic Acids Res.* 10, 8049–8059.

Olszewska, M., Wiland, E., and Kurpisz, M. (2008). Positioning of chromosome 15, 18, X and Y centromeres in sperm cells of fertile individuals and infertile patients with increased level of aneuploidy. *Chromosome Res.* 16, 875–890.

Opresko, P.L., Fan, J., Danzy, S., Wilson, D.M., and Bohr, V.A. (2005). Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. *Nucleic Acids Res.* 33, 1230–1239.

Orgebin-Crist, M.-C., Boivineau, L., and Fontaubert, Y. de (1962). RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LA DURÉE DE PASSAGE DES SPERMATOZOÏDES DANS L’ÉPIDIDYME DU TAUREAU. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 2, 51–108.

Orgebin-Crist, M.-C., Danzo, B. J., and Davies, J. (1975). Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In *Handbook of Physiology* (R.

- O. Greep and E. B. Astwood, Eds.), Section 7, Vol. 5, pp. 319–338. American Physiological Society, Washington, DC.
- Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2009). Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *Int. J. Dev. Biol.* *53*, 231–243.
- Ostermeier, G.C., Miller, D., Huntriss, J.D., Diamond, M.P., and Krawetz, S.A. (2004). Reproductive biology: Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* *429*, 154–154.
- Ostertag, E.M., and Kazazian, H.H. (2001). Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* *35*, 501–538.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol. CB* *10*, 475–478.
- Owen, C.M., and Segars, J.H. (2009). Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Semin. Reprod. Med.* *27*, 417–428.
- Ozkosem, B., Feinstein, S.I., Fisher, A.B., and O’Flaherty, C. (2015). Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice. *Redox Biol.* *5*, 15–23.
- Pacchierotti, F., and Spanò, M. (2015). Environmental Impact on DNA Methylation in the Germline: State of the Art and Gaps of Knowledge. *BioMed Res. Int.* *2015*, 123484.
- Palmer, D.K., O’Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 3734–3738.
- Pant, V., Mariano, P., Kanduri, C., Mattsson, A., Lobanenkoy, V., Heuchel, R., and Ohlsson, R. (2003). The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. *Genes Dev.* *17*, 586–590.
- Pantano, L., Jodar, M., Bak, M., Ballescà, J.L., Tommerup, N., Oliva, R., and Vavouri, T. (2015). The small RNA content of human sperm reveals pseudogene-derived piRNAs complementary to protein-coding genes. *RNA N. Y. N* *21*, 1085–1095.
- Papale, L.A., Madrid, A., Li, S., and Alisch, R.S. (2017). Early-life stress links 5-hydroxymethylcytosine to anxiety-related behaviors. *Epigenetics* *12*, 264–276.
- Pasch, E., Link, J., Beck, C., Scheuerle, S., and Alsheimer, M. (2015). The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility. *Biol. Open* *4*, 1792–1802.
- Pastor, W.A., Pape, U.J., Huang, Y., Henderson, H.R., Lister, R., Ko, M., McLoughlin, E.M., Brudno, Y., Mahapatra, S., Kapranov, P., et al. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* *473*, 394–397.

- Pearson Education, 2012
Pehrson, J.R., Changolkar, L.N., Costanzi, C., and Leu, N.A. (2014). Mice without MacroH2A Histone Variants. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 4523.
- Peñagarikano, O., Abrahams, B.S., Herman, E.I., Winden, K.D., Gdalyahu, A., Dong, H., Sonnenblick, L.I., Gruver, R., Almajano, J., Bragin, A., et al. (2011). Absence of CNTNAP2 leads to epilepsy, neuronal migration abnormalities, and core autism-related deficits. *Cell* *147*, 235–246.
- Pentakota, S.K., Sandhya, S., P Sikarwar, A., Chandra, N., and Satyanarayana Rao, M.R. (2014). Mapping post-translational modifications of mammalian testicular specific histone variant TH2B in tetraploid and haploid germ cells and their implications on the dynamics of nucleosome structure. *J. Proteome Res.* *13*, 5603–5617.
- Perdrix, A., Travers, A., Clatot, F., Sibert, L., Mitchell, V., Jumeau, F., Macé, B., and Rives, N. (2013). Modification of chromosomal architecture in human spermatozoa with large vacuoles. *Andrology* *1*, 57–66.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., and Behne, D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 1236–1238.
- Physiologie Humaine Sherwood, 2006 De Boeck
Piatek, M.J., and Werner, A. (2014). Endogenous siRNAs: regulators of internal affairs. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 1174–1179.
- Pieczynska, J., and Grajeta, H. The role of selenium in human conception and pregnancy. *J. Trace Elem. Med. Biol.*
- Pinborg, A., Hougaard, C.O., Nyboe Andersen, A., Molbo, D., and Schmidt, L. (2009). Prospective longitudinal cohort study on cumulative 5-year delivery and adoption rates among 1338 couples initiating infertility treatment. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 991–999.
- Pipolo, S., Puglisi, R., Mularoni, V., Esposito, V., Fuso, A., Lucarelli, M., Fiorenza, M.T., Mangia, F., and Boitani, C. (2017). Involvement of sperm acetylated histones and the nuclear isoform of Glutathione Peroxidase 4 in fertilization. *J. Cell. Physiol.*
- 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.
- Placek, B.J., Harrison, L.N., Villers, B.M., and Gloss, L.M. (2005). The H2A.Z/H2B dimer is unstable compared to the dimer containing the major H2A isoform. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *14*, 514–522.

