



HAL
open science

L'organisation post-méiotique de l'épigénome mâle

Sophie Barral

► **To cite this version:**

Sophie Barral. L'organisation post-méiotique de l'épigénome mâle. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV058 . tel-02103249

HAL Id: tel-02103249

<https://theses.hal.science/tel-02103249>

Submitted on 18 Apr 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Sophie BARRAL

Thèse dirigée par **Dr. Saadi KHOCHBIN, DRCE, CNRS**

préparée au sein du **laboratoire CRI UGA - INSERM U1209 -
CNRS UMR 5309 à l'Institut pour l'Avancée des Biosciences**
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

L'organisation post-méiotique de l'épigénome mâle

Post-meiotic male epigenome organization

Thèse soutenue publiquement le **14 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Pr Stefan NONCHEV

Professeur, Université Grenoble Alpes, Grenoble Président

Dr Nathalie BEAUJEAN

Directeur de recherche, INRA, Bron Rapporteur

Dr Patrick LOMONTE

Directeur de recherche, INSERM, Lyon Rapporteur

Dr Marta RADMAN-LIVAJA

Chargé de recherche, CNRS, Montpellier Examineur

Dr Saadi KHOCHBIN

Directeur de recherche, CNRS, Grenoble Directeur de thèse



A mon Lucas,

A ma grand-mère,

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord l'ensemble des membres de mon jury. Merci aux Docteurs Nathalie Beaujean, Patrick Lomonte et Marta Radman-Livaja d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et un grand merci au président de mon jury Stefan Nonchev qui me suit depuis mes premiers pas à l'université.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Jérôme Govin et Christophe Arnoult pour leurs conseils sur l'avancée de ce projet.

Saadi, vraiment un immense merci pour tout. Je me rappelle encore le jour où vous m'avez fait cette proposition folle de m'inscrire en thèse et je vous remercie de m'avoir fait confiance. Je vous remercie aussi d'avoir dirigé cette thèse en vous rendant toujours disponible, compréhensif et surtout avec ce grand optimisme qui vous caractérise. Un grand merci pour votre soutien et vos conseils depuis mon arrivée dans l'équipe.

Je tiens à remercier particulièrement Thierry. Merci pour ton investissement dans cette thèse, tu as été un excellent coach pour étoffer ma bibliographie, sans parler bien sûr de notre duo de choc pour les sédimentations et de nos grandes discussions sur bon nombre de sujets. Tu m'as sincèrement été d'une très grande aide que ce soit au niveau des expériences en laboratoire et principalement ces dernières semaines pour ton implication dans la relecture de mon manuscrit.

Je remercie mes collègues de bureau, Sandrine, Anne-Laure et Fayçal qui eux aussi doivent être soulagés que cette thèse soit finie. Vous avez été très compréhensifs et patients, vous qui deviez supporter mes humeurs. Fayçal, merci pour le temps que tu as pris pour la relecture de mon manuscrit.

Bien sûr, je remercie l'ensemble des membres de l'équipe SK qui ont été, de près ou de loin, tous impliqués dans cette thèse : Sophie, Michel, Florent, Ekaterina, Alexandra, Naghmeh, Domenico, Azadeh, Tao et Mengqing.

Ces travaux n'auraient pas pu être réalisés sans nos nombreuses collaborations donc merci à toutes les personnes qui se sont investies dans l'ensemble de mes projets. J'en profite pour remercier également les personnes impliquées dans les plateformes, Alexeï, Mylène et Jacques pour leur aide en microscopie, Anthony et Patrick pour la gestion de l'animalerie de l'IAB ainsi que tout le personnel de la PHTA à Jean Roger. Merci également à nos gestionnaires,

aux personnels administratifs et autres personnes de l'institut qui m'ont tout simplement aidés, soutenus ou rendus service à un moment donné.

En travaillant dans cet institut, j'ai fait de belles rencontres, donc merci à Angéline, Sevgi, Afsaneh et Aysegul qui malgré la distance restent toujours présentes.

Et comment aurais-je pu y arriver sans vous : Jessica, Sandrine, Emilie, Alexandra et Anne-Laure. Vous m'avez été d'un si grand soutien et bien plus que vous ne l'imaginez. Vous êtes toujours là dans les bons comme les mauvais moments. Nos discussions (pas très scientifiques), nos fou-rires, nos soirées filles sont tellement indispensables pour moi mais aussi et surtout vos encouragements, vos conseils m'ont énormément aidée. Quoi de plus beau que des collègues de travail qui deviennent des Amies. Vraiment merci pour tout, les filles.

Je remercie bien-sûr tous ceux qui me sont chers, ma famille, mes amis et Sébastien qui a été d'une grande patience ces dernières semaines. Même en étant loin de ce monde particulier qui est la recherche, vous n'avez pas hésité à me soutenir, à m'encourager et surtout vous avez toujours cru en moi et c'est ce qui me permet chaque jour de me dépasser.

Et je remercie tous ceux qui sont en train de se dire : « Quoi ??? Je ne suis pas remercié !!! », donc désolé à ceux que j'ai oublié et qui ont contribué à ce projet, et surtout merci.

Je garde bien sûr le meilleur pour la fin, mille mercis à toi mon Lucas, mon rayon de soleil qui est ma principale source de motivation. Je voulais te montrer aujourd'hui que quand on veut quelque chose et même si cela nous demande beaucoup d'énergie et de travail, on finit toujours par y arriver, il faut croire en soi, même dans les moments difficiles. Tout simplement merci d'être là...

Pour clore ces remerciements, je dirai que cette thèse qui était au départ un challenge personnel s'est transformée en une belle aventure collective car c'est grâce à vous tous si j'y suis arrivée et je partage volontiers la réussite de cette thèse avec vous.

Résumé

La spermatogénèse, processus de production des gamètes mâles, représente un modèle physiologique pertinent pour l'étude de la dynamique de la chromatine. En effet, une réorganisation drastique du génome est observée en fin de spermatogénèse, lors des étapes post-méiotiques du développement de la lignée germinale mâle. Ces réorganisations visent d'une part à compacter le génome afin de le protéger avant et lors de la fécondation et d'autre part à établir un épigénome mâle spécifique nécessaire pour le développement embryonnaire précoce. La chromatine organisée en nucléosomes est alors totalement remaniée de manière à ce que les protamines remplacent les histones dans les spermatozoïdes. Cette réorganisation est initiée par une vague d'acétylation des histones à l'échelle du génome, suivie par un remplacement massif des histones par de petites protéines basiques, les protéines de transition et les protamines. Les mécanismes moléculaires responsables de cette réorganisation de la chromatine sont très mal connus. Mon travail de thèse vise à explorer ces mécanismes en utilisant une approche d'inactivation de gènes chez la souris correspondant à des acteurs épigénétiques exprimés spécifiquement en post-méiose : le facteur nucléaire Nut (Nuclear protein in Testis) et le variant de l'histone H2A, H2A.L.2. Nous avons démontré que la protéine Nut recrute l'acétyltransférase p300 et induit l'hyperacétylation de l'histone H4 précisément au niveau des résidus lysine en position 5 et 8. Cette acétylation est nécessaire à l'interaction avec le premier bromodomaine de Brdt initiant le processus de remplacement des histones par les protamines. Ainsi, le facteur Nut est l'élément majeur de la vague d'acétylation des histones. Nous avons également mis en évidence le rôle crucial de H2A.L.2 dans " l'ouverture " de la structure du nucléosome permettant ainsi son invasion par les protéines de transition. Ces protéines vont à leur tour générer une plateforme pour le recrutement et la maturation des protamines et induire la formation de structures transitoires avant l'étape de compaction finale du génome des spermatozoïdes matures. Ces études nous ont ainsi permis d'établir pour la première fois un modèle moléculaire cohérent permettant de comprendre la programmation épigénétique post-méiotique du génome mâle et son impact sur la fertilité masculine.

Abstract

Spermatogenesis, the process of producing male gametes, represents a relevant physiological model for the study of chromatin dynamics. Indeed, a drastic reorganization of the genome is observed at the end of spermatogenesis, during post-meiotic stages of the development of the male germ cells. These reorganizations are intended both to compact the genome to protect it before and during fertilization and to establish a specific male epigenome necessary for early embryonic development. In mature spermatozoa, during these post-meiotic stages, chromatin is completely reorganized so that the protamines replace the histones. This reorganization is initiated by a wave of genome-wide histone acetylation, followed by massive replacement of histones by small basic proteins, transition proteins and protamines. The molecular mechanisms responsible for this reorganization of the genome remain very poorly known today. My thesis aims to explore these mechanisms by using gene inactivation in mouse of epigenetic actors specifically expressed in post-meiotic germ cells : the nuclear factor Nut (Nuclear protein in Testis) and the histone H2A variant, H2A.L.2. We have demonstrated that the Nut protein interacts and stimulates the p300 acetyltransferase activity and induces the hyperacetylation of histone H4 precisely on the lysine residues at 5 and 8 positions. This acetylation is necessary for the interaction with the first bromodomain of Brdt initiating the process of histone replacement by protamines. Thus, the Nut factor is the main element of the histone acetylation wave. We have also highlighted the crucial role of H2A.L.2 in the “opening” of nucleosomal structures in post-meiotic germ cells thus allowing its invasion by the transition proteins. These transition proteins will in turn generate a platform for the recruitment and maturation of protamines and induce the formation of transient structures before the final compaction of the mature sperm genome. These studies allowed us to establish for the first time a coherent molecular model for understanding the post-meiotic epigenetic programming of the male genome and its impact on male fertility.

Table des matières

INTRODUCTION	5
I - La chromatine	6
1 - Structure de la chromatine	6
1.1- Découverte de la chromatine.....	6
1.2- Le nucléosome : unité de base de la chromatine.....	7
1.2.1 - Les histones de cœur	8
1.2.2 - Les histones de liaison	9
2 - Niveaux d'organisation de la chromatine.....	10
3 - Fonction de la chromatine.....	12
3.1- Euchromatine	13
3.2- Hétérochromatine.....	13
II- Acteurs épigénétiques.....	15
1- La méthylation de l'ADN.....	16
2- Les ARN interférents.....	17
2.1 - Les siARN	17
2.2 - Les miARN	17
2.3 - Les piARN.....	18
3- Les modifications post-traductionnelles des histones	19
3.1 - L'acétylation	21
3.2 - La méthylation.....	22
3.3 - La phosphorylation.....	22
3.4 - L'ubiquitination / la sumoylation	23
3.5 - L'ADP-ribosylation / la glycosylation	23
3.6 - Autres acylations des résidus lysine	23
3.6.1 - La crotonylation	24
3.6.2 - La 2-hydroxyisobutyrylation	25
3.6.3 - La butyrylation	25
3.6.4 - La β -hydroxybutyrylation.....	25
3.6.5 - La succinylation, la glutarylation et la malonylation.....	25
3.6.6 - La Propionylation	25
4- Les variants d'histones	26
4.1 - Les variants de l'histone de liaison.....	27
4.2 - Les variants de l'histone H2A	27
4.2.1 - H2A.Z : régulateur de la transcription.....	28
4.2.2 - H2A.X : maintien de l'intégrité du génome.....	28
4.2.3 - MacroH2A : répresseur de la transcription.....	28
4.3 - Les variants de l'histone H3.....	29
4.3.1 - CENP-A : Structuration des centromères	29
4.3.2 - H3.3 : Activateur de la transcription	29
III- Dynamique de la chromatine	30
1 - Les chaperonnes d'histones	30
1.1 - Stockage et transport des histones.....	31
1.2 - Réplication.....	32
1.3 - Transcription	32
1.4 - Spécificité pour les histones variants	32
2 - Les enzymes de modification.....	33

3 - Les facteurs de remodelage ATP-dépendant.....	33
4 - Les protéines de liaison à la chromatine	35
4.1 - Les facteurs de liaison à l'ADN modifié	35
4.2 - Les facteurs de liaison aux histones modifiées	35
4.2.1 - Les bromodomains.....	35
4.2.2 - Les chromodomains.....	36
IV- Spermatogénèse chez la souris	37
1 - Structure du testicule	37
2 - Les trois phases de la spermatogénèse	38
2.1- La phase mitotique.....	39
2.2 - La phase méiotique	40
2.3 - La phase post-méiotique	42
3 - La maturation des spermatozoïdes	43
4 - Cycle de la spermatogénèse	43
V- Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse.....	46
1 - Dynamique des modifications post-traductionnelles des histones.....	47
1.1 - L'acétylation	48
1.2 - La méthylation.....	48
1.3 - La phosphorylation.....	49
1.4 - L'ubiquitination	50
1.5 - Poly-ADP-ribosylation.....	50
2- Incorporation de variants d'histones.....	50
2.1- Les variants de l'histone H1	51
2.1.1 - H1t	52
2.1.2 - H1T2.....	52
2.1.3 - HILS1	52
2.2 - Les variants de l'histone H2A	53
2.2.1 - H2A.X	53
2.2.2 - MacroH2A	53
2.2.3 - H2A.Z.....	53
2.2.4 - H2A.Bbd	54
2.2.5 - TH2A.....	54
2.2.6 - H2A.Lap1-4.....	54
2.3 - Les variants de l'histone H3.....	55
2.3.1 - H3t	56
2.3.2 - CENP-A	56
2.3.3 - H3.3.....	56
2.4 - Les variants de l'histone H2B	57
2.4.1 - TH2B.....	57
2.4.2 - H2BFWT	58
2.4.3 - SubH2Bv/H2BL1	59
3 - Remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines	59
3.1 - Les protéines de transition.....	60
3.2 - Les protamines	61
4- Information épigénétique transmise par les spermatozoïdes.....	62
OBJECTIFS DE THESE.....	65
RESULTATS	67

I- Implication du facteur Nut dans la vague d'acétylation des histones dans les cellules germinales mâles post-méiotiques.....	68
II- Rôle du variant d'histone H2A.L.2 dans le remplacement des histones par les protamines au cours de la spermatogénèse.....	107
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	141
I- Parallèle fonctionnel entre Nut et Brdt	142
II - Impact différentiel de Nut vis-à-vis de l'acétylation de H4 et de H3	142
III- Comparaison fonctionnelle du mécanisme régulateur de Nut au cours de processus physiologique et pathologique.....	143
IV - Déstabilisation de la structure du nucléosome par incorporation de variants d'histone	144
V- Caractérisation des structures subnucléosomales.....	145
VI- Programmation de l'épigénome mâle.....	146
VII- Informations épigénétiques au cours du développement embryonnaire précoce.....	147
CONCLUSION GENERALE	149
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	153
ANNEXES	169

INTRODUCTION

I - La chromatine

1 - Structure de la chromatine

1.1- Découverte de la chromatine

La découverte de la chromatine s'est déroulée en plusieurs étapes et l'historique est retracé dans cette première partie de mon introduction (Olins and Olins, 2003) (Figure 1).

L'histoire commence par la découverte des bases de la génétique par G. Mendel en 1866 qui s'est intéressé de près à l'hérédité définie comme la transmission de caractères d'une génération à la suivante. Grâce à ces travaux réalisés sur les pois, G. Mendel a établi des lois sur les transmissions de caractères héréditaires (Mendel, 1866). Restait à identifier la nature du support de l'hérédité. Les études menées par F. Miescher en 1871 ont permis d'isoler une substance riche en phosphore dans les noyaux des leucocytes nommée nucléine (Miescher, 1871). Quelques années plus tard en 1882, W. Flemming observe une structure nucléaire dense qui absorbe les colorants basophiles qu'il nomma chromatine en référence au terme grec khroma, signifiant coloré. Il suggéra également que cette chromatine soit la nucléine identifiée précédemment. Il décrit pour la première fois les différentes étapes d'une mitose en visualisant la forme la plus compacte de la chromatine, les chromosomes métaphasiques (Flemming, 1882). En 1884, A. Kossel purifia une fraction protéique soluble dans l'acide à partir de noyaux érythrocytaires de poulet, et baptisa ces protéines "histones" (un mélange des termes histos, "tissue" en grec, et peptones, "protéines inconnues") (Kossel, 1884). En 1889, R. Altmann sépare la nucléine en deux fractions, des protéines et une substance acide qu'il nomme l'acide nucléique (Altmann, 1889). Les années suivantes, A. Kossel identifie quatre bases azotées (A, T, G, C) qui composent l'acide nucléique. En 1902, W. Sutton observe pour la première fois une méiose et propose la théorie chromosomique de l'hérédité en décrivant que les chromosomes seraient les supports des gènes, allant dans le même sens que la théorie de Mendel (Sutton, 1902). Les travaux de T. Morgan réalisés sur la génétique de la drosophile en 1911 sont en accord avec cette théorie (Morgan, 1911). C'est en 1919, que le nom d'ADN pour acide désoxyribonucléique a été révélé, grâce à la découverte de désoxyribose au sein de l'acide nucléique par P. Levene (Levene, 1919).

En 1944, O Avery, C MacLeod et M. McCarty, découvrent que l'ADN serait bien le support de l'hérédité grâce à des expériences d'infection de souris à l'aide de souches bactériennes modifiées (Avery et al., 1944). Mais c'est en 1952 que l'ensemble de la communauté scientifique a été convaincue, grâce aux travaux de A. Hershey et M. Chase qui ont démontré que l'ADN est à l'origine de la reproduction du bactériophage et donc porteur de l'information génétique (Hershey and Chase, 1952).

Le modèle de la structure de l'ADN en double hélice proposé par Watson et Crick en 1953 achève de définir l'ADN comme macromolécule codante et permet de commencer à comprendre les fondements moléculaires des lois de Mendel en s'appuyant sur la complémentarité des bases (Franklin and Gosling, 1953; Watson and Crick, 1953; Wilkins et al., 1953). L'information génétique portée par l'ADN est décryptée en acides aminés ; c'est le code génétique qui fut établi en 1961 grâce à MW. Nirenberg.

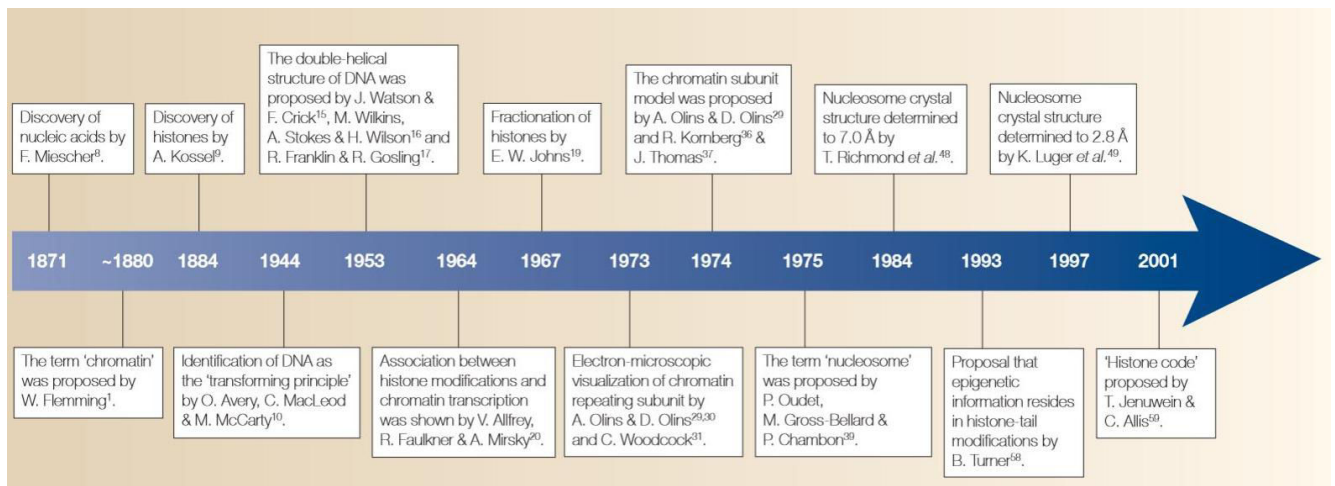


Figure 1 : Les grandes découvertes concernant les aspects moléculaires et cellulaires de la chromatine. Inspiré de (Olins and Olins, 2003).