- Plante, M., de Lamirande, E., and Gagnon, C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil. Steril.* *62*, 387–393.
- Poplinski, A., Tüttelmann, F., Kanber, D., Horsthemke, B., and Gromoll, J. (2010). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int. J. Androl.* *33*, 642–649.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 22–37.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S.J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* *463*, 1101–1105.
- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* *28*, 1057–1068.
- Prades, C., Laurent, A.M., Puechberty, J., Yurov, Y., and Roizés, G. (1996). SINE and LINE within human centromeres. *J. Mol. Evol.* *42*, 37–43.
- Pray L.A., 2008. Eukaryotic genome complexity. *Nature Education* *1*.
- Prendergast, G.C., and Ziff, E.B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* *251*, 186–189.
- Probst, A.V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., and Almouzni, G. (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev. Cell* *19*, 625–638.
- Puglisi, R., Maccari, I., Pipolo, S., Conrad, M., Mangia, F., and Boitani, C. (2012). The nuclear form of glutathione peroxidase 4 is associated with sperm nuclear matrix and is required for proper paternal chromatin decondensation at fertilization. *J. Cell. Physiol.* *227*, 1420–1427.
- Puglisi, R., Maccari, I., Pipolo, S., Mangia, F., and Boitani, C. (2014). The nuclear form of glutathione peroxidase 4 colocalizes and directly interacts with protamines in the nuclear matrix during mouse sperm chromatin assembly. *Spermatogenesis* *4*, e28460.
- Qin, Y., Xia, Y., Wu, W., Han, X., Lu, C., Ji, G., Chen, D., Wang, H., Song, L., Wang, S., et al. (2012). Genetic variants in microRNA biogenesis pathway genes are associated with semen quality in a Han-Chinese population. *Reprod. Biomed. Online* *24*, 454–461.
- Quénet, D., Mark, M., Govin, J., van Dorsselaar, A., Schreiber, V., Khochbin, S., and Dantzer, F. (2009). Parp2 is required for the differentiation of post-meiotic germ cells: Identification of a spermatid-specific complex containing Parp1, Parp2, TP2 and HSPA2. *Exp. Cell Res.* *315*, 2824–2834.
- Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P.V., Grimaldi, G., Riccio, A., et al. (2011). In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1

- recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol. Cell* 44, 361–372.
- Rang, F.J., and Boonstra, J. (2014). Causes and Consequences of Age-Related Changes in DNA Methylation: A Role for ROS? *Biology* 3, 403–425.
- Rao, B.J., and Rao, M.R. (1987). DNase I site mapping and micrococcal nuclease digestion of pachytene chromatin reveal novel structural features. *J. Biol. Chem.* 262, 4472–4476.
- Rappa, K.L., Rodriguez, H.F., Hakkarainen, G.C., Anchan, R.M., Mutter, G.L., and Asghar, W. (2016). Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnol. Adv.* 34, 578–587.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., Vincent, S., Gillot, I., and Cuzin, F. (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 441, 469–474.
- Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P., and Cuzin, F. (2007). Inheritance of an epigenetic change in the mouse: a new role for RNA. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 623–625.
- Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 155–168.
- Ray, A., Shah, A., Gudi, A., and Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reprod. Biomed. Online* 24, 591–602.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 162–169.
- Régnier, V., Vagnarelli, P., Fukagawa, T., Zerjal, T., Burns, E., Trouche, D., Earnshaw, W., and Brown, W. (2005). CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3967–3981.
- Reilly, J.N., McLaughlin, E.A., Stanger, S.J., Anderson, A.L., Hutcheon, K., Church, K., Mihalas, B.P., Tyagi, S., Holt, J.E., Eamens, A.L., et al. (2016). Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Sci. Rep.* 6, 31794.
- Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 96–103.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.-M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., and Drevet, J.R. (2006). Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 74, 1104–1113.
- Rex, A.S., Aagaard, J., and Fedder, J. (2017). DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 5, 622–630.

- Riel, J.M., Yamauchi, Y., Sugawara, A., Li, H.Y.J., Ruthig, V., Stoytcheva, Z., Ellis, P.J.I., Cocquet, J., and Ward, M.A. (2013). Deficiency of the multi-copy mouse Y gene Sly causes sperm DNA damage and abnormal chromatin packaging. *J. Cell Sci.* *126*, 803–813.
- Riggs, A.D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* *14*, 9–25.
- Rivera, C., Gurard-Levin, Z.A., Almouzni, G., and Loyola, A. (2014). Histone lysine methylation and chromatin replication. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 1433–1439.
- Rooney, A.P., Zhang, J., and Nei, M. (2000). An unusual form of purifying selection in a sperm protein. *Mol. Biol. Evol.* *17*, 278–283.
- Ross, C., Morriss, A., Khairy, M., Khalaf, Y., Braude, P., Coomarasamy, A., and El-Toukhy, T. (2010). A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod. Biomed. Online* *20*, 711–723.
- Roulland, Y., Ouararhni, K., Naidenov, M., Ramos, L., Shuaib, M., Syed, S.H., Lone, I.N., Boopathi, R., Fontaine, E., Papai, G., et al. (2016). The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity. *Mol. Cell* *63*, 674–685.
- Rowley, M.J., Teshima, F., and Heller, C.G. (1970). Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil. Steril.* *21*, 390–396.
- Royo, H., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2016). Alternative Computational Analysis Shows No Evidence for Nucleosome Enrichment at Repetitive Sequences in Mammalian Spermatozoa. *Dev. Cell* *37*, 98–104.
- Rozen, S., Skaletsky, H., Marszalek, J.D., Minx, P.J., Cordum, H.S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., and Page, D.C. (2003). Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature* *423*, 873–876.
- Rudenko, A., Dawlaty, M.M., Seo, J., Cheng, A.W., Meng, J., Le, T., Faull, K.F., Jaenisch, R., and Tsai, L.-H. (2013). Tet1 is critical for neuronal activity-regulated gene expression and memory extinction. *Neuron* *79*, 1109–1122.
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., and Talebi, A.R. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *Int. J. Reprod. Biomed.* *14*, 231.
- Sadava D. ; Heller H.C. ; Orians G.H. ; Purves W.K. & Hillis D., 2008. *Life: The Science of Biology*. Sinauer Associates.
- Saez, F., Ouvrier, A., and Drevet, J.R. (2011). Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian J. Androl.* *13*, 11–17.
- Safarinejad, M.R., and Safarinejad, S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *J. Urol.* *181*, 741–751.