1.2- Le nucléosome : unité de base de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN présent dans le noyau est donc associé à des protéines structurales formant une structure nucléoprotéique appelée chromatine.

Au cours des années 1970, plusieurs études ont permis de mieux comprendre l'organisation de la chromatine. L'utilisation accidentelle de la nucléase sur la chromatine a identifié une structure en sous-unités répétées (Hewish and Burgoyne, 1973). La microscopie électronique a révélé la structure de la chromatine « en collier de perles » (Olins and Olins, 1974; Oudet et al., 1975) (Figure 2A).

En 1974, R. Kornberg a identifié l'unité de base, comprenant 146 paires de bases d'ADN, enroulées autour d'un octamère de protéines histones (Olins and Olins, 1974; Oudet et al., 1975). Cet élément de base sera baptisé « nucléosome » par Pierre Chambon en 1975 (Germond et al., 1976). La structure du nucléosome a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Figure 2B) (Burlingame et al., 1985; Luger et al., 1997; Richmond and Davey, 2003; Richmond et al., 1984).

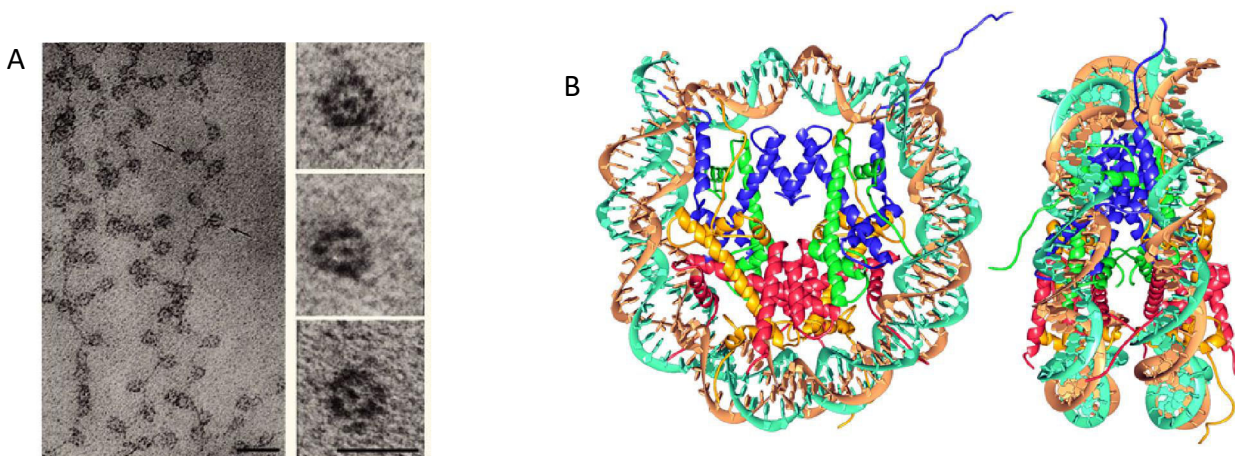


Figure 2 : Structure de base de la chromatine. A) fibre de chromatine observée au microscope électronique avec à gauche le collier de perles observé à faible force ionique et à droite des nucléosomes individuels (Olins and Olins, 2003). B) Particule nucléosomale cristallisée aux rayons X à une résolution de 2,8 Å. Les 4 paires d'histones sont situées au centre et entouré de 146 paires de base d'ADN (vue de face à gauche, vue de profil à droite) (Luger et al., 1997).

1.2.1 - Les histones de cœur

La particule de cœur du nucléosome est constituée d'un octamère d'histones contenant une paire de chacune des histones de cœur, nommées H2A (14 kDa), H2B (14 kDa), H3 (15 kDa) et H4 (11 kDa) (Figure 3A). Le séquençage de ces protéines a révélé leur taille entre 100 à 130 acides aminés, leur forte conservation au cours de l'évolution et leur enrichissement en lysine et arginine expliquant leur basicité. Cette dernière caractéristique explique les liaisons hydrogènes entre l'ADN et les histones puisque la moitié de ces interactions se font entre des lysines et des arginines chargées positivement et le squelette sucre/phosphate de l'ADN chargé négativement (Luger et al., 1997; Richmond and Davey, 2003).

Les histones de cœur sont très similaires d'un point de vue structural (Figure 3B). Elles sont composées d'une zone globulaire centrale, nommée le domaine « histone fold » structuré en 3 hélices α séparées par deux boucles flexibles. Ce domaine permet la formation des hétérodimères H2A-H2B et H3-H4 par des interactions de nature hydrophobe dites « poignée de main » (Arents et al., 1991). Les histones H3 et H4 s'associent entre elles en tétramères contrairement aux histones H2A et H2B qui restent sous forme de dimères (Lusser and Kadonaga, 2004). L'octamère du nucléosome est donc constitué de deux dimères H2A/H2B et d'un tétramère de H3 et H4.

De part et d'autre du domaine « histone fold », les extrémités N-terminales et C-terminales se localisent à l'extérieur du nucléosome. Les parties N-terminales des histones n'interviennent pas dans la structure du nucléosome (Luger et al., 1997). Leur exposition à l'extérieur de la

partie centrale les rend très accessibles à des modifications post traductionnelles (MPT) (Khorasanizadeh, 2004; Kouzarides, 2007; Strahl and Allis, 2000). Ces modifications post-traductionnelles jouent un rôle essentiel au niveau de la structure de la chromatine et peuvent servir de motifs de reconnaissance à la liaison de facteurs régulateurs (voir paragraphe II-3).

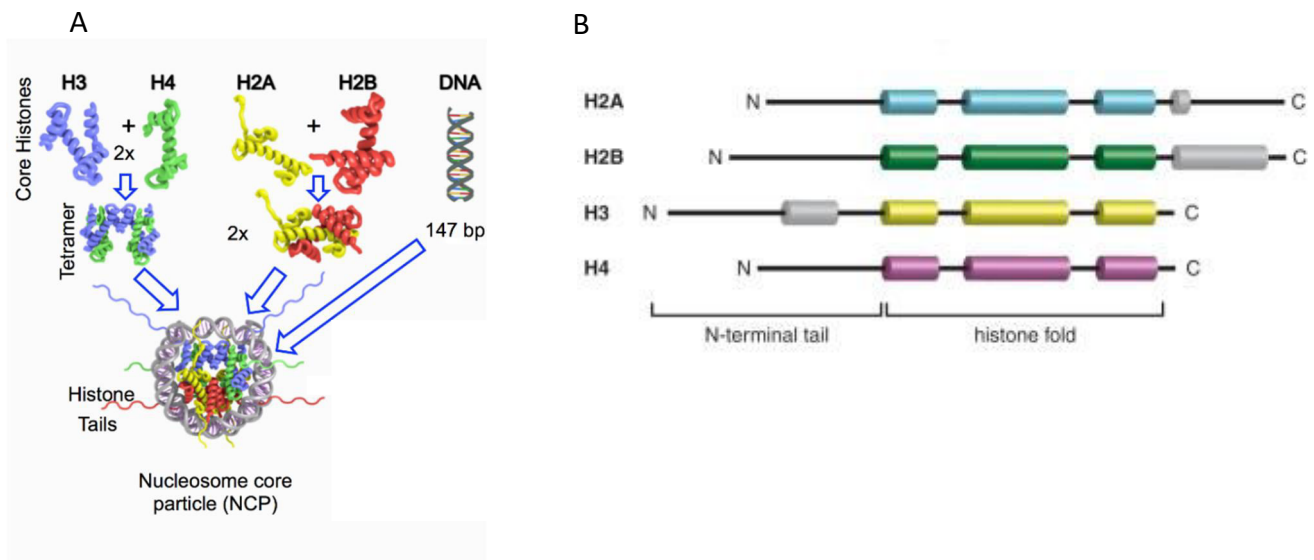


Figure 3 : Composition du nucléosome. A) Assemblage de l'octamère d'histones avec l'ADN formant le nucléosome (<https://fr.esdifferenc.com/>). B) Alignement des structures secondaires des histones de cœur (Dutnall and Ramakrishnan, 1997).

1.2.2 - Les histones de liaison

L'histone de liaison, nommée H1 s'associe avec la région d'ADN de liaison entre deux nucléosomes, au niveau des points d'entrée et de sortie de l'ADN sur le nucléosome. H1 avec la particule de cœur du nucléosome constitue le "chromatosome" (Figure 4). Il existe 10 isoformes de H1 (H1.1 à H1.5, H1°, H1T, H1T2, H1LS, H1oo). L'histone H1 a une structure différente de celles des histones de cœur, elle est composée de 3 domaines : une courte zone N-terminale riche en lysines, un domaine globulaire central, et une très longue extrémité C-terminale non structurée. Contrairement aux extrémités, le domaine globulaire est très conservé et est structuré par un motif dit « wing-hélice ». Ce domaine est essentiel pour l'interaction avec l'ADN. Les extrémités amino- et carboxy- terminales sont quant à elles mobiles, fortement chargées positivement et soumises à plusieurs modifications post-traductionnelles. Les histones H1 peuvent moduler l'interaction des nucléosomes adjacents et ainsi jouer sur la compaction de la chromatine (Bednar et al., 2017; Godde and Ura, 2008).

Contrairement aux histones de cœur, l'inactivation de l'histone de liaison n'est pas létale et a révélé une certaine redondance entre les différentes isoformes (Khochbin, 2001). Cette

invalidation induit une altération globale de la structure de la chromatine, suggérant un mécanisme de régulation complexe entre histones de liaison et structure chromatinienne (Fan et al., 2005; Hergeth and Schneider, 2015; Khochbin, 2001; Robinson and Rhodes, 2006).

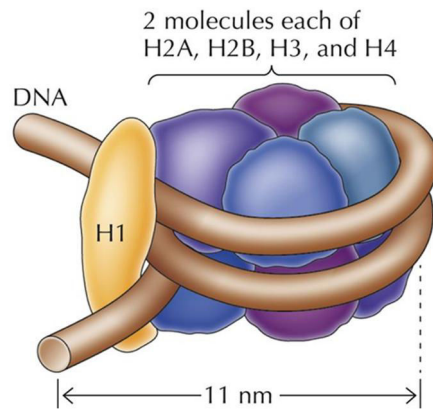


Figure 4 : Structure du chromatosome (site <http://easylifescienceworld.com/nucleosome/>).

2 - Niveaux d'organisation de la chromatine

Le noyau d'une cellule humaine mesure en moyenne 10 μm de diamètre et contient environ 3 milliards de paires de base d'ADN, ce qui correspond à 2 mètres d'une fibre de 2 nm. Cela équivaut à faire rentrer un fil de 20 km de long sans nœud dans une balle de tennis. Il est donc nécessaire d'organiser la chromatine en plusieurs niveaux afin de la compacter au maximum (Figure 5).

Les nucléosomes décrits auparavant sont reliés les uns aux autres par une région de liaison qui contient quelques dizaines de paires de base d'ADN. Cet enchaînement des nucléosomes appelé nucléofilament forme une structure de 11 nm de diamètre dite en « collier de perles » et constitue le premier niveau d'organisation de la chromatine (Felsenfeld and Groudine, 2003).

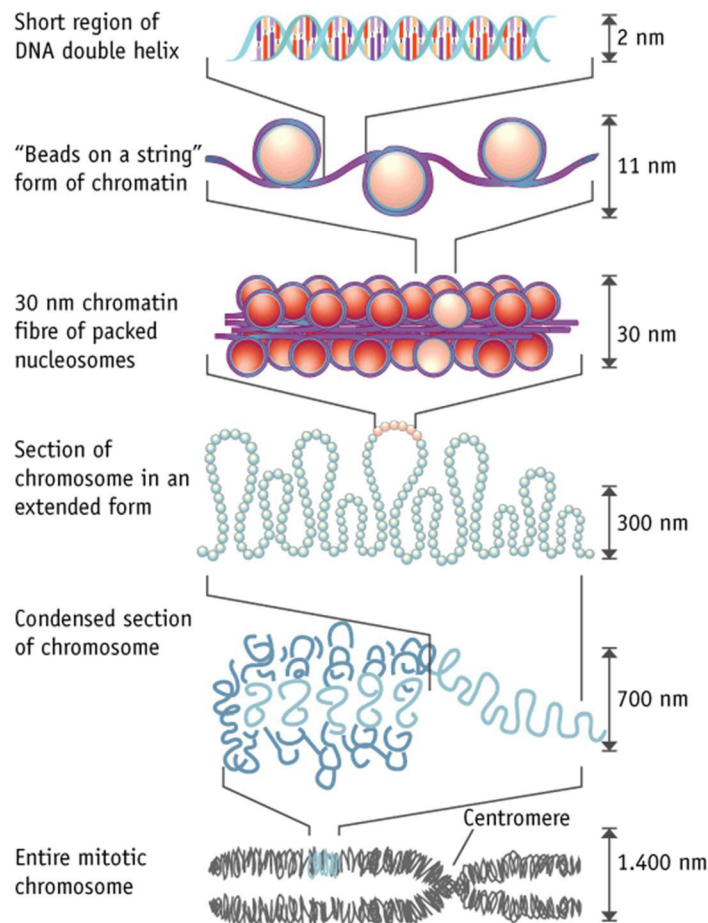


Figure 5 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine. Le niveau de base est le nucléosome. Ils vont se lier entre eux et former la structure en collier de perles de 11 nm. Cette fibre s'enroule sur elle-même formant la fibre de 30 nm suivi par des repliements et la formation de grandes boucles pour atteindre le niveau le plus compacté représenté par le chromosome métaphasique. Inspiré de (Felsenfeld and Groudine, 2003).

Le second niveau d'organisation correspond à la compaction de ce nucléofilament. Des interactions spécifiques entre les nucléosomes aboutissent à la formation d'une fibre de 30nm. Cette fibre hélicoïdale a été observée par microscopie électronique par de nombreux groupes, mais sa structure fait encore l'objet de controverse. Il existe deux modèles : le modèle du solénoïde où les oligosomes pourraient s'arranger en hélice à un brin ou le modèle en zigzag avec une structure en hélice à deux brins (Figure 6). Même si le modèle en solénoïde est privilégié car il tient compte de la présence de l'histone de liaison H1, ces deux structures pourraient bien coexister dans le noyau et correspondre à différents états fonctionnels de la chromatine. En effet, la chromatine pourrait adopter une structure compacte en présence des histones de liaison et relâchée en leur absence (Grigoryev et al., 2009; Pachov et al., 2011).

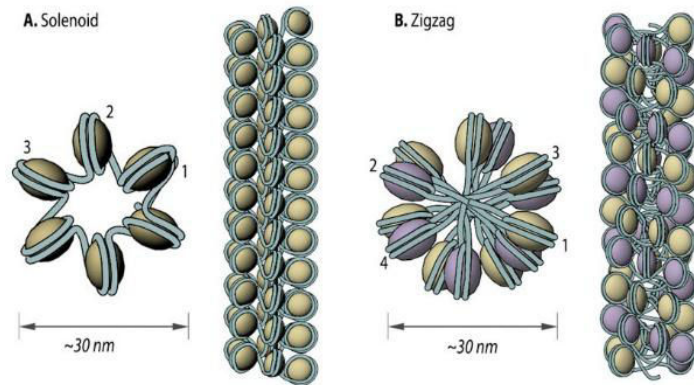


Figure 5 : Les modèles d'organisation de la fibre de 30 nm. A) Modèle en solénoïde avec une organisation en hélice à un brin. B) Modèle en zig zag avec une organisation en hélice à deux brins (site <https://www.mechanobio.info/genome-regulation/what-are-nucleosomes/>).

Les niveaux supérieurs d'organisation des fibres de chromatine sont moins connus. On suppose que la fibre de 30 nm pourrait s'organiser en forme de boucles le long d'une matrice protéique centrale appelée matrice nucléaire pour atteindre un diamètre de 300 nm.

Enfin cette organisation s'enroule en une spirale pour générer le chromosome métaphasique observé en mitose qui représente le niveau de compaction maximal, la fibre mesure alors 1400 nm de diamètre.

Malgré ce degré de compaction extrême, l'ADN doit rester accessible afin que les événements de transcription, réplication, réparation, recombinaison et division s'effectuent correctement. Ainsi, la dynamique d'organisation de la chromatine peut réguler potentiellement toutes les fonctions du génome.

3 - Fonction de la chromatine

Deux types de chromatine ont été identifiées par microscopie électronique : l'hétérochromatine et l'euchromatine (Figure 7).

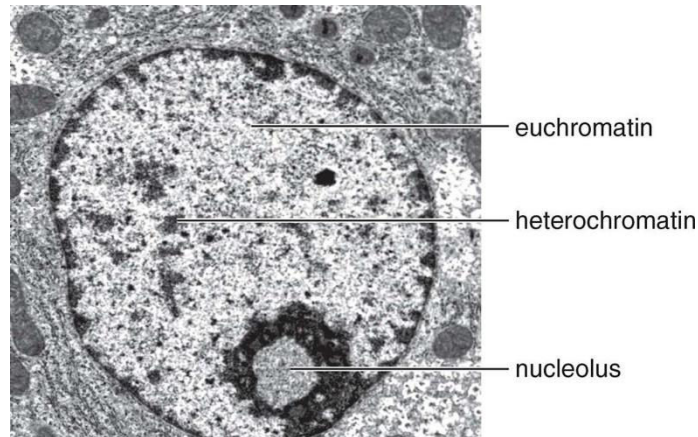


Figure 7 : Différents domaines de la chromatine. En microscopie électronique, dans un noyau, les régions denses et noires correspondent à l'hétérochromatine et les régions moins compactes et claires correspondent à l'euchromatine (site http://schoolbag.info/chemistry/mcat_biochemistry/34.html).

3.1- Euchromatine

L'euchromatine se définit comme une structure claire et relâchée qui est associée à une transcription active des gènes. Certaines modifications d'histone sont observées avec une plus grande fréquence dans le compartiment euchromatinien, c'est le cas de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me) (Santos-Rosa et al., 2002), de la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me) (Bernstein et al., 2005) et de l'acétylation des histones H3 et H4 (H3ac, H4ac) (Grunstein, 1997).

3.2- Hétérochromatine

L'hétérochromatine est quant à elle une structure dense et compacte. Son état de condensation n'est pas altéré au cours du cycle cellulaire. Elle est associée majoritairement à une répression de la transcription. Des modifications d'histones sont associées à cet état chromatinien comme la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) (Litt et al., 2001; Taverna et al., 2002) et la présence de la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1).

L'hétérochromatine peut être subdivisée en deux sous-catégories : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative.

L'hétérochromatine constitutive, généralement pauvre en gènes, est formée principalement de séquences répétées situées à proximité des centromères, des télomères et des péricentromères. L'hétérochromatine constitutive est un état stable et irréversible de la

chromatine qui est transmis entre chaque division cellulaire, constituant donc une forme de mémoire cellulaire (Grewal and Elgin, 2007). Cependant, des séquences peuvent être transcrites transitoirement. L'expression de ces séquences est fondamentale, comme par exemple celle de séquences péricentromériques au cours du développement embryonnaire préimplantatoire (Probst et al., 2010). Le rôle de ces ARN n'est pour l'instant pas connu.

L'hétérochromatine facultative contient des régions codantes qui peuvent adopter de façon réversible les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine constitutive. Ces régions peuvent se décompacter sous certaines conditions et permettre ainsi la transcription de gènes normalement réprimés. L'exemple le plus remarquable est l'inactivation d'un des chromosomes X chez les femelles de mammifères. Ce chromosome, lorsqu'il est compacté sous forme d'hétérochromatine facultative, est transcriptionnellement réprimé et forme le corpuscule de Barr (Arthold et al., 2011).

II- Acteurs épigénétiques

La découverte du code génétique fut un évènement majeur, cependant, restreindre le support de l'hérédité à l'ADN est très limitant. En effet, même si notre séquence d'ADN fait de nous un individu unique, cela ne permet pas d'expliquer comment deux cellules d'un même organisme, contenant la même information génétique sont morphologiquement et fonctionnellement différentes et surtout comment elles vont transmettre leurs caractères différenciés à leur descendance.

Il existe donc une information supplémentaire présente dans nos cellules autre que l'information génétique, on parle d'information épigénétique. Cette information est définie par les changements stables et héréditaires qui ne sont pas associés à une modification de la séquence d'ADN. Cinquante ans après avoir sacré l'ADN comme support des informations héréditaires, le champ de recherche de l'épigénétique bouscule ce dogme et complexifie la simplicité apportée par le pouvoir codant de l'ADN.

Nous définirons l'épigénome par l'ensemble des marques épigénétiques transmises au cours de la division cellulaire. De nombreuses informations épigénétiques sont portées par les constituants de la chromatine : la méthylation de l'ADN, les ARNs non-codants, les modifications post-traductionnelles des histones, les complexes de remodelage de la chromatine et l'incorporation de variants d'histones. Ces modifications de l'ADN et des protéines associées vont constituer un véritable langage qu'on appelle le « code épigénétique » (Figure 8) (Husain and Jeffries, 2017).

Cette partie de mon introduction détaillera les différents acteurs épigénétiques.

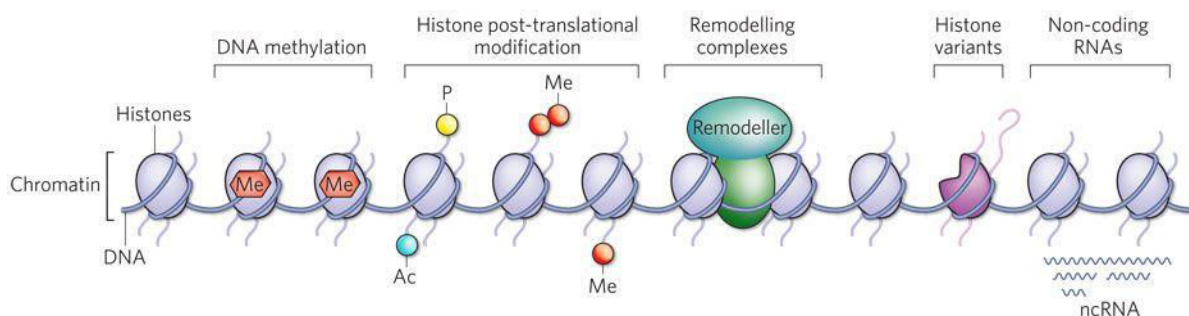


Figure 8 : Bases moléculaires de l'information épigénétique. Régulation de l'information épigénétique par différents mécanismes qui impliquent plusieurs acteurs modulant l'ADN ou les histones (Dulac, 2010).

1- La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification chimique réversible que l'on retrouve chez de nombreux êtres vivants (Goll and Bestor, 2005). Chez les mammifères, cette modification consiste à ajouter un groupement méthyle (-CH₃) sur le carbone 5 d'un résidu cytosine. Les sites de méthylation sont situés la plupart du temps au niveau des dinucléotides CG, appelés îlots CpG. Ces îlots sont localisés principalement dans des régions comportant de nombreuses séquences répétées mais aussi sur les promoteurs des gènes (Bird, 2002).

Les enzymes qui catalysent cette réaction font partie d'un groupe de protéines très conservées appelées ADN méthyltransferases (DNMT). La suppression des DNMT chez la souris est létale ce qui montre que la méthylation de l'ADN est une modification essentielle à la survie des cellules eucaryotes supérieures (Li et al., 1992; Okano et al., 1999). Aujourd'hui, 3 familles de DNMT ont été identifiées et classées selon leur homologie de séquences dans leur partie catalytique carboxy-terminale (Gowher and Jeltsch, 2018; Klose and Bird, 2006) :

- DNMT 1 maintient les profils de méthylation au cours des divisions cellulaires en copiant les marques de méthylation au moment de la propagation de la fourche de réplication (Rountree et al., 2000). En effet, DNMT1 a une grande affinité pour l'ADN hémiméthylé, elle va donc méthyle le brin néo-synthétisé (Lyko, 2018).

- DNMT 2 est peu connue, il a été montré qu'elle méthyle un ARNt (Goll et al., 2006; Jeltsch et al., 2017).

- La famille DNMT 3 comprend deux membres enzymatiquement actifs, DNMT3a et DNMT3b et un facteur régulateur, DNMT3-Like (DNMT3L). DNMT3a et DNMT3b sont des méthyltransferases *de novo*, elles sont toutes les deux impliquées dans la méthylation de nouveaux îlots CpG, notamment lors du développement des cellules germinales et de l'embryogénèse précoce (Goll and Bestor, 2005). DNMT3L ne contient pas de domaine d'activité DNMT, mais interagit avec DNMT3a et DNMT3b afin de moduler leur activité enzymatique (Chen et al., 2005; Gowher et al., 2005; Kareta et al., 2006; Suetake et al., 2004; Tajima et al., 2016).

Cette méthylation de l'ADN représente une marque épigénétique importante pour de nombreux processus cellulaires fondamentaux chez les organismes eucaryotes. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes, dans la mise en place de l'empreinte parentale ainsi que dans l'inactivation des transposons (Sasai and Defossez, 2009).

Il existe une déméthylation active des îlots CpG méthylés par les enzymes de la famille TET (Ten-Eleven Translocation). Ces enzymes peuvent oxyder les 5-méthylcytosines (Kohli and Zhang, 2013; Williams et al., 2011). La déméthylation peut cependant avoir lieu de manière

passive, au fil des générations cellulaires, par la perte de l'information de méthylation durant la réplication de l'ADN. Si la méthylation n'est pas recopiée à chaque réplication, des divisions successives permettent une dilution progressive des marques de méthylation. Ainsi, une activité déméthylase ne semble pas indispensable à la reprogrammation de cette marque épigénétique. Cependant, après la fécondation, le génome paternel est presque entièrement déméthylé avant la première division cellulaire. Cette déméthylation active prouve l'existence d'un complexe possédant une telle activité (Morgan et al., 2005; Szulwach and Jin, 2014).

2- Les ARN interférents

Les ARN interférents (ARNi) sont de petits ARN non codants qui guident les complexes protéiques de la famille des argonautes vers l'ARN cible grâce à une reconnaissance par homologie de séquence. Ce processus permet *in fine* de dégrader ces ARN cibles.

Ces ARN interférents sont donc fortement impliqués dans la régulation de nombreux mécanismes comme l'expression de gènes codants, le maintien d'un état condensé de la chromatine ainsi que la protection du génome vis-à-vis des ARN viraux ou bien des éléments transposables (Eckstein, 2005).

Il existe trois différents types d'ARN interférents : les petits ARN interférents (siARN : small interfering ARN), les microARN (miARN) et les piARN qui sont des ARN qui interagissent avec les protéines PIWI (Ghildiyal and Zamore, 2009) (Figure 9).

2.1 - Les siARN

Les siARN sont des ARN interférents de 21 à 23 nucléotides. Ces siARN sont d'abord transcrits sous forme de double brin en tête d'épingle. Cette forme immature est exportée dans le cytoplasme puis découpée par l'endoribonucléase Dicer afin de générer un siARN mature qui va s'incorporer au complexe RISC (RNA induced silencing complex). Ce processus permet la modulation de l'expression des gènes codants.

2.2 - Les miARN

Les miARN ont une taille comprise entre 19 et 25 nucléotides et leurs séquences dérivent du génome entier (Shomron and Levy, 2009). Ils sont transcrits sous forme de précurseur, un ARN composé de plusieurs tige-boucles. Une première coupure dans le noyau dissocie les différentes tige-boucles qui sont alors exportées vers le cytoplasme afin d'être à nouveau

digérées partiellement par Dicer générant ainsi un miARN mature simple brin. Ces miARN vont s'associer aux protéines Ago et ainsi former le complexe RISC. Les miARN ont également un rôle dans la régulation de l'expression des gènes codants.

2.3 - Les piARN

Les piARN sont les ARN interférents de plus grande taille entre 24 et 34 nucléotides (Saxe and Lin, 2011). Les précurseurs des piARN sont simple brin et ont une maturation différente des miARN et siARN. Ils sont exprimés spécifiquement et de manière abondante dans les cellules germinales mâles et femelles (Russell and LaMarre, 2018). Ces ARN interférents ont la particularité de s'associer avec les protéines de la famille PIWI. Cette interaction induit la dégradation des ARN cibles qui s'apparient grâce à leur homologie de séquence avec les piARN. Ces ARNs cibles sont principalement des éléments transposables qui sont maintenus dans un état de forte répression. Les piARN ont donc un rôle essentiel dans la protection du génome mâle en réduisant la prolifération des éléments transposables.

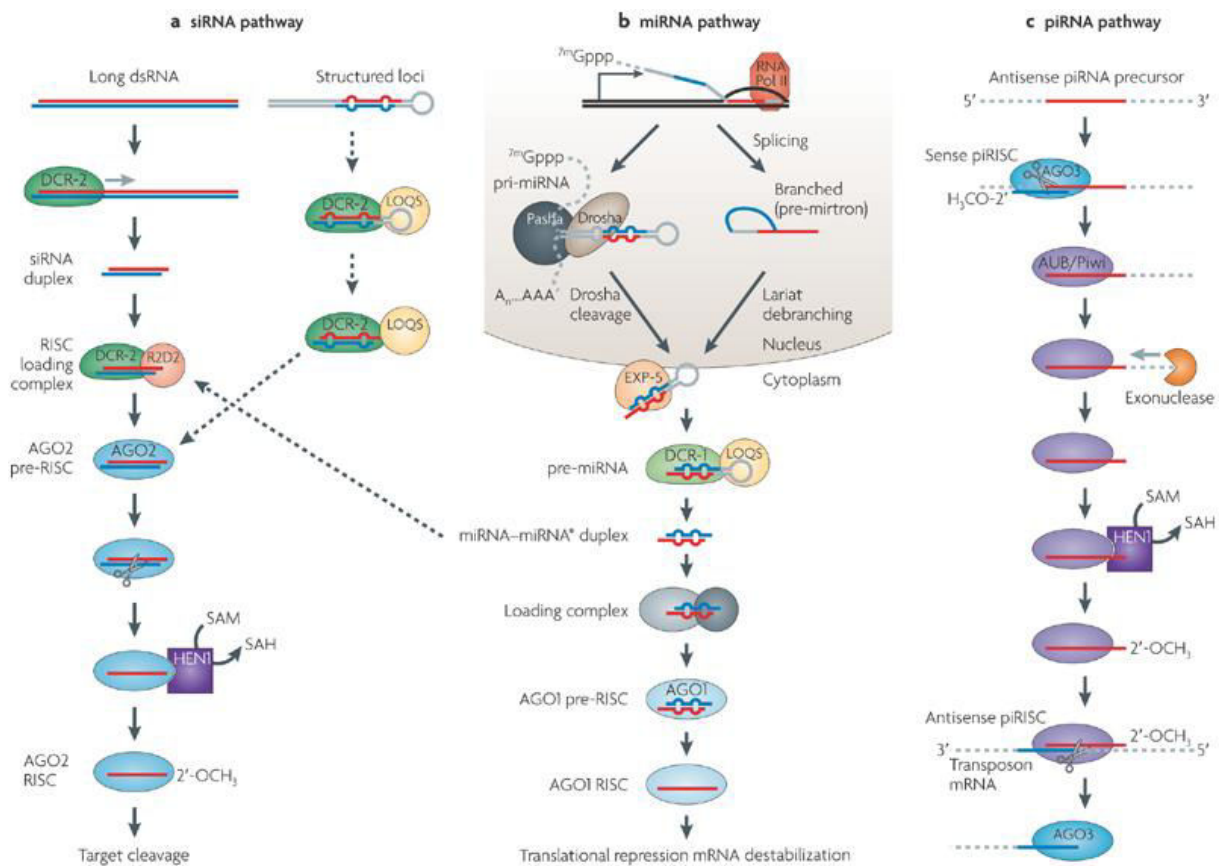


Figure 9 : Les trois différents modèles d'action des ARN interférents : siARN, miARN et piARN (Ghildiyal and Zamore, 2009).

3- Les modifications post-traductionnelles des histones

L'ADN n'est pas le seul porteur de l'information épigénétique. En effet, les histones sont sujettes à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs). Les MPTs sont essentiellement situées au niveau des extrémités N-terminales des histones mais elles peuvent aussi toucher les domaines centraux des histones. Ces modifications covalentes ciblées sur des sites spécifiques sont catalysées par différentes enzymes et sont généralement réversibles. L'état de modification d'un résidu d'histone est contrôlé par un équilibre entre les enzymes qui ajoutent et celles qui enlèvent une modification donnée (Lawrence et al., 2016).

Au vu du nombre d'acides aminés modifiables, les combinaisons possibles au sein d'un seul nucléosome sont évaluées à plus d'un milliard de milliards (Figure 10). Une uniformisation de la dénomination des modifications a été proposée et une nomenclature a été instaurée en 2005 en tenant compte du type d'histone, du type et du numéro de l'acide aminé ainsi que du type de la modification (Turner, 2005). A titre d'exemple, H4K8bu est utilisé pour la butyrylation de la lysine 8 de l'histone H4. Cette nomenclature sera utilisée dans la suite de ce manuscrit.

Un même résidu peut être modifié par différents types de MPT, ces modifications constituent donc un véritable code. Chacune de ces modifications ont un rôle biologique précis, elles participent à la régulation de la compaction et de l'accessibilité de la chromatine. Elles assurent également le recrutement sur la chromatine de protéines effectrices spécifiques de façon spatio-temporelle précise. Les MPTs définissent un état chromatinien particulier et régulent ainsi un gène ou un locus. En effet, les MPTs sont souvent classées en deux catégories, elles sont associées soit à une activation soit à une répression de la transcription. Les modifications corrélées à une transcription active telles que l'acétylation des histones H3 et H4 ou la méthylation de H3K4, H3K36 et H3K79 sont considérées comme des signaux de l'euchromatine. Inversement, les modifications fréquemment observées au niveau de la chromatine compactée et transcriptionnellement réprimée, comme la triméthylation de H3K9, H3K27 et H4K20, sont référencées comme des modifications de l'hétérochromatine.

Chaque modification chimique d'un résidu a donc un rôle particulier et régule en partie de nombreux mécanismes tels que la réplication, la réparation ainsi que la transcription. Ainsi la combinaison de modifications portées par un même nucléosome définit un message épigénétique entraînant une réponse spécifique. Du fait de la grande diversité des types de modifications et du nombre important de cibles, les combinaisons possibles au sein d'un nucléosome frôlent l'infini. Les combinaisons spécifiques de ces marques créent ainsi un code histone diversifié où chacune de ces combinaisons vont définir un signal (Fischle et al., 2003; Strahl and Allis, 2000). Les grandes lignes de ce code histone ont été établies grâce à de nombreux travaux, mais ce code reste très complexe et de nombreux mécanismes épigénétiques restent à ce jour encore incompris.

La liste des MPTs est conséquente et le nombre de modifications identifiées ne cesse de s'accroître, grâce notamment à l'utilisation de nouvelles approches en spectrométrie de masse (Tan et al., 2011). Les MPTs les plus étudiées à ce jour sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la butyrylation, l'ubiquitination, la crotonylation et d'autres sont un peu moins décrites comme l'ADP ribosylation, la sumoylation, la glycosylation, la biotinylation, la citrullination,...

Etant donné la grande diversité des MPTs, seules les modifications les plus étudiées seront décrites.

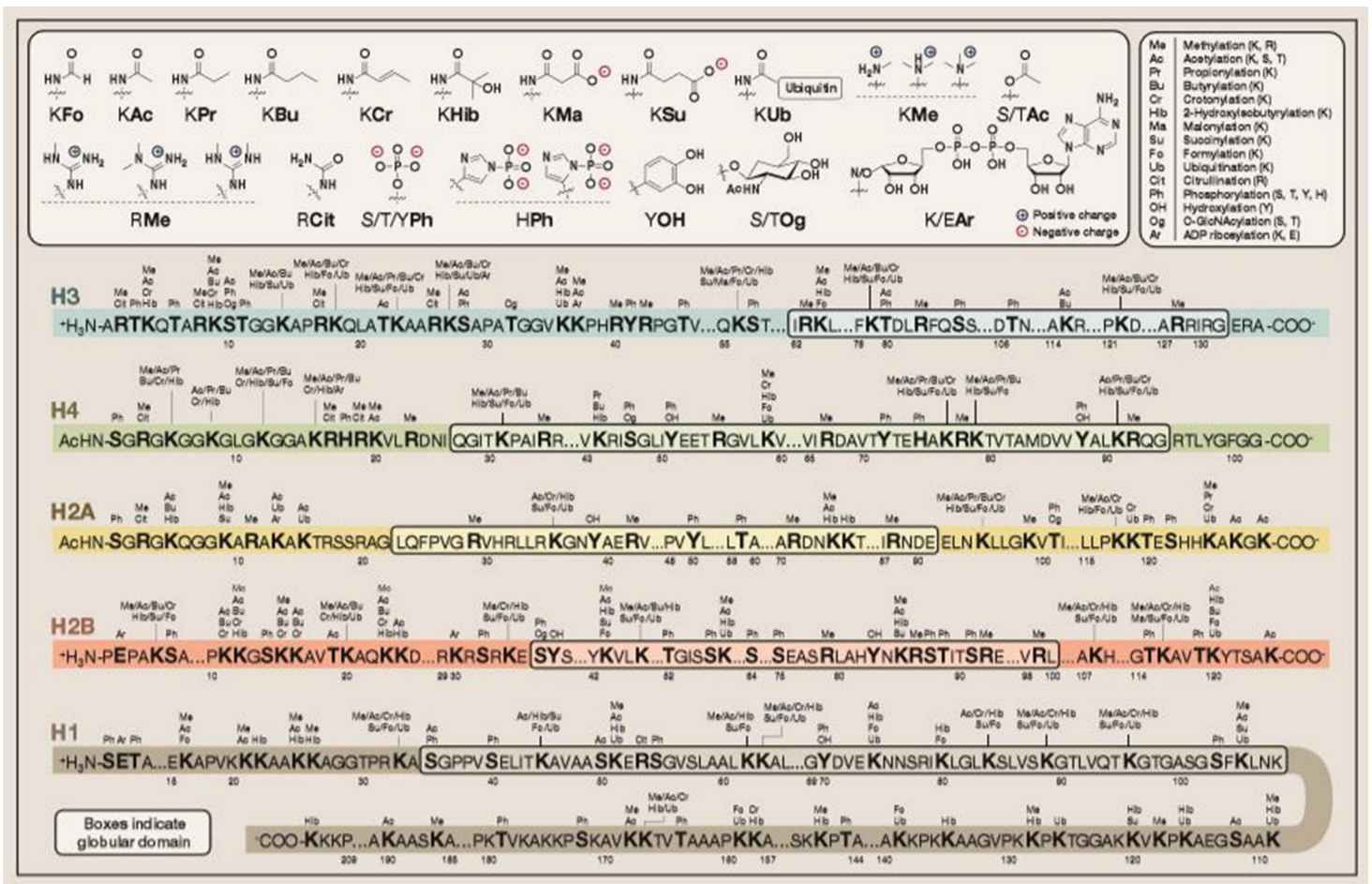


Figure 10 : Cartographie des MPTs d'histones illustrant les nombreuses combinaisons possibles (Huang et al., 2014).