- Sakkas, D., Manicardi, G.C., Tomlinson, M., Mandrioli, M., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., and Bianchi, U. (2000). The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *15*, 1112–1116.
- Samans, B., Yang, Y., Krebs, S., Sarode, G.V., Blum, H., Reichenbach, M., Wolf, E., Steger, K., Dansranjavin, T., and Schagdarsurengin, U. (2014). Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev. Cell* *30*, 23–35.
- Sánchez-Gutiérrez, M., García-Montalvo, E.A., Izquierdo-Vega, J.A., and Del Razo, L.M. (2008). Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biol. Toxicol.* *24*, 321–329.
- Santenard, A., Ziegler-Birling, C., Koch, M., Tora, L., Bannister, A.J., and Torres-Padilla, M.-E. (2010). Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat. Cell Biol.* *12*, 853–862.
- Santos, F., Peters, A.H., Otte, A.P., Reik, W., and Dean, W. (2005). Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Dev. Biol.* *280*, 225–236.
- Sarmento, O.F., Digilio, L.C., Wang, Y., Perlin, J., Herr, J.C., Allis, C.D., and Coonrod, S.A. (2004). Dynamic alterations of specific histone modifications during early murine development. *J. Cell Sci.* *117*, 4449–4459.
- Sasai, N., and Defossez, P.-A. (2009). Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int. J. Dev. Biol.* *53*, 323–334.
- Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S., and Postberg, J. (2011). H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma* *120*, 275–285.
- Schuermann, D., Weber, A.R., and Schär, P. (2016). Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair* *44*, 92–102.
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., and Reik, W. (2012). The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol. Cell* *48*, 849–862.
- Seligman, J., Kosower, N.S., Weissenberg, R., and Shalgi, R. (1994). Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J. Reprod. Fertil.* *101*, 435–443.
- Selvaratnam, J., and Robaire, B. (2016). Overexpression of catalase in mice reduces age-related oxidative stress and maintains sperm production. *Exp. Gerontol.* *84*, 12–20.
- Shalgi, R., Seligman, J., and Kosower, N.S. (1989). Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol. Reprod.* *40*, 1037–1045.

- Shalini, S., and Bansal, M.P. (2008). Dietary selenium deficiency as well as excess supplementation induces multiple defects in mouse epididymal spermatozoa: understanding the role of selenium in male fertility. *Int. J. Androl.* *31*, 438–449.
- Shaman, J.A., Yamauchi, Y., and Ward, W.S. (2007a). Function of the sperm nuclear matrix. *Arch. Androl.* *53*, 135–140.
- Shaman, J.A., Yamauchi, Y., and Ward, W.S. (2007b). The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J. Cell. Biochem.* *102*, 680–688.
- Shang, E., Salazar, G., Crowley, T.E., Wang, X., Lopez, R.A., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. (2004). Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes *Brd2*, *Brd3*, *Brd4*, and *Brdt* in the mouse testis. *Gene Expr. Patterns GEP* *4*, 513–519.
- Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. (2007). The first bromodomain of *Brdt*, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 3507–3515.
- Sharma, U., Stefanova, D., and Holmes, S.G. (2013). Histone variant H2A.Z functions in sister chromatid cohesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 3473–3481.
- Sharma, U., Conine, C.C., Shea, J.M., Boskovic, A., Derr, A.G., Bing, X.Y., Belleanne, C., Kucukural, A., Serra, R.W., Sun, F., et al. (2016). Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science* *351*, 391–396.
- Shekarriz, M., DeWire, D.M., Thomas, A.J., and Agarwal, A. (1995). A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur. Urol.* *28*, 31–35.
- Shen, H.-M., Chia, S.-E., and Ong, C.-N. (1999). Evaluation of Oxidative DNA Damage in Human Sperm and Its Association with Male Infertility. *J. Androl.* *20*, 718–723.
- Shi, Q., and Martin, R.H. (2000). Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and lifestyle factors. *Cytogenet. Cell Genet.* *90*, 219–226.
- Shi, J., Huang, C., Huang, S., and Yao, C. (2017). snoRNAs associate with mRNA 3' processing complex: New wine in old bottles. *RNA Biol.* 1–4.
- Shinagawa, T., Huynh, L.M., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Kwak, H.-G., Dohmae, N., Noguchi, J., and Ishii, S. (2015). Disruption of *Th2a* and *Th2b* genes causes defects in spermatogenesis. *Development* *142*, 1287–1292.
- Shires, A., Carpenter, M.P., and Chalkley, R. (1975). New histones found in mature mammalian testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 2714–2718.