3.1 - L'acétylation

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupement acétyl (CH₃-CO) au niveau du groupement amine des lysines et neutralise ainsi la charge positive des lysines. Cette modification altère ainsi les interactions électrostatiques liant les histones à l'ADN chargé négativement aboutissant à une ouverture du nucléosome. La chromatine devient donc plus flexible, l'ADN est plus accessible et devient ainsi favorable à la transcription (Kouzarides, 2007; Zentner and Henikoff, 2013). Ainsi, l'acétylation des lysines sur les parties N-terminales des histones est associée à une transcription active.

En plus de la partie N-terminale, des lysines du domaine globulaire peuvent aussi être modifiées. Les sites modifiés dans le cœur de l'histone peuvent avoir des effets drastiques sur la stabilité des nucléosomes. Par exemple, l'acétylation de la lysine 56 du domaine de cœur de H3 (H3K56ac) affaiblit l'interaction entre H3 et l'ADN et favorise la dissociation du nucléosome (Han et al., 2007). Il en est de même pour l'acétylation de H3K122 qui crée aussi une forte instabilité du nucléosome (Manohar et al., 2009). Certaines acétylations peuvent même modifier la structure de la fibre de chromatine, c'est le cas de l'acétylation de H4 sur la lysine 16 (H3K16ac) qui va empêcher la formation de la fibre de 30 nm (Shogren-Knaak et al., 2006).

L'acétylation étant une modification réversible et très dynamique, de nombreuses enzymes vont réguler l'équilibre entre l'acétylation et la déacétylation. L'acétylation est catalysée par les histones acétyltransférases (HAT) qui utilisent le co-enzyme A comme substrat. Tandis que les histones déacétylases (HDAC) vont enlever les groupements acétyl présents sur les lysines (Aka et al., 2011).

Les HAT sont divisées en 4 principales familles basées sur leur similarité de séquence : GNAT, MYST, p300/CBP et les récepteurs nucléaires et co-activateurs. Les HAT nucléaires sont dites de type A et interviennent dans la régulation de l'assemblage de la chromatine et lors de la transcription des gènes. Les HAT qui sont dites de type B catalysent l'acétylation des histones dans le cytoplasme (Voss and Thomas, 2018).

Les HDAC ont été regroupées en quatre classes selon des analyses phylogénétiques. La classe I correspond aux HDAC1, 2, 3 et 8 humaines, la classe II aux HDAC4, 5, 6, 9 et 10 humaines, la classe III aux protéines sirtuines 1 à 7 chez l'homme et enfin la classe IV contient uniquement HDAC11 (Gregorette et al., 2004; Holbert and Marmorstein, 2005).

3.2 - La méthylation

La méthylation consiste en un transfert d'un groupement méthyl (CH₃) sur le groupement amine (NH₂) d'une lysine ou d'une arginine. L'histone majoritairement méthylée est l'histone H3, suivie par l'histone H4. L'effet de cette modification sur la dynamique du nucléosome est moins drastique que l'acétylation car elle ne modifie pas la charge positive de l'acide aminé. Cette modification est plus complexe car chaque résidu peut avoir des degrés différents de méthylation. Les lysines peuvent être mono-, di- ou tri- méthylées et les arginines peuvent être mono- ou di-méthylées et ceci de manière symétrique ou asymétrique (Di Lorenzo and Bedford, 2011; Martin and Zhang, 2005).

Il existe une spécificité fonctionnelle selon le degré de méthylation. Au niveau de la transcription, cette modification a des effets activateurs ou répresseurs selon le résidu affecté. Trois lysines, en particulier, sont associées à une activation de la transcription lorsqu'elles sont méthylées : H3K4, H3K36 et H3K79 et sont donc considérées comme des modifications de l'euchromatine. Inversement, la méthylation de H3K9, H3K27 et H4K20 est fréquemment associée à une répression de la transcription. La di- et triméthylation de H3K9 en particulier, sont des modifications typiques de l'hétérochromatine. Elles servent de signaux d'interaction avec la protéine HP1 (Nielsen et al., 2001).

Les enzymes qui catalysent cette modification sont des histones méthyltransférases (HMT) qui sont subdivisées en 2 familles selon le résidu modifié : les HKMT méthylent les lysines (Qian and Zhou, 2006) et les PRMT méthylent les arginines (Krause et al., 2007). A l'exception de l'enzyme Dot1, toutes les HKMT possèdent un domaine catalytique SET (su(var)3-9, enhancer-of-zest, trithorax). La spécificité d'action des HKMT ainsi que le nombre de groupement méthyl ajouté va dépendre de la nature de chaque enzyme mais aussi de la présence de certains cofacteurs.

La déméthylation des histones s'opère grâce à des enzymes déméthylases. LSD1 et une famille de protéines contenant un domaine Jumonji (JmJC) ont été décrites comme déméthylases au niveau des résidus lysine (Walport et al., 2012) et PAD4 comme déméthylase au niveau des résidus arginine (Chang et al., 2007).

3.3 - La phosphorylation

La phosphorylation des histones consiste à l'addition d'un groupe phosphate (PO₄) chargé négativement, au niveau du groupement hydroxyle (OH) des résidus sérine, thréonine ou tyrosine. Cette phosphorylation est catalysée par des kinases et la déphosphorylation par des phosphatases. L'addition de ce groupement phosphate entraîne une répulsion de charge entre l'histone et l'ADN étant lui aussi chargé négativement, ce qui peut perturber leur

interaction. La phosphorylation des histones génère différentes fonctions (Rossetto et al., 2012; Sawicka and Seiser, 2012).

La phosphorylation des résidus H3S10 et H3S28 est associée à la condensation de la chromatine mitotique ainsi qu'à une transcription active de certains gènes. La phosphorylation de ces sérines est catalysée par les kinases mitotiques Aurora.

La phosphorylation de la serine 139 du variant d'histone H2A.X se produit au niveau des coupures double brin de l'ADN et joue donc un rôle dans la réparation des cassures. Cette modification est réalisée par les kinases ATM et ATR.

3.4 - L'ubiquitination / la sumoylation

D'autre part, en dehors de petits groupements chimiques, des peptides (environ 8kDa) peuvent interagir avec les résidus lysine : c'est le cas lors de l'ubiquitination et la sumoylation (Kouzarides, 2007; Zentner and Henikoff, 2013).

3.5 - L'ADP-ribosylation / la glycosylation

Certains sucres sont également utilisés lors de la modification des histones. C'est le cas de l'ADP-ribosylation qui consiste à fixer un polymère d'ADP-ribose au niveau des résidus d'acide glutamique ou d'acide aspartique des histones. Cette réaction est catalysée par les enzymes de la famille poly-ADPribose polymérase (PARP) (Messner and Hottiger, 2011). La glycosylation est aussi réalisée au niveau de certains résidus sérine et thréonine (Sakabe et al., 2010).

3.6 - Autres acylations des résidus lysine

De nombreuses modifications ciblent également les résidus lysine des histones. Parmi ces MPTs, on retrouve la crotonylation (Kcr), la 2-hydroxyisobutyrylation (Khib), la butyrylation (Kbu), la malonylation (Kmal), la propionylation (Kpr), la succinylation (Ksu), la glutarylation (Kglu) et la β -hydroxybutyrylation (Kbhb) (Chen et al., 2007; Dai et al., 2014; Tan et al., 2011; Tan et al., 2014; Xie et al., 2016). L'ensemble de ces acylations neutralise la charge positive des résidus lysine, perturbant ainsi les interactions histones-ADN (Flynn et al., 2015; Zhang et al., 2009).

Ces nouvelles modifications consistent en l'addition de groupements bien plus encombrants que le groupement acetyl. Elles peuvent être divisées en trois groupes selon les différences de structure des groupements chimiques (Figure 11) :

- Les groupements acyl hydrophobes (Kac, Kpr, Kbu, Kcr) : l'addition de ces modifications augmentent l'hydrophobicité.
- Les groupements acyl polaires (Khib, Kbhb) : la présence d'un groupe hydroxyl permet d'établir des liaisons hydrogènes.
- Les groupements acyl acides (Ksu, Kma, Kglu) : Ce groupement confère une charge négative à la lysine modifiée.

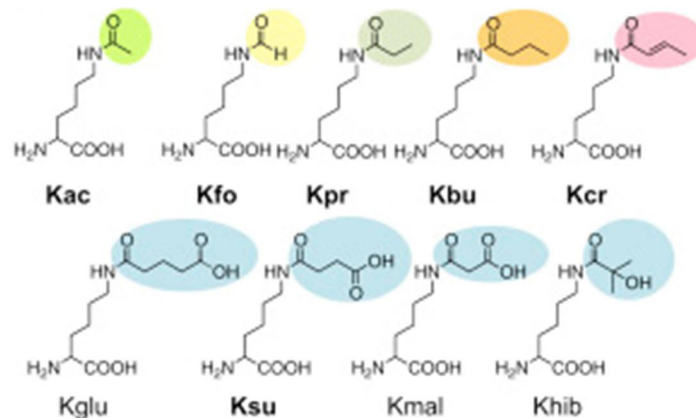


Figure 11 : Structure chimique des acylations des résidus lysine (Flynn et al., 2015).

Le rôle de certaines de ces nouvelles acylations sera abordé plus en détail dans la partie qui suit.

3.6.1 - La crotonylation

Des études récentes ont montré que les résidus lysine crotonylés sont enrichis au niveau des TSS des gènes actifs et que la crotonylation active la transcription plus intensément que l'acétylation. Cette marque est déposée grâce à l'activité de l'acétyltransférase de p300 qui alterne entre l'acétylation et la crotonylation des résidus lysine selon la disponibilité des substrats acetyl-CoA ou crotonyl-CoA. Les résidus lysine crotonylés vont être détectés par des protéines comportant des domaines YEATS (Yaf9, ENL, AF9, Taf14, Sas5) (Andrews et al., 2016; Bao et al., 2014; Li et al., 2016; Sabari et al., 2015; Tan et al., 2011; Zhang et al., 2016).

3.6.2 - La 2-hydroxyisobutyrylation

La modification de type Khib a une masse moléculaire bien supérieure à celles de type Kac, Kcr ou Kme. Cette MPT n'est pas limitée aux domaines de l'extrémité N-terminale. Elle est aussi détectée dans certaines régions du cœur des histones. Cette modification pourrait donc jouer un rôle particulier dans la régulation des interactions inter ou intra-nucléosomiques. Il a été démontré que les gènes associés à cette nouvelle modification d'histone ont des niveaux d'expression élevés (Dai et al., 2014).

3.6.3 - La butyrylation

CBP et p300 ont été identifiées comme enzymes catalysant la butyrylation des histones (Chen et al., 2007). Cette modification est détectée par les protéines à bromodomaines, BRD9, CECR2, TAF9 (Flynn et al., 2015).

3.6.4 - La β -hydroxybutyrylation

Des analyses récentes ont montré que Kbh est associé au niveau des promoteurs et que la marque H3K9bh est fortement enrichie au niveau des TSS des gènes actifs (Xie et al., 2016).

3.6.5 - La succinylation, la glutarylation et la malonylation

Les résidus lysine modifiés par l'ajout de ces 3 différents groupements acquièrent une charge négative. Ainsi, ces résidus chargés négativement perdent leur interaction avec d'autres molécules étant elles aussi chargées négativement (Zhang et al., 2011). SIRT 5 de la famille des sirtuines régulerait le retrait de ces trois groupements (Park et al., 2013). A ce jour, aucun module reconnaissant ces MPTs a été décrit dans la littérature.

3.6.6 - La Propionylation

Le propionyl-CoA a une structure similaire à l'acetyl-CoA avec un groupement CH₂ supplémentaire. Tout comme l'acétylation, la propionylation neutralise la charge positive des résidus lysine. Cette modification est détectée par les protéines possédant des bromodomaines (Flynn et al., 2015; Kebede et al., 2017). Il a récemment été montré que les résidus H4K14 propionylés sont enrichis au niveau des promoteurs des gènes actifs (Kebede et al., 2017).

4- Les variants d'histones

Les histones canoniques peuvent exister sous forme de variants avec des degrés variables d'homologie de séquences. Ces variations de séquences vont induire des modifications au niveau des interactions intra- ou inter- nucléosomales. En effet, les nucléosomes contenant des variants peuvent acquérir des propriétés structurales et fonctionnelles différentes de celles du nucléosome conventionnel. L'incorporation de ces variants d'histones est un autre moyen de moduler le message épigénétique.

Les caractéristiques et l'organisation des gènes codants pour les variants d'histones diffèrent de celles des histones canoniques. Les gènes codants pour les histones canoniques sont généralement présents en multiples copies dans le génome et sont organisés en « clusters » (Marzluff et al., 2002). Ils présentent des caractéristiques atypiques puisqu'ils sont dépourvus d'introns et leur ARNm possède une terminaison présentant une structure « tige boucle » au lieu d'être poly-adenylé. Les gènes codants pour les variants d'histones sont quant à eux présents en une ou deux copies et sont dispersés dans tout le génome. Ils peuvent contenir un ou plusieurs introns ainsi qu'un signal de poly-adenylation au niveau de leur ARNm.

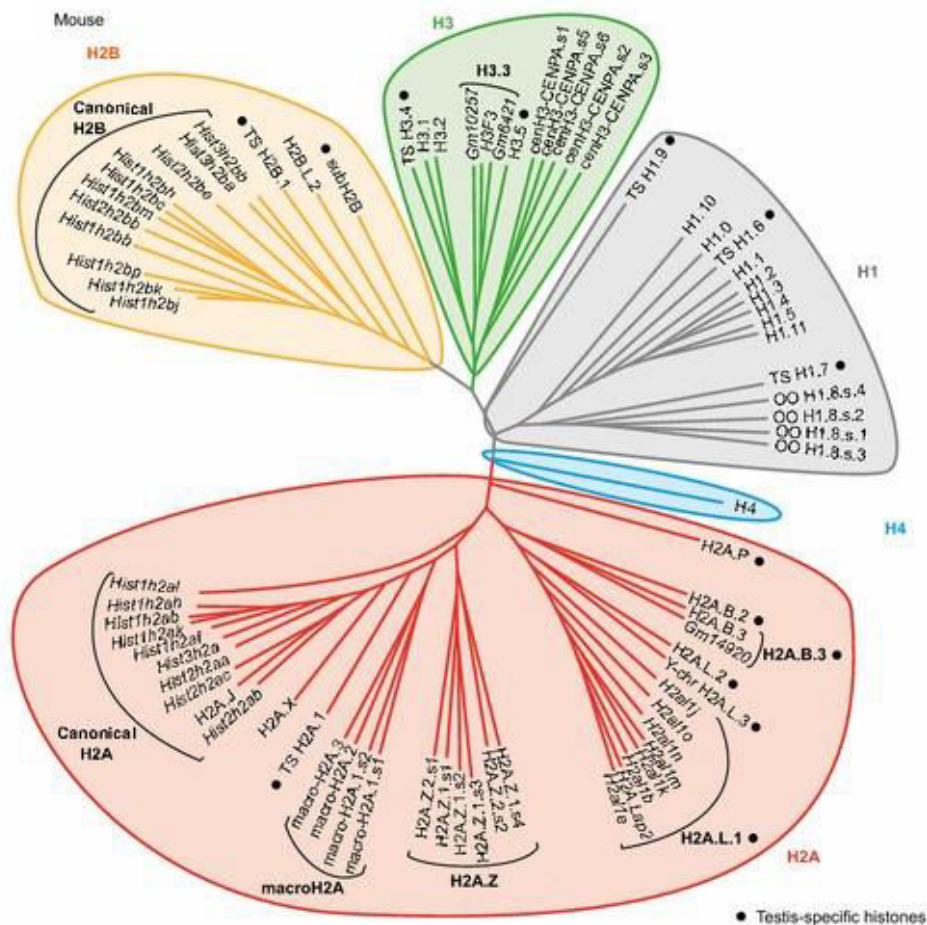


Figure 12 : Les différents variants d'histones chez la souris (El Kennani et al., 2017).

Aujourd'hui, chez les mammifères, une vingtaine de variants d'histones sont connus. Ces variants sont incorporés à la chromatine de manière plus ponctuelle que les histones canoniques, certains ont une spécificité soit à un territoire chromosomique (centromère), soit à un chromosome en particulier (chromosomes sexuels), soit à des régions du génome (promoteurs). Plusieurs variants ont une expression ubiquitaire et sont donc présents dans tous les types cellulaires et d'autres possèdent une expression restreinte à un tissu ou à un type cellulaire, c'est notamment le cas de variants ayant une expression restreinte aux cellules germinales mâles (voir paragraphe V-2). Les histones canoniques H2A, H2B, H3 et H1 possèdent un grand nombre de variants, tandis que H4 n'en possède pas (Figure 12).

Les caractéristiques des variants à expression ubiquitaire et leur rôle au niveau d'événements cellulaires importants tels que la réplication, la transcription ou la réparation des cassures doubles brins va être développé ci-dessous.

4.1 - Les variants de l'histone de liaison H1

10 isoformes de H1 ont été découverts: H1.1 à H1.5, H1°, H1T, H1T2, H1LS, H1oo. Les séquences varient principalement dans les régions N- et C-terminales, alors que la région globulaire centrale est la plus conservée (Khochbin, 2001). Des expériences d'inactivation de gènes ont été réalisées mais l'absence de ces variants d'histones ne modifie en rien les grandes fonctions cellulaires. Ces variants agissent probablement au niveau de l'organisation et de la structuration globale de la chromatine (Hergeth and Schneider, 2015; Izzo et al., 2008; Khochbin, 2001). Des travaux ont montré que les variants H1.2 à H1.5 sont absents des régions denses en CpG et des régions régulatrices actives contrairement à H1.1 lui suggérant une fonction unique dans l'organisation tridimensionnelle du génome. Ces différents variants peuvent donc marquer des domaines spécifiques et des régions répressives (Izzo et al., 2013)

4.2 - Les variants de l'histone H2A

Les variants de H2A sont très divergents au niveau de leur homologie de séquences avec le H2A canonique (Bonisch and Hake, 2012).

Seuls les variants H2A.Z, H2A.X et macroH2A seront détaillés dans ce paragraphe.

4.2.1 - H2A.Z : régulateur de la transcription

Le variant H2A.Z présente 60% d'homologie avec H2A. La structure des nucléosomes contenant H2A.Z a été résolue et montre que H2A.Z remplacerait les deux molécules H2A d'un nucléosome et déstabiliserait l'interaction entre le dimère H2A.Z-H2B et le tétramère H3-H4 (Suto et al., 2000).

H2A.Z est souvent associé aux nucléosomes positionnés au niveau des régions promotrices des gènes, plus particulièrement autour du site d'initiation de la transcription (TSS). Il favoriserait donc une activation de la transcription. Une étude a montré que H2A.Z empêche le maintien d'un état répressif de la chromatine (Billon and Cote, 2013; Guillemette and Gaudreau, 2006; Nekrasov et al., 2013; Soboleva et al., 2011).

4.2.2 - H2A.X : maintien de l'intégrité du génome

Le variant H2A.X est conservé chez l'ensemble du règne animal (Malik and Henikoff, 2003). H2A.X possède 20 acides aminés de plus à son extrémité carboxy-terminale par rapport à l'histone canonique H2A, dont un motif très conservé SQE contenant une sérine phosphorylable en position 39. La fonction de ce variant est dépendante de la phosphorylation de cette sérine (Li et al., 2005a). Le variant H2A.X joue un rôle important dans le maintien de la stabilité du génome de par son implication dans la réparation des cassures doubles brins. En effet, H2A.X serait phosphorylé (γ H2A.X) au niveau du site de cassure de l'ADN, ce qui permettrait le recrutement de facteurs de réparation (Biterge and Schneider, 2014; Lukas et al., 2011; Yuan et al., 2010). Trois kinases de la famille des PI3 kinases peuvent phosphoryler H2A.X : ATM, DNA-PK et ATR (Stiff et al., 2004).

4.2.3 - MacroH2A : répresseur de la transcription

MacroH2A est un variant de H2A de 42 kDa soit trois fois la taille de l'histone canonique H2A. Sa particularité est de posséder un large domaine carboxy-terminal (20 kD) appelé domaine macro (Pehrson and Fried, 1992). Il existe deux isoformes homologues entre elles à 80% : macroH2A1 et macroH2A2 (Chadwick et al., 2001; Costanzi and Pehrson, 2001). L'ARNm issu du gène *macroH2A1* subit un épissage alternatif produisant deux isoformes protéiques macroH2A1.1 et macroH2A1.2, exprimées spécifiquement dans certains tissus (Chadwick et al., 2001).

Le variant macroH2A a été retrouvé enrichi au sein du chromosome X inactif chez les mammifères femelles et il a été finalement associé à une forte répression de la transcription (Costanzi and Pehrson, 1998, 2001). En effet, des travaux ont montré que lorsque macroH2A était incorporé dans le nucléosome, il empêche les facteurs de transcription et les facteurs de remodelage d'interagir (Biterge and Schneider, 2014; Gamble and Kraus, 2010).

4.3 - Les variants de l'histone H3

Les divers variants de l'histone H3 ont la particularité d'être très proches de leur homologue canonique et parfois seuls quelques acides aminés diffèrent. Pourtant ces différences même minimales ont des conséquences fonctionnelles importantes.

4.3.1 - CENP-A : Structuration des centromères

Le variant CENP-A possède 60% d'homologie avec le H3 canonique au niveau de son domaine globulaire, par contre ils divergent fortement dans son extrémité N-terminale. Ce variant a été défini comme un des piliers de la construction des centromères. Son incorporation au niveau des nucléosomes centromériques est indispensable pour le recrutement des composants du kinétochore. CENP-A est donc nécessaire au bon déroulement des divisions cellulaires lors de la ségrégation chromosomique (Blower and Karpen, 2001). Des expériences d'inactivation de ce gène chez plusieurs espèces ont montré que l'absence de CENP-A est létale et qu'il est donc essentiel à la survie cellulaire (Verdaasdonk and Bloom, 2011).

4.3.2 - H3.3 : Activateur de la transcription

Le variant d'histone H3.3 est codé par deux gènes, *H3.3a* et *H3.3b*. Ce variant diffère de l'histone canonique H3 seulement par 5 acides aminés. Cette différence de 5 résidus est suffisante pour que le variant H3.3 soit chaperonné par une protéine spécifique HIRA. Cette chaperonne va favoriser l'incorporation de H3.3 au niveau des régions transcriptionnellement actives. Ce variant est également enrichi en MPTs spécifiques à une transcription active avec une acétylation et une diméthylation de H3K56 et H3K79 respectivement. De plus, l'incorporation de H3.3 à la chromatine déstabilise les interactions nucléosomales. Paradoxalement, des travaux plus récents ont permis de localiser H3.3 au niveau des centromères et des télomères (Szenker et al., 2011). L'inactivation du gène codant pour H3.3 chez les souris mène à un retard de développement et une létalité embryonnaire précoce. Le variant H3.3 joue donc un rôle essentiel dans le développement. L'inactivation de H3.3 par une approche génétique cause un défaut au niveau des télomères, des centromères et des régions péri-centromériques induisant des défauts mitotiques (Jang et al., 2015).

III- Dynamique de la chromatine

La structure de la chromatine, organisée par les protéines histones, permet de contrôler l'accès à plusieurs enzymes et facteurs nécessaires à divers processus cellulaires tels que la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. L'ensemble de ces événements indispensables à la vie cellulaire implique une réorganisation très dynamique de la chromatine, où les nucléosomes ont besoin d'être modifiés, enlevés ou déplacés. Cette réorganisation nécessite donc la présence de facteurs responsables de l'assemblage et de la dissociation des histones au sein de la chromatine.

1 - Les chaperonnes d'histones

Les histones qui sont des protéines très basiques peuvent être neutralisées grâce à leur association à des protéines spécifiques acides que sont les chaperonnes. Cette neutralisation permet d'éviter des interactions non spécifiques des histones avec d'autres protéines ou encore la formation d'agrégats. Les chaperonnes participent à l'éviction ou à l'incorporation des histones à des endroits précis dans la chromatine, elles guident ainsi les processus d'assemblage et de désassemblage des nucléosomes de manière séquentielle. Certaines chaperonnes vont d'abord déposer les dimères H3/H4 sur l'ADN pour former un tétrasome puis d'autres chaperonnes vont incorporer deux dimères H2A/H2B pour aboutir à la formation de nucléosomes. Cet assemblage est réversible (Figure 13).

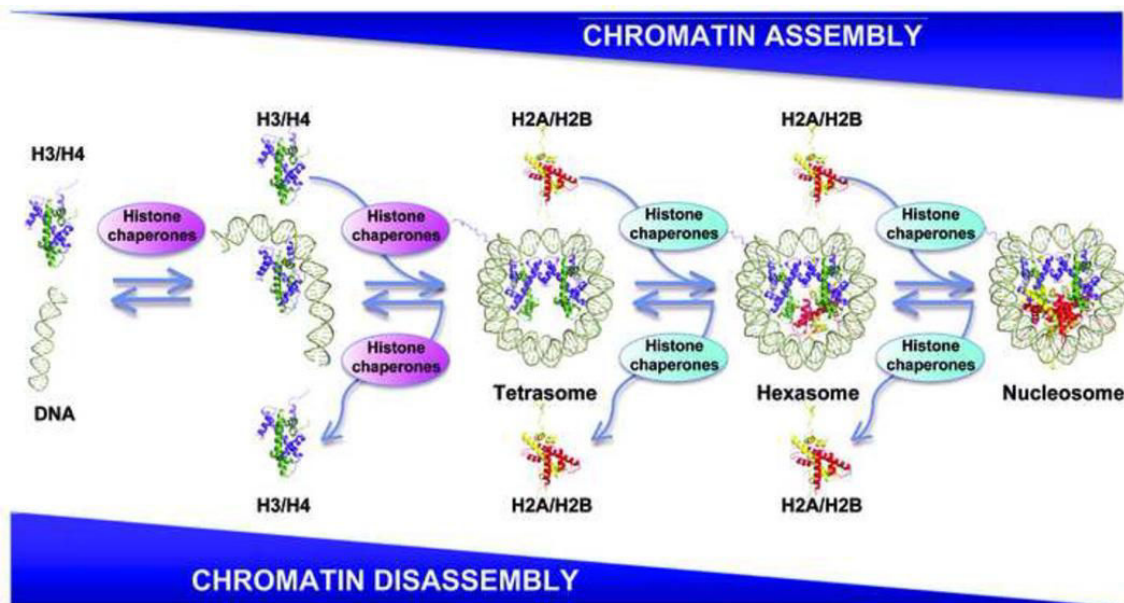


Figure 13 : Assemblage et désassemblage de la chromatine par les chaperonnes (Das et al., 2010).

Les chaperonnes fonctionnent de manière dépendante ou indépendante à la synthèse de l'ADN, on parle de chaperonnes à réplication-dépendante ou à réplication-indépendante.

En plus de leur spécificité d'action, les chaperonnes possèdent également une spécificité d'association aux histones. Certaines chaperonnes présentent une spécificité soit pour les dimères H2A/H2B, soit pour les dimères H3/H4. D'autres chaperonnes vont s'associer spécifiquement à des variants d'histones.

Dans cette partie seront détaillées les fonctions et les spécificités uniquement de certaines chaperonnes car il en existe un grand nombre (Tableau 1).

Histone chaperone	Histone cargo	Function during nucleosome assembly
Anti-silencing factor 1 (Asf1)	H3-H4	Histone import; histone transfer to CAF-1 and HIRA; regulation of H3K56ac
Chromatin assembly factor 1 (CAF-1)	H3.1-H4	H3.1-H4 deposition, (H3-H4) ₂ formation
Death domain-associated protein (Daxx)	H3.3-H4	H3.3-H4 deposition at telomeric heterochromatin
DEK	H3.3-H4	Regulation of H3.3-H4 incorporation and maintenance of heterochromatin
Histone cell cycle regulation defective homolog A (HIRA)	H3.3-H4	Deposition of H3.3-H4 at genic regions
Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	H3-H4	Histone supply and turn over
Regulator of Ty transposition (Rtt106)	H3-H4	Formation and deposition of (H3-H4) ₂ tetramer
Holliday junction recognition Protein (HJURP)	CENP-A-H4	Regulation of incorporation of the H3 variant CENP-A
Facilitates chromatin transcription (FACT)	H3-H4 H2A-H2B H2A.X-H2B	Deposition and exchange of H3-H4, H2A-H2B, H2A.X-H2B
Nucleosome assembly 1 (Nap1)	H3-H4 and H2A-H2B	H2A-H2B nuclear import and deposition
Chz1	H2A.Z-H2B	H2A.Z-H2B deposition
Aprataxin-PNK-like factor (APLF)	Core histones and MacroH2A.1-H2B	Regulates MacroH2A.1 incorporation during DNA damage

Tableau 1 : Les chaperonnes d'histones et leur fonction dans l'assemblage des nucléosomes (Burgess and Zhang, 2013).

1.1 - Stockage et transport des histones

En prévention de leur agrégation et avant leur incorporation à la chromatine, les histones sont prises en charge dans le cytoplasme par des chaperonnes qui vont avoir un rôle de stockage des histones, c'est le cas de la nucléoplasmine Npm2 (Krogan et al., 2003).

D'autres chaperonnes vont être impliquées dans le transfert des histones du cytoplasme au noyau comme la chaperonne Nap1 (Nucleosome assembly protein) (Mosammamaparast et al., 2002).

La chaperonne NASP agit quant à elle en tant que réservoir d'histones afin de maintenir constamment un stock d'histones solubles disponible pour la cellule (Cook et al., 2011).

1.2 - Réplication

Il existe de nombreuses chaperonnes d'histones qui sont impliquées dans le processus de réplication. Elles vont être responsables de l'enlèvement des histones avant le passage de la fourche de réplication puis du dépôt des histones sur le brin nouvellement synthétisé.

Les chaperonnes ASF1, CAF1 (Chromatin assembly factor 1) et NASP exercent ces fonctions pour les histones H3/H4 alors que NAP1 chaperonne les histones H2A/H2B (Alekseev et al., 2005; Okada et al., 2007; Richardson et al., 2000).

1.3 - Transcription

Le processus de transcription par l'ARN polymérase II qui implique l'éviction locale des histones de cœur est contrôlé par des chaperonnes dites à réplication-indépendante qui vont permettre le passage de la machinerie transcriptionnelle. Ces chaperonnes vont ensuite redéposer les histones enlevées en reconstituant les nucléosomes après le passage du complexe de transcription.

NAP1 ainsi que le complexe FACT (Facilitates Chromatin Transcription) joueraient ce rôle au niveau des dimères H2A/H2B (Levchenko et al., 2005).

1.4 - Spécificité pour les histones variants

Certaines chaperonnes interagissent spécifiquement avec des couples contenant des variants d'histones. C'est notamment le cas de la chaperonne CAF-1 qui interagit avec H3.1 au niveau des sites de réplication. ChZ1 chaperonne le couple H2A.Z/H2B (Luk et al., 2007) et HJURP s'associe à CENP-A/H4 (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009). Les chaperonnes DAXX et HIRA vont quant à elles se lier à H3.3/H4 afin de cibler l'hétérochromatine ou l'euchromatine respectivement (Drane et al., 2010; Fromental-Ramain et al., 2017; Tagami et al., 2004).

En ce qui concerne les chaperonnes spécifiques aux variants d'histones présents dans la lignée germinale mâle, peu de choses sont connues. Au cours de la spermatogénèse, la chaperonne tNASP est impliquée dans la liaison du variant H1t alors que la chaperonne NAP1L4 interagit préférentiellement avec le variant d'histone H3t (Alekseev et al., 2005; Tachiwana et al., 2008).

2 - Les enzymes de modification

Les enzymes de modification qui catalysent l'ajout et l'enlèvement des MPTs de la chromatine font aussi partie des facteurs qui modulent la dynamique de la chromatine. Ces enzymes ont déjà été décrites précédemment dans les paragraphes II-1 et II-3.

3 - Les facteurs de remodelage ATP-dépendant

La forte compaction de la chromatine et son organisation en nucléosomes sont finalement un inconvénient au niveau de l'accessibilité des régions régulatrices de l'ADN. Pour rendre accessibles ces régions et réguler correctement les différents processus cellulaires que sont la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN, la présence de protéines de remodelage de la chromatine est nécessaire. Ces facteurs de remodelage se présentent sous forme de complexes multi-protéiques et ont besoin d'énergie pour pouvoir modifier la structure et la localisation des nucléosomes. Cette énergie est fournie par la sous-unité catalytique ATPase de ces facteurs permettant l'hydrolyse de l'ATP. Cette énergie permet un remaniement des nucléosomes en perturbant les interactions ADN/histones (Narlikar et al., 2013).

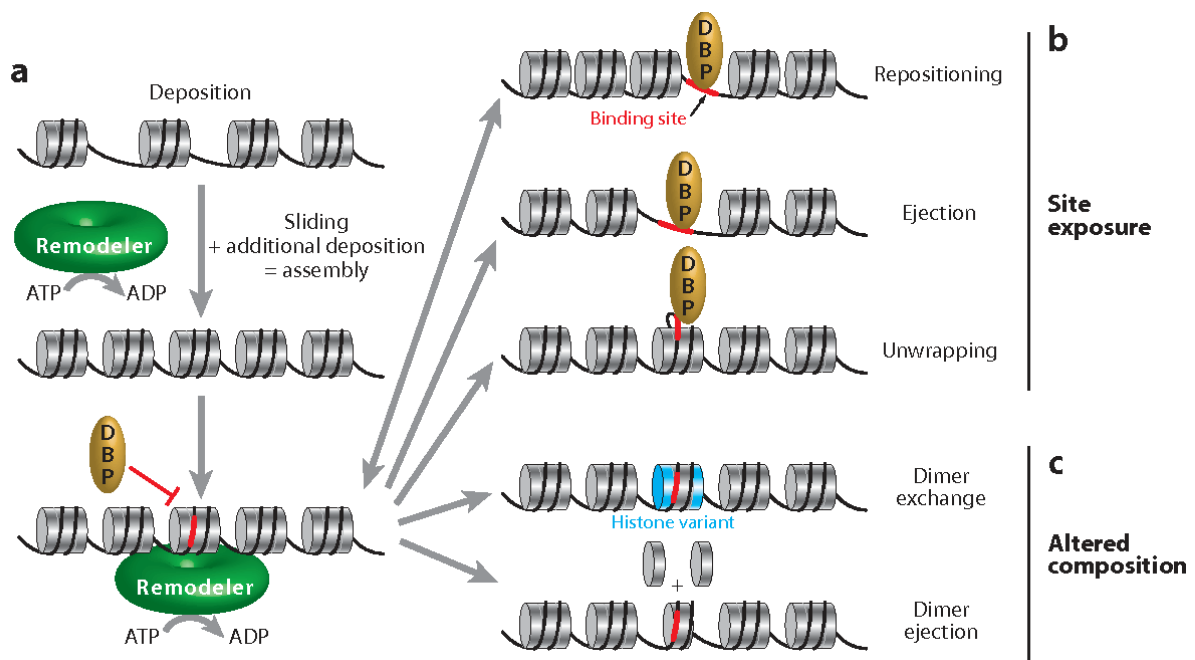


Figure 14 : Différentes actions des facteurs de remodelage sur les nucléosomes (Clapier and Cairns, 2009).

L'ensemble de ces facteurs de remodelage vont mobiliser les nucléosomes le long de la fibre de chromatine et ce de différentes manières. Ils permettent tout d'abord un glissement des nucléosomes sur l'ADN afin de garder un espacement constant entre eux après l'assemblage des histones par les chaperonnes (Figure 14a). Ils peuvent également rendre une séquence régulatrice accessible aux protéines DBP (DNA Binding Protein) en exposant un site d'ADN soit en déplaçant le nucléosome, soit en éjectant le nucléosome ou encore en déroulant partiellement le nucléosome (Figure 14b). Enfin, les facteurs de remodelage peuvent également modifier la composition du nucléosome en éjectant des dimères ou en les remplaçant par des dimères contenant des variants d'histones (Figure 14c) (Clapier and Cairns, 2009).

Ces facteurs de remodelage ont été classés en 4 familles (Figure 15) :

- La famille SWI/SNF interagit avec la chromatine à travers le bromodomaine qui cible les résidus lysine acétylés. Ces facteurs désorganisent l'espacement des nucléosomes et rendent des régions d'ADN accessibles aux facteurs d'initiation à la transcription (Hassan et al., 2002).
- La famille ISWI se lie aux extrémités N-terminales des histones et à l'ADN extérieur au nucléosome à travers les domaines SANT et SLIDE. Ces facteurs sont nécessaires pour un assemblage correct de la chromatine au moment de la réplication (Poot et al., 2004).
- La famille CHD contient un chromodomaine qui interagit spécifiquement avec les résidus lysine méthylés. Ces facteurs sont généralement associés à une répression de la transcription (Kehle et al., 1998).
- La famille INO80 intervient lors de la réparation de l'ADN en interagissant avec l'histone H2AX phosphorylée au niveau des cassures double brins (Tsukuda et al., 2005).

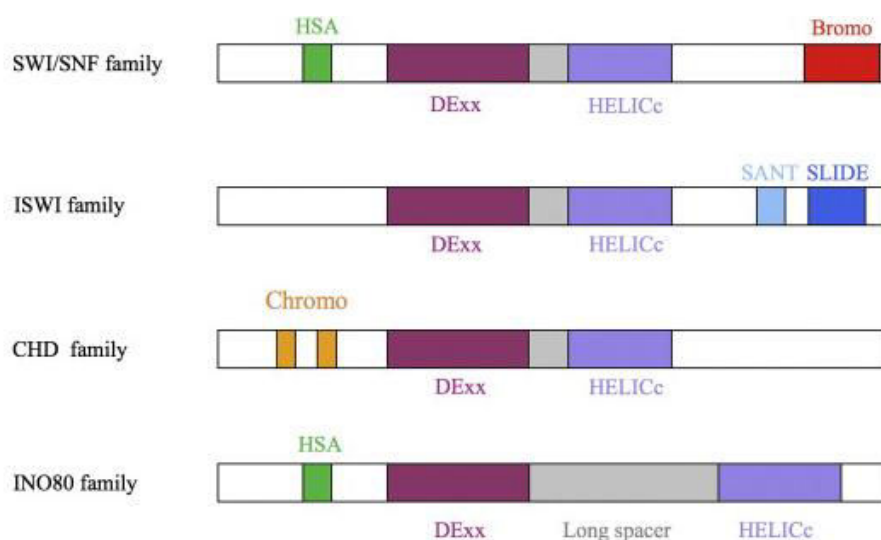


Figure 15 : Les différentes familles de facteurs de remodelage de la chromatine (Burgio et al., 2010).