- Shirley, C.R., Hayashi, S., Mounsey, S., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004). Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol. Reprod.* *71*, 1220–1229.
- Shu, L., Sun, W., Li, L., Xu, Z., Lin, L., Xie, P., Shen, H., Huang, L., Xu, Q., Jin, P., et al. (2016). Genome-wide alteration of 5-hydroxymethylcytosine in a mouse model of Alzheimer's disease. *BMC Genomics* *17*, 381.
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., and Lewis, S.E.M. (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. Online* *23*, 724–734.
- Singh, J., and Rao, M.R. (1987). Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J. Biol. Chem.* *262*, 734–740.
- Singh, J., and Rao, M.R. (1988). Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochem. Int.* *17*, 701–710.
- Smith, T.B., Dun, M.D., Smith, N.D., Curry, B.J., Connaughton, H.S., and Aitken, R.J. (2013a). The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J. Cell Sci.* *126*, 1488–1497.
- Smith, T.B., Dun, M.D., Smith, N.D., Curry, B.J., Connaughton, H.S., and Aitken, R.J. (2013b). The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. *J. Cell Sci.* *126*, 1488–1497.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., and Meissner, A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* *484*, 339–344.
- Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2012). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 25–30.
- Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., and Koji, T. (2011). Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. *Acta Histochem. Cytochem.* *44*, 183–190.
- Song, S., Ghosh, J., Mainigi, M., Turan, N., Weinerman, R., Truongcao, M., Coutifaris, C., and Sapienza, C. (2015). DNA methylation differences between in vitro- and in vivo-conceived children are associated with ART procedures rather than infertility. *Clin. Epigenetics* *7*, 41.
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* *34*, 384–390.
- Sotolongo, B., Lino, E., and Ward, W.S. (2003). Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biol. Reprod.* *69*, 2029–2035.

- Sotolongo, B., Huang, T.T.F., Isenberger, E., and Ward, W.S. (2005). An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J. Androl.* *26*, 272–280.
- Soubry, A., Schildkraut, J.M., Murtha, A., Wang, F., Huang, Z., Bernal, A., Kurtzberg, J., Jirtle, R.L., Murphy, S.K., and Hoyo, C. (2013). Paternal obesity is associated with IGF2 hypomethylation in newborns: results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) cohort. *BMC Med.* *11*, 29.
- Soubry, A., Murphy, S.K., Wang, F., Huang, Z., Vidal, A.C., Fuemmeler, B.F., Kurtzberg, J., Murtha, A., Jirtle, R.L., Schildkraut, J.M., et al. (2015). Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int. J. Obes.* *2005* *39*, 650–657.
- Spanò, M., Bonde, J.P., Hjøllund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., and Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.* *73*, 43–50.
- Speyer, B.E., Pizzey, A.R., Ranieri, M., Joshi, R., Delhanty, J.D.A., and Serhal, P. (2010). Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *25*, 1609–1618.
- Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S., and Jacobsen, S.E. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol.* *12*, R54.
- Subramanyam, D., and Billewicz, R. (2011). From microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 498–503.
- Sullivan, R., and Saez, F. (2013). Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reprod. Camb. Engl.* *146*, R21-35.
- Sun, H.B., Shen, J., and Yokota, H. (2000). Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophys. J.* *79*, 184–190.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 1121–1124.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* *21*, 421–434.
- Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.-X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A.K., Gearing, M., Levey, A.I., et al. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat. Neurosci.* *14*, 1607–1616.
- Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S.-Y., et al. (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* *476*, 232–235.

- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930–935.
- Takeda, N., Yoshinaga, K., Furushima, K., Takamune, K., Li, Z., Abe, S.-I., Aizawa, S.-I., and Yamamura, K.-I. (2016). Viable offspring obtained from Prml-deficient sperm in mice. *Sci. Rep.* 6, 27409.
- Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2017). Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 115–126.
- Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., and Gualtieri, R. (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 11, 81.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., et al. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7107–7119.
- Tefferi, A., Levine, R.L., Lim, K.-H., Abdel-Wahab, O., Lasho, T.L., Patel, J., Finke, C.M., Mullally, A., Li, C.-Y., Pardanani, A., et al. (2009). Frequent TET2 mutations in systemic mastocytosis: clinical, KITD816V and FIP1L1-PDGFR correlating. *Leukemia* 23, 900–904.
- Tempest, H.G., and Griffin, D.K. (2004). The relationship between male infertility and increased levels of sperm disomy. *Cytogenet. Genome Res.* 107, 83–94.
- Templado, C., Uroz, L., and Estop, A. (2013). New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 19, 634–643.
- Terquem, A., and Dadoune, J.P. (1983). Aniline Blue Staining of Human Spermatozoon Chromatin. Evaluation of Nuclear Maturation. In *The Sperm Cell*, J. André, ed. (Springer Netherlands), pp. 249–252.
- Tessarz, P., and Kouzarides, T. (2014). Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 703–708.
- Thakar, A., Gupta, P., Ishibashi, T., Finn, R., Silva-Moreno, B., Uchiyama, S., Fukui, K., Tomschik, M., Ausio, J., and Zlatanova, J. (2009). H2A.Z and H3.3 histone variants affect
- Références Bibliographiques* nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 10852–10857.
- Thilagavathi, J., Venkatesh, S., and Dada, R. (2013). Telomere length in reproduction.

Andrologia 45, 289–304.