4 - Les protéines de liaison à la chromatine

Le message codé par l'ensemble des modifications sur l'ADN et sur les histones doit être déchiffré afin que la cellule puisse répondre à ces messages. Il existe des lecteurs de ce code qui sont des protéines composées de domaines capables de lire les différentes modifications sur la chromatine. Chacun de ces domaines va avoir une forte spécificité pour un ou plusieurs résidus modifiés. Ces lecteurs vont agir soit directement, soit indirectement en recrutant d'autres acteurs afin de répondre au message épigénétique. En effet ces protéines de liaison à la chromatine peuvent altérer la structure de la chromatine et permettre le recrutement de polymérase, de complexes de remodelage, d'enzymes de modification...

4.1 - Les facteurs de liaison à l'ADN modifié

La méthylation de l'ADN permet aussi le recrutement des protéines liant l'ADN méthylé, les MBP (Methyl CpG Binding Proteins). Elles sont regroupées en trois familles et sont capables de reconnaître les îlots CpG méthylés grâce soit à un domaine spécifique appelé MBD (Methyl CpG Binding Domain), soit à leur doigts de zinc ou encore grâce à un domaine SRA (SET and RING finger-associated) (Sansom et al., 2007). Certaines fonctions biologiques des MBP ont été largement décrites, notamment la répression de la transcription mais d'autres ne sont encore pas clairement élucidées (Fournier et al., 2012; Sasai and Defossez, 2009).

4.2 - Les facteurs de liaison aux histones modifiées

Les MPTs des histones sont lues par des protéines ayant des modules de liaison spécifiques (Tableau 2). Les domaines les mieux caractérisés sont les bromodomains qui reconnaissent les résidus acétylés et les chromodomains qui interagissent quant à eux avec les résidus méthylés.

4.2.1 - Les bromodomains

Les protéines possédant des bromodomains peuvent être des HAT ou des activateurs de transcription. Certaines protéines comportent deux bromodomains et peuvent donc interagir avec plusieurs résidus acétylés proches. Par exemple, le premier bromodomaine de la protéine Brdt interagit spécifiquement avec la double modification H4K5ac/H4K8ac (Gaucher et al., 2012; Moriniere et al., 2009).

4.2.2 - Les chromodomains

Les résidus méthylés interagissent avec de nombreuses protéines contenant des chromodomains, des domaines PHD (Plant Homology Domains) ainsi que des domaines Tudor (Musselman et al., 2012; Taverna et al., 2007). On peut citer comme exemple la protéine à chromodomaine HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui se lie au résidu H3K9me3 et la protéine polycomb qui reconnaît spécifiquement H3K27me3 (Cao et al., 2002; Maison and Almouzni, 2004).

Reader module		PTM mark
Bromodomain		Many histone Kac, (Kac)
R o y a l	Chromodomain	H3K9me2/3, H3K27me2/3
	Double chromodomain	H3K4me1/2/3
	Chromo barrel	H3K36me2/3
	Tudor	(Rme2s)
	Double/tandem tudor	H3K4me3, H4K20me3 H4K20me1/2, (Kme2)
	MBT	H4K20me1/2, H1K26me1/2 H3K4me1, H3K9me1/2
PHD finger		H3K4me3, H3K4me0 H3K9me3, H3K36me3
WD40 repeat		H3R2/K4me2, (R, Sph, Tph)
14-3-3		H3S10ph, H3S28ph, (Sph, Tph)
BRCT		H2AX-S139ph, (Sph, Tph)

Tableau 2 : Tableau illustrant quelques exemples des différents modules de liaison à la chromatine.

IV- Spermatogénèse chez la souris

1 - Structure du testicule

La spermatogénèse est le processus de production des gamètes mâles, elle permet la différenciation de cellules souches diploïdes, les spermatogonies, en cellules haploïdes que sont les spermatozoïdes. Chez les mammifères, ce phénomène se déroule dans le testicule et plus précisément dans les tubes séminifères. Le testicule mature est un organe ovoïde entouré par l'albuginée, une gaine de tissu conjonctif fibreux (Figure 16).

Le parenchyme testiculaire est divisé en plusieurs lobules par des cloisons conjonctives. Au sein de ces lobules, les tubes séminifères sont repliés en une structure hélicoïdale et leurs deux extrémités sont ouvertes dans le *rete testis*. Cette zone collecte les spermatozoïdes qui sont ensuite dirigés vers l'épididyme.

Dans les tubes séminifères sont regroupés l'ensemble des cellules germinales mâles (spermatogonies, spermatocytes primaires et secondaires, spermatides et spermatozoïdes). Toutes ces cellules sont localisées à l'intérieur d'invaginations formées par les cellules de Sertoli, des cellules somatiques de soutien.

Le compartiment interstitiel est très vascularisé, et contient des cellules de Leydig, des cellules mésenchymateuses, des macrophages, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules de Leydig régulent la sécrétion des hormones stéroïdes notamment la testostérone.

Les spermatozoïdes produits dans le testicule vont terminer leur maturation en traversant l'épididyme, un long tube qui connecte le testicule au *vas deferens* (Figure 16). L'épididyme est organisé en 3 parties : la *caput* (la tête), le *corpus* (le corps) et la *cauda* (la queue). Les spermatozoïdes immatures entrent par la *caput* et deviennent matures dans la *cauda*. Ils sont ensuite propulsés dans le *vas deferens* et mélangés à d'autres sécrétions formant ainsi le sperme.

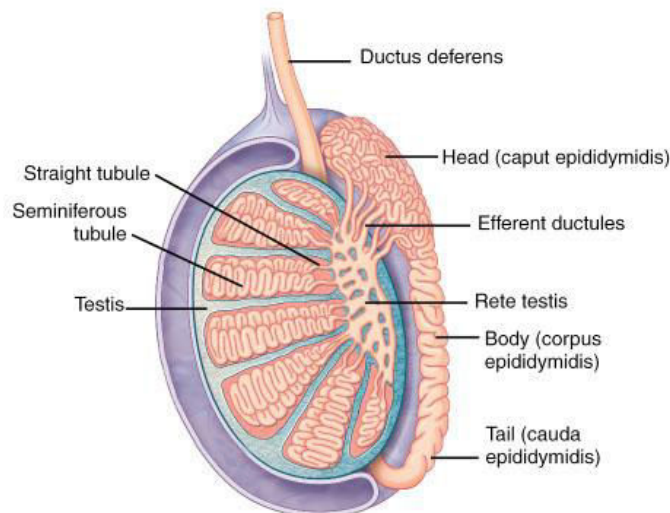


Figure 16 : Schéma représentant la morphologie du testicule et de l'épididyme. Le testicule est divisé en plusieurs lobules contenant des tubes séminifères. L'épididyme est organisé en 3 parties : la *caput*, le *corpus* et la *cauda* et sa terminaison correspond au *vas deferens* (<http://www.bianoti.com/epididymis-vas-deferens.htm>).

2 - Les trois phases de la spermatogénèse

La spermatogénèse se déroule en trois phases majeures (Figure 17).

La phase mitotique dite aussi proliférative est caractérisée par l'amplification des cellules souches germinales.

La phase méiotique au cours de laquelle le brassage du patrimoine génétique se réalise et génère quatre cellules haploïdes.

La dernière phase post-méiotique ou spermiogénèse permet la différenciation terminale des spermatozoïdes.

La spermatogénèse chez la souris dure environ 35 jours avec une durée respective de 11, 10 et 14 jours pour les étapes mitotiques, méiotiques et post-méiotiques. Ces trois étapes sont suivies par la phase de maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme d'une durée de 10 jours.

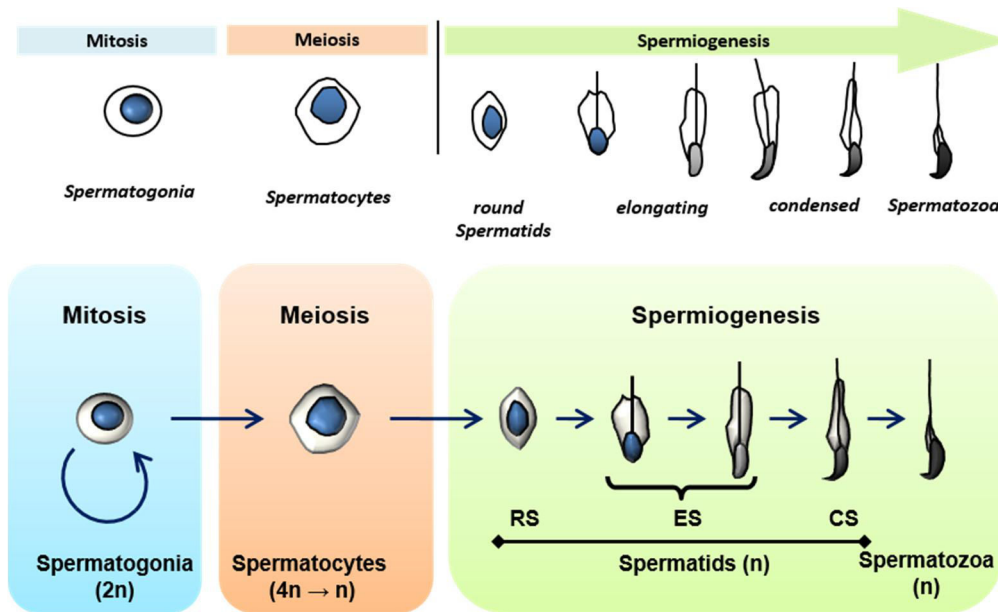


Figure 17 : Les différentes phases de la spermatogénèse.

L'ensemble de ces 3 grandes étapes se déroule de la paroi vers la lumière des tubes séminifères (Figure 18). En effet, la disposition des cellules germinales est très organisée dans l'épithélium séminifère. Quatre à cinq générations de cellules sont disposées en couches superposées. Les spermatogonies qui sont les cellules les moins différenciées sont situées le long de la lame basale et tapissent la paroi externe du tube, alors que les spermatozoïdes qui sont les cellules les plus matures sont disposées en bordure de la lumière du tube. Ainsi le sens de maturation des cellules germinales mâles se fait de la périphérie vers la lumière des tubes séminifères, on parle de migration centripète.

2.1- La phase mitotique

Cette première étape permet l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules souches germinales, appelées spermatogonies. Il existe deux types de spermatogonies qui sont tous les deux localisés à proximité de l'épithélium séminifère. Les spermatogonies de type A assurent par mitose leur renouvellement, puis certaines se différencient en spermatogonies de type B. Les spermatogonies de type B possèdent plusieurs nucléoles et ont une forte activité transcriptionnelle liée à la synthèse des protéines nécessaires pour la phase méiotique suivante. La division des spermatogonies de type B produit les spermatocytes primaires.

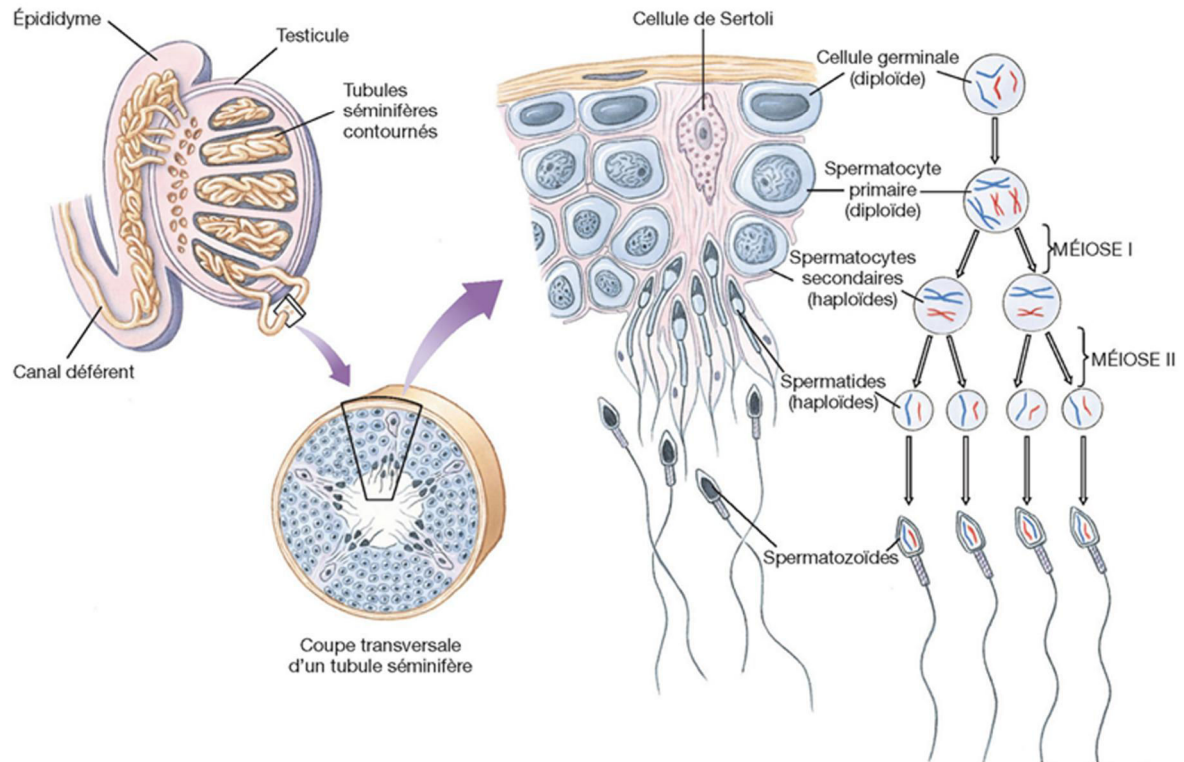


Figure 18 : Le déroulement de la spermatogénèse. Coupe transversale d'un tube séminifère montrant l'organisation en couches des cellules germinales ainsi que la différenciation des spermatocytes en spermatozoïdes.

2.2 - La phase méiotique

La phase méiotique est une étape clé de la reproduction sexuée. Une recombinaison du matériel génétique des spermatocytes primaires produits lors de la phase précédente s'effectue. Elle est suivie de deux divisions nucléaires successives permettant la production de quatre cellules haploïdes (Figure 19).

Cette phase débute par une interphase durant laquelle chaque cellule germinale va doubler son contenu en ADN avant de subir deux divisions méiotiques. Chaque division méiotique se déroule en plusieurs étapes : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la cytotélerèse.

La prophase de la première division méiotique (prophase I) est une étape longue, subdivisée en 5 stades successifs appelés leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse. Juste après la duplication de leur ADN, pendant le stade leptotène, les spermatocytes primaires condensent leurs chromosomes nouvellement dupliqués. Puis, les chromosomes homologues vont se rapprocher grâce à la formation des complexes synaptonémaux au cours du stade

zygotène. Lorsque les chromosomes homologues sont appariés, un échange de fragments de chromosomes par recombinaison homologue est observé avec la formation de chiasmas au stade pachytène. Les complexes synaptonémaux vont disparaître au stade diplotène entraînant la séparation des chromosomes homologues et à la fin de la prophase, pendant le diacinèse, la membrane nucléaire disparaît. Ensuite, durant la métaphase de la première division mitotique, les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale. Les chromosomes homologues de chaque paire se séparent alors et migrent vers un pôle différent durant l'anaphase I. Les deux lots de chromosomes sont séparés lors de la télophase I et les spermatocytes secondaires, deux cellules haploïdes, sont produits. On appelle cette première division méiotique, une division réductionnelle puisqu'elle réduit par deux le nombre de chromosomes par cellule.

La deuxième division méiotique se réalise sans duplication de l'ADN au préalable, il y a donc séparation des chromatides sœurs de chaque chromosome, on parle cette fois de division équationnelle car le stock génétique est conservé. Cette deuxième division donne naissance à de petites cellules rondes, les spermatides qui vont entrer en phase terminale de la spermatogénèse qu'on nomme la spermiogénèse.

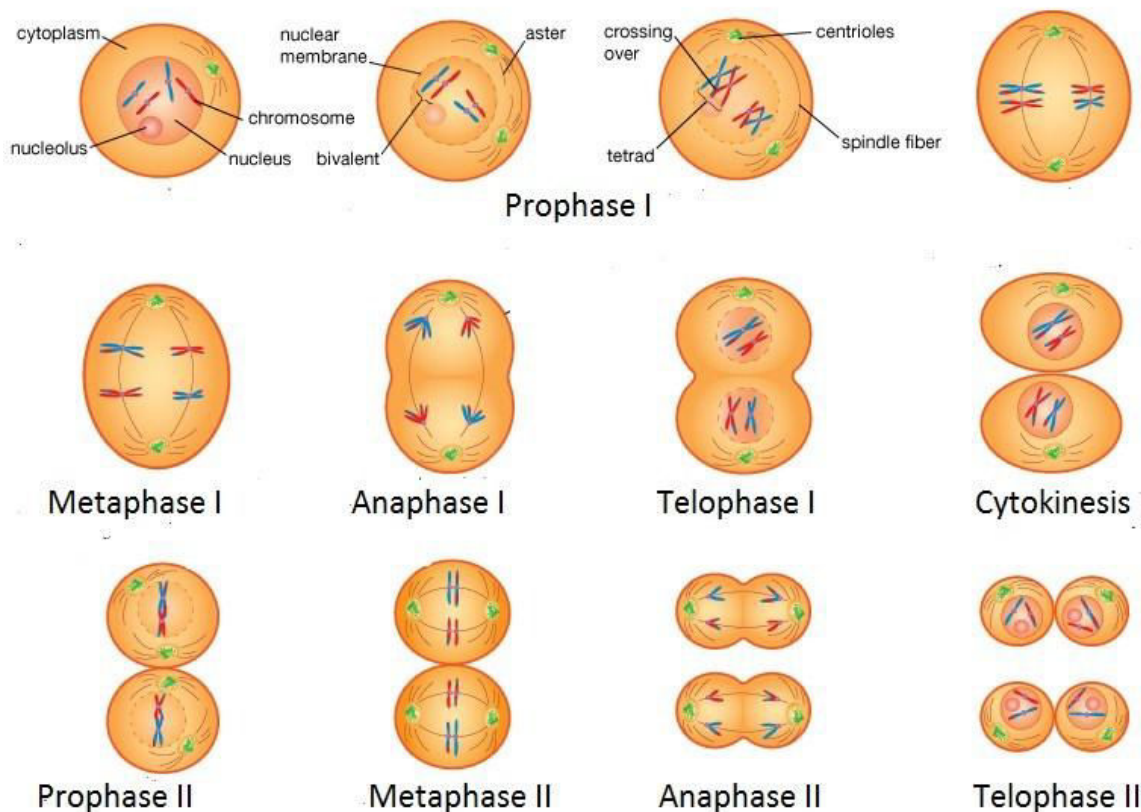


Figure 19 : Déroulement de la méiose au cours de la spermatogénèse.

2.3 - La phase post-méiotique

Cette phase post-méiotique appelée aussi spermiogénèse se caractérise par une métamorphose importante des spermatides rondes haploïdes en spermatozoïdes. Cette différenciation terminale va permettre le déplacement des gamètes mâles dans le tractus génital femelle jusqu'à l'ovocyte afin de le féconder tout en protégeant son patrimoine génétique de cet environnement hostile. En effet, Les spermatides qui sont rondes au départ de cette phase vont s'allonger progressivement puis leur noyau se condense afin d'aboutir à la formation d'un spermatozoïde.

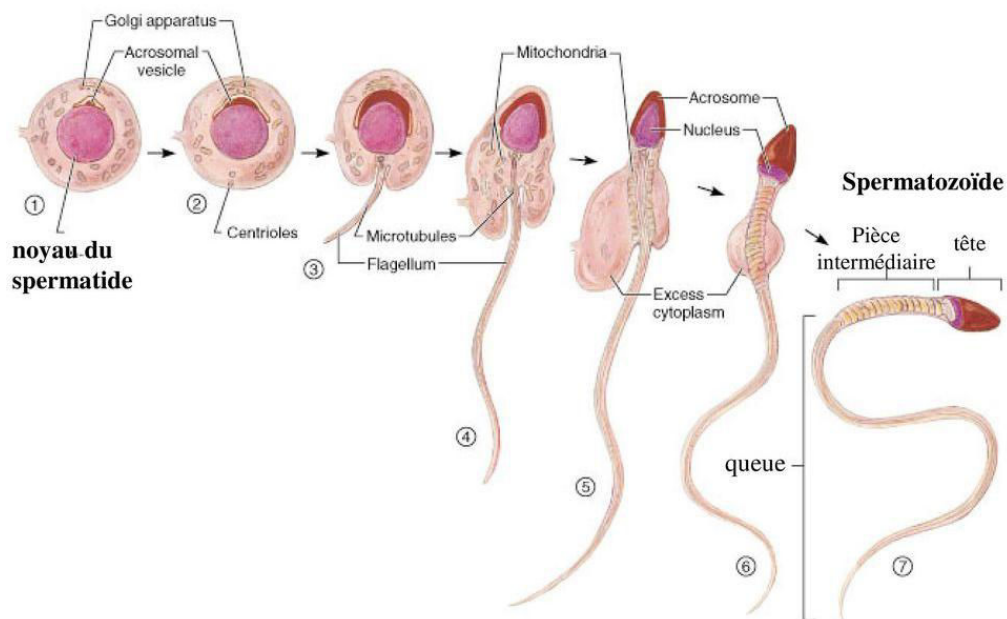


Figure 20 : Déroulement de la spermiogénèse. Maturation des spermatides : condensation du noyau, développement du flagelle et mise en place de l'acrosome.

Trois événements majeurs vont modifier de manière importante la morphologie des spermatides (Figure 20) :

- Les spermatides vont développer un système acrosomial nécessaire au moment de la fécondation pour l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte. Cette vésicule acrosomiale contient de nombreuses enzymes permettant la digestion de la zone pellucide de l'ovocyte. Cette vésicule se forme au niveau du pôle antérieur du noyau grâce à la fusion de plusieurs vésicules issues de l'appareil de Golgi, puis l'acrosome se densifie jusqu'au pôle postérieur du noyau des spermatides condensées. L'évolution de la morphologie de cet acrosome permet de détecter les différents stades de différenciation.

- Les spermatides se dotent d'un flagelle permettant le déplacement du spermatozoïde dans le tractus génitale femelle. Le déplacement des centrioles des spermatides rondes au niveau du pôle postérieur du noyau ainsi que la présence de microtubules permettent la formation de ce flagelle. La région proximale du flagelle contient un grand nombre de mitochondries qui se réorganisent et qui fourniront l'énergie nécessaire au mouvement du flagelle. La maturation du flagelle est accompagnée d'une élimination de l'excès de cytoplasme, évacué sous forme de corps résiduels dans les spermatides condensées tardives.

- Le noyau des spermatides s'allonge et la chromatine se condense en une structure très compacte. Cette condensation se caractérise par une réorganisation complète de la structure de la chromatine. Une transition d'une structure nucléosomale de type somatique vers une structure en nucléoprotamines spécifique des spermatozoïdes s'effectue lors de ce processus. Cette nouvelle structure protège ainsi le génome contre les nombreuses agressions rencontrées dans le tractus femelle.

3 - La maturation des spermatozoïdes

Après être relargués dans la lumière des tubes séminifères, les spermatozoïdes vont acquérir leur maturation finale lors de leur progression dans l'épididyme, ils vont développer leur mobilité ainsi que leur pouvoir fécondant. Durant son passage dans l'épididyme, la chromatine des spermatozoïdes continue à se compacter, le cytoplasme diminue encore de volume et la structure de la membrane plasmique change.

4 - Cycle de la spermatogénèse

La durée de la spermatogénèse chez la souris est de 35 jours avec une durée de 13 jours pour les spermatocytes I, de 1 jour pour les spermatocytes II, et de 13 jours pour les spermatides. Ainsi, dans les premiers jours après la naissance, les tubes séminifères contiennent principalement des spermatogonies. Les spermatocytes vont apparaître chez des souris âgées de 11 à 14 jours et les premières spermatides rondes apparaîtront chez des souris âgées au minimum de 21 jours.

L'entrée en différenciation des spermatogonies (cellules souches) ne se fait pas de manière aléatoire, elles s'engagent périodiquement et de façon irréversible dans le processus de la spermatogénèse à intervalle régulier, tous les 8 jours chez la souris. Des ponts cytoplasmiques relient les cellules entre elles afin de former des groupes qui se différencieront de manière coordonnée. Les spermatocytes et spermatides issues du groupe de spermatogonies, sont-

elles aussi reliées par ces ponts cytoplasmiques. Ainsi, des groupes de cellules germinales qui appartiennent à la même génération vont se différencier en suivant le même rythme.

La spermatogénèse est un processus continu dans le temps à partir de la puberté. Ainsi, à un instant donné, les différentes zones des tubes séminifères du testicule ne sont pas dans le même stade de spermatogénèse, ce qui assure une production continue de spermatozoïdes. Il n'est donc pas possible d'observer tous les stades de la spermatogénèse sur une coupe transversale de tube séminifère, car les cellules vont former des associations cellulaires typiques selon les différentes générations de cellules. La composition de ces associations est constante et correspond à un stade bien spécifique du cycle de la spermatogénèse. Cette observation a ainsi permis de découper la spermatogénèse en 12 stades chez la souris (annotés en chiffres romains) (Figure 21).

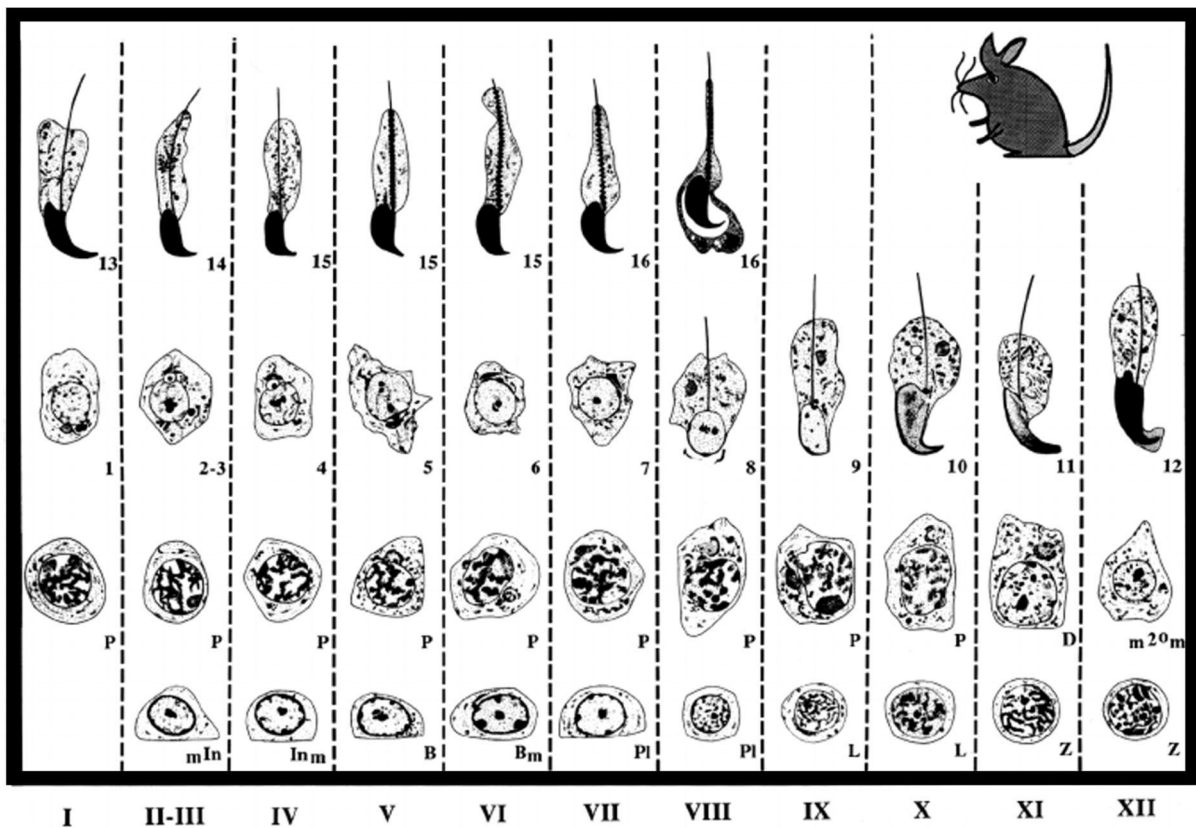


Figure 21 : Les stades de la spermatogénèse chez la souris. L'association de cellules germinales correspond à 12 stades particuliers (Thibault and Levasseur, 2001).

En un point donné du tube séminifère, les stades apparaissent avec le temps et dans un ordre précis : le stade I est situé à côté du stade II, lui-même situé à côté du stade III, ... La succession de tous ces stades correspond au cycle de l'épithélium séminal. On parle d'organisation spatio-temporelle.

Les spermatogonies de type A sont très peu nombreuses et ne sont pas représentées dans le tableau car elles sont réparties dans l'ensemble des stades.

Les spermatogonies intermédiaires (In) se trouvent dans les stades II à IV, puis après différenciation en spermatogonies de type B, elles sont présentes aux stades V à VI. Les spermatocytes pré-leptotènes (Pl), leptotènes (L), zygotènes (Z) et pachytènes (P) sont présents respectivement aux stades VII-VIII, IX-X, X-XII et I-X. On retrouve les spermatocytes diplotènes uniquement au stade XI. Les spermatocytes secondaires (m2om) sont présents au stade XII et après 2 divisions méiotiques successives donnent naissance aux spermatoïdes haploïdes ronds. La spermiogénèse est elle-même découpée en 16 stades (annotés en chiffres arabes). On nomme 1 à 7 les spermatoïdes ronds présentes dans les stades I à VII, 8 à 11 les spermatoïdes allongées des stades VIII à XI et 12 à 16 les spermatoïdes condensées des stades XII à VIII. Comme nous l'avons décrit ci-dessus, la morphologie de l'acrosome permet d'annoter les cellules à ces stades.

V- Réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse

Les cellules germinales mâles subissent une réorganisation drastique de leur chromatine au cours de la phase post-méiotique. Cette réorganisation aboutit à une importante réduction du volume du noyau dans la tête du spermatozoïde qui au final représentera 5% du volume moyen d'un noyau de cellule somatique. Durant cette phase, plus de 95% des histones vont être enlevées et remplacées par de petites protéines basiques. Ce remplacement massif des histones se produit au moment de l'allongement des spermatides par l'incorporation de protéines de transition (TP) puis par des protamines (Prm), aboutissant à une structure chromatinienne finale totalement différente de la structure somatique (Caron et al., 2005). En effet, alors que la chromatine somatique a une structure nucléosomale avec un enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histones, la chromatine du spermatozoïde s'organise sous forme de nucléoprotamines qui s'enroulent en toroïdes compacts. Cette organisation permet une compaction extrême de la chromatine au sein du spermatozoïde (Figure 22).

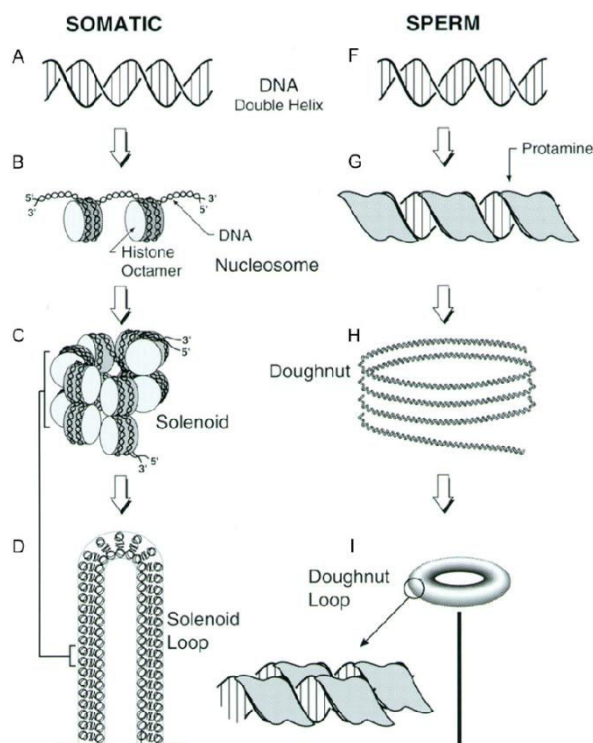


Figure 22 : Structure de la chromatine somatique et de celle du spermatozoïde. La chromatine somatique a une structure nucléosomale alors que la chromatine du spermatozoïde composée de nucléoprotamines forme des toroïdes (site <https://www.semanticscholar.org/paper/Organization-of-sperm-DNA-by-the-nuclear-matrix>).

Ces remaniements chromatiniens sont dus à un ensemble d'évènements qui comprend la présence de nombreuses modifications post-traductionnelles des histones, l'incorporation de variants d'histone ainsi que le remplacement des histones par les TPs et les Prms (Figure 23) (Gaucher et al., 2010; Rathke et al., 2014).

Chacun de ces évènements va être décrit dans cette partie.

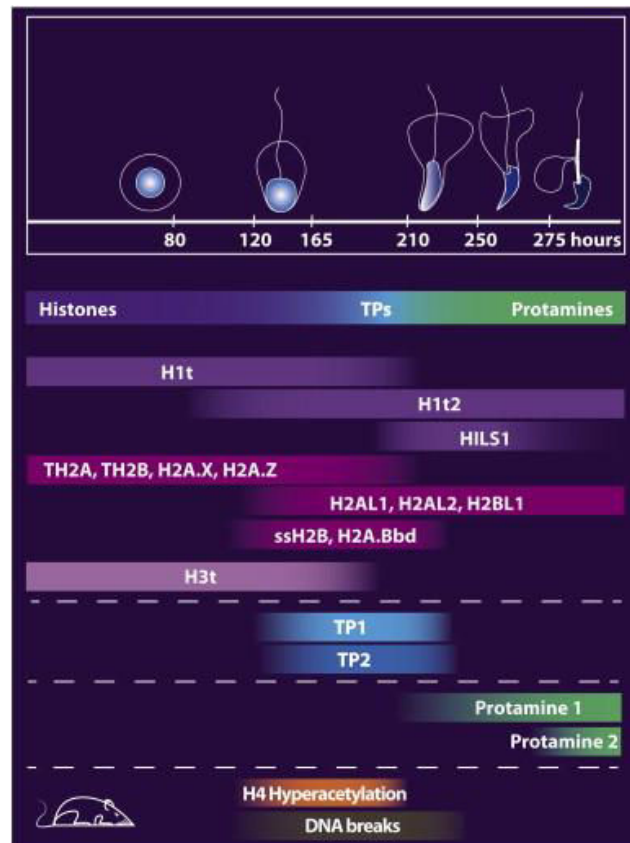


Figure 23 : Représentation schématique de la dynamique d'expression des différents composants de la chromatine qui contribue à la différenciation des spermatides chez la souris (Rathke et al., 2014).

1 - Dynamique des modifications post-traductionnelles des histones

De nombreuses modifications post-traductionnelles des histones ont lieu au cours de la spermatogénèse. Elles joueraient un rôle dans le processus de remplacement des histones.

1.1 - L'acétylation

Deux vagues d'acétylation ont été mises en évidence au cours de la spermatogénèse.

Les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont acétylées dans les spermatogonies et les spermatocytes au stade pré-leptotène. Ceci pourrait correspondre aux histones des régions transcriptionnellement actives. Puis les histones sont globalement déacétylées lors de la méiose et dans les spermatides rondes (Hazzouri et al., 2000; Meistrich et al., 1992).

Ensuite, une acétylation massive des histones à partir des spermatides allongées de stade 8 est observée. De manière paradoxale, cette hyperacétylation se produit dans un contexte transcriptionnellement inactif alors qu'habituellement l'acétylation des histones coïncide avec une forte activité transcriptionnelle. Une dégradation des HDAC de classe I déséquilibrerait la balance HAT/HDAC et donc renforcerait l'action des HAT. Ceci aurait pour conséquence une augmentation de l'acétylation (Caron et al., 2003). Cette vague d'acétylation est détectée dans l'ensemble du noyau des spermatides au début de leur allongement puis disparaît suivant un axe antéropostérieur au cours de la condensation des spermatides, excepté au niveau des zones d'hétérochromatine où certaines marques persistent même jusque dans les spermatozoïdes (Hazzouri et al., 2000). Cette acétylation semble essentielle. En effet, des expériences ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de HDAC, la trichostatine-A est associée à des défauts de la spermatogénèse (Fenic et al., 2004). Le rôle de cette vague d'acétylation est peu connu mais des travaux suggèrent qu'elle pourrait initier la réorganisation de la chromatine du génome mâle et qu'elle serait étroitement liée au remplacement massif des histones en déstabilisant les nucléosomes. En effet, certaines protéines sont considérées comme de bons candidats pour être impliquées dans cette vague d'acétylation. Notamment la HAT MYST4 qui acétyle H4 et est spécifiquement présente dans les spermatides allongées, ainsi que PYGO2, un facteur à domaine PhD exprimé également dans les spermatides allongés et l'acétyltransferase p300 qui acétyle les histones H3 et H4 (Boussouar et al., 2014; McGraw et al., 2007; Nair et al., 2008). Brdt est un facteur à double bromodomaine spécifiquement exprimé durant la spermatogénèse. Il est capable d'interagir avec la chromatine acétylée. Il pourrait ainsi participer à l'enlèvement des histones par un mécanisme encore inconnu puisque la délétion du premier bromodomaine de Brdt cause un défaut d'élongation des spermatides, une stérilité des souris ainsi qu'un manque d'enlèvement des histones (Chang et al., 2007; Gaucher et al., 2012).

1.2 - La méthylation

Certaines méthylations montrent une dynamique spécifique au cours de la spermatogénèse, c'est le cas pour les résidus H3K4 et H3K9. La protéine Meisetz a été identifiée comme une méthyltransferase spécifique de la méiose qui catalyse la méthylation de H3K4.

Les souris déficientes du gène correspondant sont stériles (Hayashi et al., 2005). Les enzymes Suv39h1 et Suv39h2 assurent quant à elles la méthylation de H3K9, une marque de l'hétérochromatine. Suv39h2 est fortement exprimé dans le testicule et est localisée au niveau des régions hétérochromatiques au cours de la méiose et en début de spermiogénèse. La délétion des deux gènes correspondants montre des défauts de spermatogénèse chez les souris mutantes (Peters et al., 2001). De même, l'invalidation de la déméthylase JHDM2A ciblant H3K9me3 génère des mâles stériles (Okada et al., 2007). L'ensemble de ces travaux indique que les résidus méthylés ainsi que les enzymes de modification associées jouent un rôle important pour le bon déroulement de la spermatogénèse.