Tikhonov, A.P., Lavie, L., Tatout, C., Bennetzen, J.L., Avramova, Z., and Deragon, J.M. (2001). Target sites for SINE integration in Brassica genomes display nuclear matrix binding activity. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 9, 325–337.

Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., Vanin, S., and Maiorino, M. (2009). Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1486–1500.

Tovich, P.R., and Oko, R.J. (2003). Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 278, 32431–32438.

Trojer, P., and Reinberg, D. (2007). Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell* 28, 1–13.

Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., Nishioka, K., and Bremer, J.W. (1982). Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis. *J. Biol. Chem.* 257, 5560–5567.

Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., and Nishioka, K. (1984). Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific variant of histone 3 in rat testis. *J. Biol. Chem.* 259, 8769–8776.

Troude, P., Santin, G., Guibert, J., Bouyer, J., de La Rochebrochard, E., and DAIFI Group (2016). Seven out of 10 couples treated by IVF achieve parenthood following either treatment, natural conception or adoption. *Reprod. Biomed. Online* 33, 560–567.

Tseng, P.-T., Lee, Y., and Lin, P.-Y. (2013). Age-associated decrease in serum glial cell line-derived neurotrophic factor levels in patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 40, 334–339.

Tsunoda, S., Kawano, N., Miyado, K., Kimura, N., and Fujii, J. (2012). Impaired fertilizing ability of superoxide dismutase 1-deficient mouse sperm during in vitro fertilization. *Biol. Reprod.* 87, 121.

Tucker, J.D., Lee, D.A., and Moore, D.H. (1995). Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation in vitro. *Int. J. Radiat. Biol.* 67, 19–28.

Tunc, O., and Tremellen, K. (2009). Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26, 537–544.

Turinetto, V., and Giachino, C. (2015). Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res.* 43, 2489–2498.

Turk, P.W., and Weitzman, S.A. (1995). Free radical DNA adduct 8-OH-deoxyguanosine affects activity of Hpa II and Msp I restriction endonucleases. *Free Radic. Res.* 23, 255–258.

- Turner, T.T. (2008). De Graaf's thread: the human epididymis. *J. Androl.* *29*, 237–250.
- Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., Makino, Y., Nogami, J., Horikoshi, N., Osakabe, A., et al. (2017). Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep.* *18*, 593–600.
- Unhavaithaya, Y., Hao, Y., Beyret, E., Yin, H., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., and Lin, H. (2009). MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation. *J. Biol. Chem.* *284*, 6507–6519.
- Unni, E., Zhang, Y., Meistrich, M.L., and Balhorn, R. (1994). Rat spermatid basic nuclear protein TP3 is the precursor of protamine 2. *Exp. Cell Res.* *210*, 39–45.
- Urahama, T., Harada, A., Maehara, K., Horikoshi, N., Sato, K., Sato, Y., Shiraishi, K., Sugino, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., et al. (2016). Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin* *9*, 2.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., and Flohé, L. (1999). Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science* *285*, 1393–1396.
- Usselman, M.C., Cone, R.A., and Rossignol, D.P. (1985). Rat cauda epididymal fluid is a mucus. *J. Androl.* *6*, 315–320.
- Valinluck, V., Tsai, H.-H., Rogstad, D.K., Burdzy, A., Bird, A., and Sowers, L.C. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* *32*, 4100–4108.
- Vassoler, F.M., White, S.L., Schmidt, H.D., Sadri-Vakili, G., and Pierce, R.C. (2013). Epigenetic inheritance of a cocaine-resistance phenotype. *Nat. Neurosci.* *16*, 42–47.
- Vernet, P., Rigaudière, N., Ghyselinck, N., Dufaure, J.P., and Drevet, J.R. (1996). In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *74*, 125–131.
- Vézina, D., Mauffette, F., Roberts, K.D., and Bleau, G. (1996). Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol. Trace Elem. Res.* *53*, 65–83.
- Villar-Menéndez, I., Blanch, M., Tyebji, S., Pereira-Veiga, T., Albasanz, J.L., Martín, M., Ferrer, I., Pérez-Navarro, E., and Barrachina, M. (2013). Increased 5-methylcytosine and decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with reduced striatal A2AR levels in Huntington's disease. *Neuromolecular Med.* *15*, 295–309.
- Virro, M.R., Larson-Cook, K.L., and Evenson, D.P. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril.* *81*, 1289–1295.

- 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., Fornés, 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., Stewart-Savage, J., Blasco, A., Battaglia, L., Miranda, P., Kopf, G.S., and Tezón, J.G. (1999c). Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol. Reprod.* *61*, 76–84.
- Vorilhon, S., Brugnon, F., Kocer, A., Dollet, S., Bourgne, C., Berger, M., Janny, L., Pereira, B., Aitken, R.J., Moazamian, A., Gharagozooloo, P., Drevet, J.R., and Pons-Rejraji, H. (2018). Accuracy of human sperm DNA oxidation quantification and threshold determination using an immuno-detection assay of 8-OHdG.
- Walsh, C.P., Chaillet, J.R., and Bestor, T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* *20*, 116–117.
- Wang, J.C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 430–440.
- Wang, B., Li, Z., Wang, C., Chen, M., Xiao, J., Wu, X., Xiao, W., Song, Y., and Wang, X. (2013a). Zygotic G2/M cell cycle arrest induced by ATM/Chk1 activation and DNA repair in mouse embryos fertilized with hydrogen peroxide-treated epididymal mouse sperm. *PLoS One* *8*, e73987.
- Wang, F., Yang, Y., Lin, X., Wang, J.-Q., Wu, Y.-S., Xie, W., Wang, D., Zhu, S., Liao, Y.-Q., Sun, Q., et al. (2013b). Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 3641–3653.
- Wang, X.-X., Sun, B.-F., Jiao, J., Chong, Z.-C., Chen, Y.-S., Wang, X.-L., Zhao, Y., Zhou, Y.-M., and Li, D. (2015). Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine modification pattern is a novel epigenetic feature of globozoospermia. *Oncotarget* *6*, 6535–6543.
- Ward, W.S. (2010). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* *16*, 30–36.
- Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1989). Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. *Biol. Reprod.* *41*, 361–370.
- Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* *44*, 569–574.
- Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P.J., Toyoda, A., et al. (2011). Role for piRNAs and noncoding

RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science* 332, 848–852.

Waterland, R.A., Lin, J.-R., Smith, C.A., and Jirtle, R.L. (2006). Post-weaning diet affects genomic imprinting at the insulin-like growth factor 2 (*Igf2*) locus. *Hum. Mol. Genet.* 15, 705–716.

Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737–738.

Weake, V.M., and Workman, J.L. (2008). Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol. Cell* 29, 653–663.

Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 7, 847–854.

Weber, M., and Schübeler, D. (2007). Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 273–280.

Weber, A.R., Krawczyk, C., Robertson, A.B., Kuśnierczyk, A., Vågbo, C.B., Schuermann, D., Klungland, A., and Schär, P. (2016). Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat. Commun.* 7, 10806.

Wei, J., Sun, X., Chen, Y., Li, Y., Song, L., Zhou, Z., Xu, B., Lin, Y., and Xu, S. (2014). Perinatal exposure to bisphenol A exacerbates nonalcoholic steatohepatitis-like phenotype in male rat offspring fed on a high-fat diet. *J. Endocrinol.* 222, 313–325.

Wei, M., Wei, H., Wu, M., Song, M., Zhang, J., Yu, J., Fan, S., and Yu, S. (2013). Comparative expression profiling of miRNA during anther development in genetic male sterile and wild type cotton. *BMC Plant Biol.* 13, 66.

Weissenberg, R., Bella, R., Yossefi, S., and Lewin, L.M. (1995). Changes during puberty in chromatin condensation, morphology and fertilizing ability of epididymal spermatozoa of the golden hamster. *Andrologia* 27, 341–344.

Welchman, R.L., Gordon, C., and Mayer, R.J. (2005). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 599–609.

Wendt, K.D., and Shilatifard, A. (2006). Packing for the germy: the role of histone H4 Ser1 phosphorylation in chromatin compaction and germ cell development. *Genes Dev.* 20, 2487–2491.

van de Werken, C., van der Heijden, G.W., Eleveld, C., Teeuwssen, M., Albert, M., Baarends, W.M., Laven, J.S.E., Peters, A.H.F.M., and Baart, E.B. (2014). Paternal heterochromatin formation in human embryos is H3K9/HP1 directed and primed by sperm-derived histone modifications. *Nat. Commun.* 5, 5868.

- Wiland, E., Fraczek, M., Olszewska, M., and Kurpisz, M. (2016). Topology of chromosome centromeres in human sperm nuclei with high levels of DNA damage. *Sci. Rep.* 6.
- Woodcock, C.L., Skoultchi, A.I., and Fan, Y. (2006). Role of linker histone in chromatin structure and function: H1 stoichiometry and nucleosome repeat length. *Chromosome Res.* 14, 17–25.
- Wossidlo, M., Arand, J., Sebastiano, V., Lepikhov, K., Boiani, M., Reinhardt, R., Schöler, H., and Walter, J. (2010). Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. *EMBO J.* 29, 1877–1888.
- Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.*
- Wu, F., Caron, C., De Robertis, C., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2008). Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *J. Reprod. Dev.* 54, 413–417.
- Wu, H., D'Alessio, A.C., Ito, S., Wang, Z., Cui, K., Zhao, K., Sun, Y.E., and Zhang, Y. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev.* 25, 679–684.
- Wu, J.Y., Ribar, T.J., Cummings, D.E., Burton, K.A., McKnight, G.S., and Means, A.R. (2000). Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.* 25, 448–452.
- Wu, Q., Song, R., Ortogero, N., Zheng, H., Evanoff, R., Small, C.L., Griswold, M.D., Namekawa, S.H., Royo, H., Turner, J.M., et al. (2012). The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 25173–25190.
- Wykes, S.M., Visscher, D.W., and Krawetz, S.A. (1997). Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 15–19.
- Wykes, S.M., Miller, D., and Krawetz, S.A. (2000). Mammalian spermatozoal mRNAs: tools for the functional analysis of male gametes. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 32, 77–81.
- Xu, Y., Ayrapetov, M.K., Xu, C., Gursoy-Yuzugullu, O., Hu, Y., and Price, B.D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell* 48, 723–733.
- Xue, J.-H., Xu, G.-F., Gu, T.-P., Chen, G.-D., Han, B.-B., Xu, Z.-M., Bjørås, M., Krokan, H.E., Xu, G.-L., and Du, Y.-R. (2016). Uracil-DNA Glycosylase UNG Promotes Tet-mediated DNA Demethylation. *J. Biol. Chem.* 291, 731–738.
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Shen, L., Inoue, A., Diep, D., Zhang, K., and Zhang, Y. (2012). Tet1 controls meiosis by regulating meiotic gene expression. *Nature* 492, 443–447.
- Yamauchi, Y., Riel, J.M., Stoytcheva, Z., Burgoyne, P.S., and Ward, M.A. (2010). Deficiency in mouse Y chromosome long arm gene complement is associated with sperm DNA damage. *Genome Biol.* 11, R66.

- Yamauchi, Y., Shaman, J.A., and Ward, W.S. (2011). Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J. Androl.* *13*, 31–35.
- Yamazawa, K., Ogata, T., and Ferguson-Smith, A.C. (2010). Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* *154C*, 329–334.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., and Matzuk, M.M. (2003). HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10546–10551.
- Yang, J.-S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* *43*, 892–903.
- Yang, Q., Wu, K., Ji, M., Jin, W., He, N., Shi, B., and Hou, P. (2013a). Decreased 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) is an independent poor prognostic factor in gastric cancer patients. *J. Biomed. Nanotechnol.* *9*, 1607–1616.
- Yang, S.-M., Kim, B.J., Norwood Toro, L., and Skoultschi, A.I. (2013b). H1 linker histone promotes epigenetic silencing by regulating both DNA methylation and histone H3 methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 1708–1713.
- Yao, B., Lin, L., Street, R.C., Zalewski, Z.A., Galloway, J.N., Wu, H., Nelson, D.L., and Jin, P. (2014). Genome-wide alteration of 5-hydroxymethylcytosine in a mouse model of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 1095–1107.
- de Yebra, L., Ballescà, J.L., Vanrell, J.A., Bassas, L., and Oliva, R. (1993). Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J. Biol. Chem.* *268*, 10553–10557.
- Yelick, P.C., Balhorn, R., Johnson, P.A., Corzett, M., Mazrimas, J.A., Kleene, K.C., and Hecht, N.B. (1987). Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol. Cell. Biol.* *7*, 2173–2179.
- Yesilbursa, D., Serdar, Z., Serdar, A., Sarac, M., Coskun, S., and Jale, C. (2004). Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with orlistat on lipid peroxides levels. *Int. J. Obes.* *29*, 142–145.
- Yoder, J.A., Soman, N.S., Verdine, G.L., and Bestor, T.H. (1997). DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* *270*, 385–395.
- Yoshii, T., Kuji, N., Komatsu, S., Iwahashi, K., Tanaka, Y., Yoshida, H., Wada, A., and Yoshimura, Y. (2005). Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 677–681.
- Yu, T., Tang, C., Zhang, Y., Zhang, R., and Yan, W. (2017). Microfluidics-based digital quantitative PCR for single-cell small RNA quantification. *Biol. Reprod.* *97*, 490–496.
- Yu, Y.E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C.R., Deng, J.M., Russell, L.D., Weil, M.M., Behringer, R.R., and Meistrich, M.L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4683–4688.

- Yuan, S., Schuster, A., Tang, C., Yu, T., Ortogero, N., Bao, J., Zheng, H., and Yan, W. (2016). Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 635.
- Yuen, B.T.K., Bush, K.M., Barrilleaux, B.L., Cotterman, R., and Knoepfler, P.S. (2014). Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development* *141*, 3483–3494.
- Zalenskaya, I.A., and Zalensky, A.O. (2004). Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *12*, 163–173.
- Zalenskaya, I.A., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 213–218.
- Zalensky, A., and Zalenskaya, I. (2007). Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information? *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 609–611.
- Zalensky, A.O., Allen, M.J., Kobayashi, A., Zalenskaya, I.A., Balhór, R., and Bradbury, E.M. (1995). Well-defined genome architecture in the human sperm nucleus. *Chromosoma* *103*, 577–590.
- Zama, A.M., and Uzumcu, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: an ovarian perspective. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 420–439.
- Zarnescu, O. (2007). Immunohistochemical distribution of hyperacetylated histone H4 in testis of paddlefish *Polyodon spathula*: ultrastructural correlation with chromatin condensation. *Cell Tissue Res.* *328*, 401–410.
- Zeitlin, S.G., Baker, N.M., Chapados, B.R., Soutoglou, E., Wang, J.Y.J., Berns, M.W., and Cleveland, D.W. (2009). Double-strand DNA breaks recruit the centromeric histone CENP-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15762–15767.
- Zhang, C., Jenkins, H., Goldberg, M.W., Allen, T.D., and Hutchison, C.J. (1996). Nuclear lamina and nuclear matrix organization in sperm pronuclei assembled in *Xenopus* egg extract. *J. Cell Sci.* *109 (Pt 9)*, 2275–2286.
- Zhang, J., Wang, Y., Liu, X., Jiang, S., Zhao, C., Shen, R., Guo, X., Ling, X., and Liu, C. (2015). Expression and Potential Role of microRNA-29b in Mouse Early Embryo Development. *Cell. Physiol. Biochem.* *35*, 1178–1187.
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., and Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling.
- Zhang, L., Lu, X., Lu, J., Liang, H., Dai, Q., Xu, G.-L., Luo, C., Jiang, H., and He, C. (2012). Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 328–330.

- Zhang, R.-R., Cui, Q.-Y., Murai, K., Lim, Y.C., Smith, Z.D., Jin, S., Ye, P., Rosa, L., Lee, Y.K., Wu, H.-P., et al. (2013). Tet1 regulates adult hippocampal neurogenesis and cognition. *Cell Stem Cell* *13*, 237–245.
- Zhang, X., San Gabriel, M., and Zini, A. (2006). Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous subpopulations of spermatozoa in the ejaculate. *J. Androl.* *27*, 414–420.
- Zhang, Y., Wang, H., Wang, L., Zhou, Z., Sha, J., Mao, Y., Cai, L., Feng, T., Yan, Z., Ma, L., et al. (2008). The clinical significance of sperm DNA damage detection combined with routine semen testing in assisted reproduction. *Mol. Med. Rep.* *1*, 617–624.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H., Weil, M.M., et al. (2001). Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7243–7255.
- Zhou, X., Zhuang, Z., Wang, W., He, L., Wu, H., Cao, Y., Pan, F., Zhao, J., Hu, Z., Kathera, C., et al. (2016). OGG1 is essential in oxidative stress induced DNA demethylation. *Cell. Signal.* *28*, 1163–1171.
- Zhuang, T., Hess, R.A., Kolla, V., Higashi, M., Raabe, T.D., and Brodeur, G.M. (2014). CHD5 is required for spermiogenesis and chromatin condensation. *Mech. Dev.* *131*, 35–46.
- Zini, A., and Al-Hathal, N. (2011). Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? *Asian J. Androl.* *13*, 374–381.
- Zini, A., Boman, J.M., Belzile, E., and Ciampi, A. (2008). Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *23*, 2663–2668.
- Zorgniotti, A.W., and Sealfon, A.I. (1988). Measurement of intrascrotal temperature in normal and subfertile men. *J. Reprod. Fertil.* *82*, 563–566.
- Zuo, X., Sheng, J., Lau, H.-T., McDonald, C.M., Andrade, M., Cullen, D.E., Bell, F.T., Iacovino, M., Kyba, M., Xu, G., et al. (2012). Zinc Finger Protein ZFP57 Requires Its Co-factor to Recruit DNA Methyltransferases and Maintains DNA Methylation Imprint in Embryonic Stem Cells via Its Transcriptional Repression Domain. *J. Biol. Chem.* *287*, 2107.

Chez les Mammifères, le succès de la fécondation et d'un développement embryonnaire viable résident principalement dans la qualité des cellules reproductrices : les gamètes mâles (spermatozoïdes) et femelles (ovocytes) apportant chacun la moitié du patrimoine génétique du futur individu. Dès lors que ce patrimoine génétique est endommagé par différents processus tels que les attaques radicalaires communément appelées stress oxydant, cela peut compromettre la qualité des gamètes et par conséquent le succès de la reproduction. En effet, les dommages oxydants à l'ADN spermatique sont une des causes d'infertilité masculine fréquemment associés aux échecs reproductifs dans le cadre de conception naturelle ou artificielle chez l'homme. Afin de mieux appréhender l'impact des dommages oxydants sur la qualité des spermatozoïdes, notre équipe a généré des modèles murins présentant des atteintes oxydantes de l'ADN associées à des échecs reproductifs. Dans un de ces modèles nous avons pu montrer que tout le noyau spermatique n'était pas concerné de la même façon par les altérations oxydantes. De même, à l'échelle des chromosomes murins les investigations de l'équipe suggéraient que tous n'étaient concernés de la même façon. Dans ce travail de thèse, j'ai développé et mis en œuvre des protocoles d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) permettant de montrer que la susceptibilité des chromosomes à l'oxydation est déterminée par la position des chromosomes dans le noyau spermatique murin. En parallèle de cette étude, je me suis intéressé à l'épigénome spermatique et plus particulièrement à la méthylation de l'ADN en conditions de stress oxydant. Les résultats préliminaires montrent qu'un environnement post-testiculaire pro-oxydant peut altérer le profil épigénétique spermatique. Dans un développement pré-clinique du sujet, j'ai contribué à montrer qu'une supplémentation orale antioxydante permettait de corriger les dommages oxydants à l'ADN, en modifiant la réponse antioxydante globale du tissu épидидymaire des animaux.

Mots-clés : Noyau spermatique, stress oxydant, épigénome spermatique, positionnement des chromosomes, supplémentation orale antioxydante

In Mammals, the success of fertilization and embryonic development, are associated to the quality of the reproductive cells: male gametes (spermatozoa) and female gametes (oocytes); each bringing half of the genetic heritage of the future individual. This genetic heritage may be compromised by various processes a very common one being radical attacks in cases of oxidative stress, it could diminish the quality of gametes and therefore the success of reproduction. It is well described that sperm DNA oxidative damage (SDOD) is one of the causes of male infertility frequently associated with reproductive failures in the context of natural or artificial conception in humans. To better understand the impact of oxidative damage on the quality of sperm, our team generated mouse models with SDOD. Characterization of these transgenic mice has shown that SDOD alone was associated with increased embryo defects, miscarriages and perinatal mortality. The team also brought forward that SDOD concerns preferentially specific regions of the sperm nucleus. In addition, the team suggested that sperm chromosomes were not identically susceptible to oxidative damage.

In this thesis work, I developed and implemented fluorescence in situ hybridization (FISH) protocols to study chromosome positioning in the mouse sperm. I confirmed that susceptibility of chromosomes to oxidation is determined by their position in the murine sperm nucleus. In parallel, I addressed the question whether the sperm epigenome (particularly DNA methylation) was modified in a situation of post-testicular oxidative stress. Preliminary results seem to show that SDOD disturbs the sperm epigenetic profile. In parallel, in a pre-clinical approach, I contributed to show that an oral antioxidant supplementation can correct SDOD by modifying the antioxidant response of the epididymal tissue of the treated animals.

Keywords: sperm nucleus, oxidative stress, sperm epigenome, chromosome positioning, antioxidant oral supplementation.