1.3 - La phosphorylation

Les sérines 10 et 28 de l'histone H3 sont phosphorylées par les kinases Aurora lors de la condensation des chromosomes mitotiques. La phosphorylation d'H3S10 est également détectée au cours de la méiose. Aurora B est particulièrement abondante au sein du testicule et Aurora C est spécifiquement exprimée dans les cellules germinales mâles. L'absence de l'une ou de l'autre de ces kinases provoque des défauts au cours de la spermatogénèse. L'invalidation de *Aurora C* mène à un défaut de compaction de la chromatine des spermatozoïdes. Ceci suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans la réorganisation post-méiotique de la chromatine (Kimmins et al., 2007). Récemment, il a été montré que la kinase mitotique Aurora A est présente dans les spermatides et dans le flagelle du spermatozoïde suggérant un rôle de cette protéine dans la spermatogénèse et la mobilité des spermatozoïdes (Johnson et al., 2018).

La phosphorylation du variant d'histone H2A.X est associée à la réparation des cassures doubles brins de l'ADN lors de la recombinaison homologue. L'invalidation d'*H2AX* ou du gène codant pour ATM entraîne dans les deux cas un arrêt de la spermatogénèse (Barlow et al., 1998; Celeste et al., 2002). ATM serait la kinase qui phosphoryle H2A.X au sein de la chromatine autosomale, alors que la kinase ATR phosphoryle spécifiquement H2A.X au niveau de la vésicule sexuelle des spermatocytes (Bellani et al., 2005). La phosphorylation de H2A.X augmente fortement dans les spermatides allongées. L'hypothèse est que l'ADN qui est sous forme libre et superenroulé au moment du remplacement des histones aurait besoin d'être déroulé et créant ainsi des cassures de l'ADN double brin. La réparation de ces cassures passe par une signalisation faisant intervenir ATM dans la cascade et donc H2A.X phosphorylé en est un marqueur comme c'est le cas lors de la recombinaison homologue au cours de la méiose (Laberge and Boissonneault, 2005; Leduc et al., 2008).

1.4 - L'ubiquitination

Au cours de la spermatogenèse, l'ubiquitination cible principalement H2A et H2B (Jason et al., 2002). Une forte proportion d'H2Aub est détectée au sein de la vésicule sexuelle des spermatocytes (de Napoles et al., 2004; Fang et al., 2004). La forme ubiquitinée de H2A disparaît dans les spermatides rondes, puis réapparaît fortement dans les spermatides allongées (Baarends et al., 1999). HR6 qui est une ubiquitine ligase enrichie dans le testicule, catalyse l'ubiquitination de H2B. L'invalidation de son gène conduit à un arrêt de la spermiogénèse au début de l'élongation des spermatides et entraîne une infertilité des mâles. Chez la souris, l'invalidation du gène *Rnf8* codant pour une ubiquitine ligase qui catalyse l'ubiquitination de H2A a démontré que *Rnf8* régule des modifications épigénétiques actives incluant la diméthylation de H3K4 sur les chromosomes sexuels et échappe à l'activation des gènes à partir des chromosomes sexuels inactifs dans les spermatides post-méiotiques (Sin et al., 2012)

1.5 - Poly-ADP-ribosylation

La régulation de la poly-ADP-ribosylation est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. L'invalidation des gènes codants pour les enzymes PARP1 ou PARP2 engendre la stérilité chez les souris mâles. L'absence de PARP1 entraîne un défaut d'élongation et une mauvaise compaction du noyau des spermatozoïdes (Meyer-Ficca et al., 2009). L'absence de PARP2 induit des défauts méiotiques et post-méiotiques, avec un retard d'élongation et une morphologie anormale des spermatides (Dantzer et al., 2006). PARP1 et PARP2 pourraient donc intervenir dans l'échange des histones et avoir un rôle dans la réorganisation de la chromatine (Meyer-Ficca et al., 2011).

2- Incorporation de variants d'histones

Les rôles des différents variants d'histones spécifiquement exprimés dans le testicule vont être décrits dans ce chapitre. Ces variants sont liés à la programmation du génome mâle mis en place lors de la réorganisation post-méiotique de la chromatine et du processus d'enlèvement des histones

La plupart des variants d'histones exprimés dans les cellules spermatogéniques ont la propriété de remplacer leurs homologues canoniques (Gaucher et al., 2010; Rathke et al., 2014). Les profils d'expression de ces variants d'histones sont très variables. Certains

s'expriment tout au long de la spermatogénèse alors que d'autres s'expriment seulement à certains stades (Figure 24).

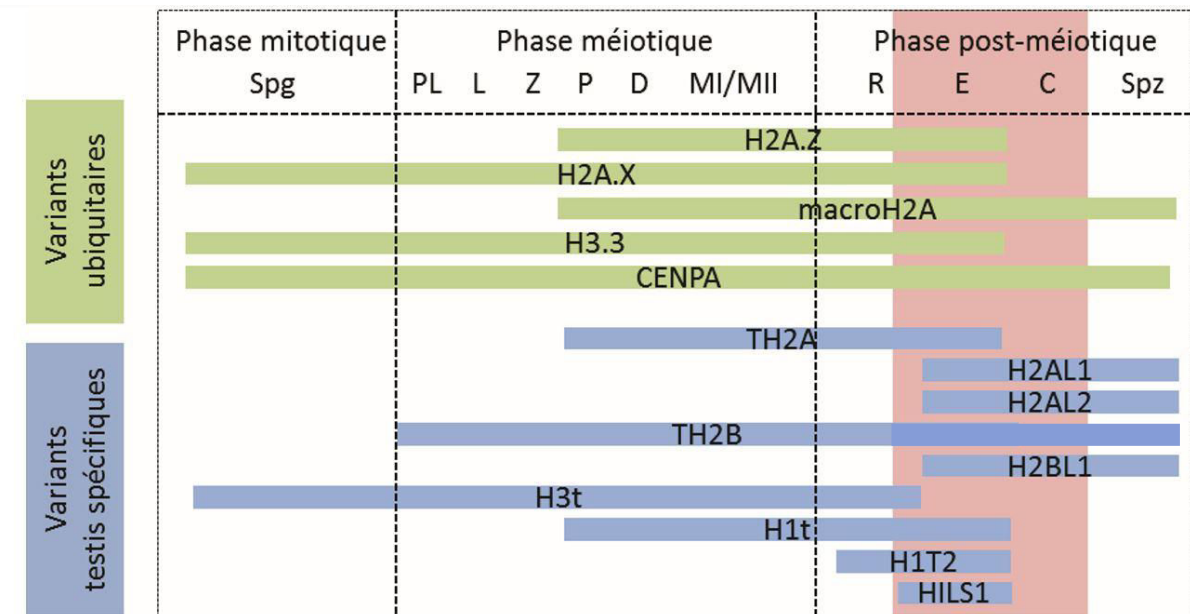


Figure 24 : Profil d'expression des variants d'histone au cours de la spermatogénèse. Les stades correspondants au remplacement des histones sont représentés en rose. Spg : Spermatogonie. PL pré-leptotène. L : Leptotène. Z : Zygotène. P : Pachytène. D : Diplotène. MI/MII : Meiose I/ Meiose II. R : Spermatide Ronde. E : Spermatide Elonguée. C : Spermatide Condensée. Spz : Spermatozoïde.

Depuis quelques années, plusieurs études ont commencé à éclaircir le rôle des variants d'histones dans les étapes de programmation du génome mâle, lors de l'enlèvement des histones et du compactage final du génome. Les analyses structurales et fonctionnelles *in vitro* montrent que la majorité des nucléosomes contenant ces variants sont moins stables que ceux composés de leurs homologues canoniques. Un grand nombre de variants d'histones connus sont incorporés au sein de la chromatine durant la spermatogénèse, qu'ils soient exprimés spécifiquement ou non dans le testicule. Les principales caractéristiques et fonctions dans les cellules somatiques de ces variants d'histones ont déjà été présentées (voir paragraphe II-4).

2.1- Les variants de l'histone H1

Parmi les nombreux variants de l'histone de liaison, trois sont exprimés spécifiquement dans le testicule (H1t, H1T2, HILS1) (Hergeth and Schneider, 2015).

2.1.1 - H1t

Chez la souris, le variant H1t remplace partiellement H1 à partir des spermatocytes au stade pachytène et persiste dans le noyau des cellules germinales jusqu'aux spermatides allongées de stade 8 (Grimes et al., 2003). H1t diffère de l'histone de liaison H1 de par l'absence de la séquence consensus S/TPKK, un motif connu pour avoir des propriétés de condensation de l'ADN (Bharath et al., 2003). Il a été montré que la protéine H1t condense beaucoup moins l'ADN par rapport à l'histone H1 canonique (Khadake and Rao, 1995; Ramesh et al., 2006). H1t pourrait donc conférer une structure chromatinienne plus ouverte, favorisant ainsi l'accessibilité aux facteurs de transcription, aux facteurs de remodelage et aux facteurs nécessaires à la recombinaison homologe (Doenecke et al., 1997). Cependant les souris invalidées pour le gène *H1t* restent fertiles et possèdent une spermatogenèse normale. L'absence de H1t serait en partie compensée par des histones de liaison somatiques ou totalement par d'autres variants de H1 (Drabent et al., 2003; Drabent et al., 2000; Fantz et al., 2001).

2.1.2 - H1T2

Le variant H1T2 est exprimé spécifiquement dans les cellules post-méiotiques. Il remplace progressivement le variant H1t pendant la phase d'élongation des spermatides. H1T2 a une distribution nucléaire très spécifique, il est localisé sur la chromatine au niveau du pôle apical juste sous l'acrosome. La délétion du gène *H1T2* génère une hypofertilité chez les souris mâles. Les spermatides des souris invalidées présentent un retard de condensation de la chromatine, un allongement aberrant, un détachement de l'acrosome et une fragmentation de l'ADN (Martianov et al., 2005; Tanaka et al., 2005). Le rôle exact de ce variant et de sa localisation particulière n'est pas encore connu.

2.1.3 - HILS1

Le variant HILS1 (H1-Like protein in Spermatids 1) est exprimé chez l'homme et la souris dans les spermatides du stade 9 et persiste jusqu'aux spermatides de stade 15. Son expression dans les stades tardifs lui conférerait un rôle au niveau de la réorganisation de la chromatine. Chez la drosophile, la délétion de son homologue engendre un défaut d'élongation des spermatides et entraîne la stérilité chez les mâles (Jayaramaiah Raja and Renkawitz-Pohl, 2005).

2.2 - Les variants de l'histone H2A

De nombreux variants d'H2A sont exprimés dans le testicule dont quatre ont une expression ubiquitaire (H2A.Bbd, H2A.Z, H2A.X et macroH2A) et cinq sont spécifiques du testicule (TH2A, H2A.L.1, H2A.L.2 et H2A.L.3 et H2A.B.3).

2.2.1 - H2A.X

Dans les cellules somatiques, H2A.X est impliqué dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Sa présence est donc essentielle lors de la méiose, impliquant des cassures et des réparations de l'ADN pendant les recombinaisons homologues entre chromosomes, ce variant est donc important au bon déroulement de la spermatogénèse. En effet, son invalidation conduit à un arrêt de la spermatogénèse au stade des spermatocytes pachytènes et à une stérilité masculine. Un mauvais alignement des chromosomes ainsi que des mésappariements entre chromosomes sexuels et autosomes sont observés et les foyers de sites de recombinaisons ne sont pas détectés (Celeste et al., 2002).

2.2.2 - MacroH2A

Dans les cellules somatiques de mammifères femelles, macroH2A est retrouvé au niveau du chromosome X inactif, le maintenant dans un état transcriptionnellement inactif à travers la structuration hétérochromatinienne de ce chromosome. Ce variant est donc généralement associé à une forte répression de la transcription. L'isoforme MacroH2A1.2 est enrichi dans les testicules de souris (Angelov et al., 2004; Nesterova et al., 2002). Ce variant est incorporé à l'hétérochromatine centromérique dans la vésicule sexuelle des spermatocytes au stade pachytène (Hoyer-Fender et al., 2000; Turner et al., 2001). Il a été montré que MacroH2A2 colocalise avec la protéine HP1 au niveau de l'hétérochromatine des régions pseudo-autosomales. Cependant, aucun rôle de macroH2A dans l'inactivation de la transcription au sein de la vésicule sexuelle n'a encore été décrit.

2.2.3 - H2A.Z

Le variant H2A.Z est exprimé au cours de la méiose dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes. H2A.Z est enrichi au niveau des chromosomes sexuels. Il serait donc associé à l'hétérochromatine facultative afin de maintenir les chromosomes sexuels dans un état de répression transcriptionnelle transitoire. Ce variant remplacerait et compenserait la perte de MacroH2A (Greaves et al., 2006).

2.2.4 - H2A.Bbd

Le variant H2A.Bbd (Barr body deficient) est exprimé exclusivement chez les mammifères (Eirin-Lopez and Ausio, 2007). H2A.Bbd est fortement exprimé dans le testicule, comparé aux autres tissus où sa présence est à peine détectable. Ce variant est particulièrement abondant dans les phases tardives de la spermiogénèse au niveau des spermatides allongées et pourrait intervenir lors du remodelage de la chromatine (Ishibashi et al., 2010). Des approches *in vitro* ont montré une déstabilisation du nucléosome liée à la présence de H2A.Bbd (Angelov et al., 2004).

2.2.5 - TH2A

TH2A est incorporé à la chromatine lors de la méiose dans les spermatocytes au stade pachytène puis disparaît dans les spermatides rondes (Meistrich et al., 1985; Rao et al., 1983). Les souris invalidées pour les deux gènes *Th2a* et *Th2b* sont stériles et le KO entraîne un défaut dans la libération de la cohésine à l'interkinésie après la méiose I et un défaut dans le remplacement des histones au cours de la spermiogénèse (Shinagawa et al., 2015).

2.2.6 - H2A.Lap1-4

Une approche de criblage du génome de la souris a permis d'identifier des variants d'histones H2A dépourvus de leur patch acide. Ce patch acide est présent dans la plupart des variants d'histone H2A ainsi que dans l'histone H2A canonique (Soboleva et al., 2011). Ce patch acide composé d'une série de six acides aminés acides est présent à la surface d'un nucléosome et permet l'interaction entre nucléosomes pour faciliter la compaction de la chromatine. Cette approche a permis d'identifier quatre variants H2A avec un patch acide altéré qui ont été nommés H2A.Lap1-4 (Lap pour Lack of Acidic Patch). Une analyse plus poussée a montré que certains d'entre eux avaient déjà été identifiés dans l'équipe de S. Khochbin (Govin et al., 2007) : H2A.L.2 est en fait H2A.Lap3 ; H2A.L.1 est H2A.Lap2 ; H2A.L.3 est H2A.Lap4 et H2A.Lap1 est maintenant connu sous le nom de H2A.B.3.

- H2A.B.3

H2A.B.3 apparaît d'abord dans les spermatocytes pachytènes et s'accumule particulièrement dans les spermatides rondes post-méiotiques puis disparaît dans les spermatides allongées. H2A.B.3 est enrichi au niveau des sites d'initiation de la transcription (TSS) de gènes hautement actifs dans les spermatocytes ainsi que dans les spermatides rondes. Dans ces cellules, H2A.B.3 devient associé aux gènes liés au chromosome X qui échappent à l'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels (Soboleva et al., 2011).

Il a été montré que H2A.B.3 interagissait avec H2A.Z dans les cellules spermatogéniques. Le remplacement de H2A.Z par H2A.B.3 aux frontières exon-intron dans les cellules spermatogéniques peut jouer un rôle dans la régulation de l'épissage des gènes actifs (Nekrasov et al., 2013). Il a été montré que le variant H2A.B.3 est associé à des facteurs de maturation de l'ARN (Sf3b155, Spt6, DDX39A) ainsi qu'à l'ARN polymérase II. Ce variant a aussi la capacité à se lier directement à l'ARN (Soboleva et al., 2017). Ces études étendent le rôle du variant H2A.B.3 à une éventuelle régulation directe au niveau de la maturation et de l'épissage de l'ARN.

- H2A.L.1, H2A.L.2 et H2A.L.3

Les variants H2A.L.1 (H2A Like1), H2A.L.2 (H2A Like2) et H2A.L.3 (H2A Like3) ont été identifiés via une approche protéomique au sein de notre laboratoire avec des spermatides de souris au moment du remplacement des histones (Govin et al., 2007). Ces variants sont dépourvus d'une partie du « docking domain » et de quelques résidus du patch acide (Bao et al., 2004; Luger et al., 1997). Le docking domain se situe au niveau C-terminal de H2A et permet l'interaction avec la partie C-terminale de H3 au sein d'un même nucléosome, ce domaine favorise donc les interactions intranucléosomales. Le patch acide correspond à quelques résidus acides situés dans le cœur de H2A, ces résidus interagissent avec les résidus basiques de l'extrémité N-terminale des histones H4 situées dans les nucléosomes adjacents. Ainsi les nucléosomes contenant un de ces variants sont plus instables que ceux composés de H2A (Doyen et al., 2006; Gautier et al., 2004; Syed et al., 2009). Ces variants d'histones s'expriment tous tardivement dans les spermatides allongées et condensées.

Des études antérieures ont montré que le variant H2A.L.2 s'accumulait au niveau des régions d'hétérochromatine péricentromérique. Une fraction de H2A.L.2 reste dans les spermatozoïdes matures associés à ces régions péricentromériques, puis le variant disparaît rapidement après fécondation (Govin et al., 2007; Wu et al., 2008). L'incorporation de H2A.L.2 au sein du nucléosomes déstabilise la structure de celui-ci et peut aussi réguler l'interaction avec les machineries de remodelage de la chromatine (Syed et al., 2009).

Le variant H2A.L.2 sera décrit plus en détails dans la partie II des résultats.

2.3 - Les variants de l'histone H3

L'histone canonique H3 possède quatre variants à expression ubiquitaire H3.1, H3.2, H3.3, CENPA et H3t qui est exprimé spécifiquement dans la lignée germinale mâle.

2.3.1 - H3t

Le variant H3t a été isolé en 1996 chez l'homme (Albig et al., 1996; Witt et al., 1996). Il ne diffère de H3.1 que de 4 acides aminés qui semblent être impliqués dans la déstabilisation du nucléosome (Tachiwana et al., 2010). H3t est exprimé dans les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides rondes. Il remplace progressivement H3 de type somatique. Des études ont montré qu'un unique acide aminé spécifique de H3t, le résidu histidine 42, serait responsable de la création d'un nucléosome dit «ouvert» avec des extrémités d'ADN flexibles à l'entrée et à la sortie des nucléosomes. En l'absence de H3t, une réduction significative du nombre de spermatogonies en différenciation a été observée, conduisant à une infertilité masculine. D'autres études ont montré une diminution drastique du nombre de cellules post-méiotiques et ont suggéré un rôle possible de ce variant pour leur entrée en méiose (Ueda et al., 2017).

2.3.2 - CENP-A

Au sein des cellules somatiques, CENP-A est nécessaire pour le recrutement des protéines centromériques et des kinétochores au niveau des centromères pour un bon déroulement de la mitose (Amor 2004). Bien qu'il ne soit pas clairement établi que CENP-A soit présent au cours de la spermatogenèse, l'utilisation d'un anticorps reconnaissant plusieurs protéines centromériques (CREST), dont le variant CENP-A, a permis de détecter sa présence par microscopie électronique au cours de la spermatogenèse (Biggiogera et al., 1992). Ainsi, CENP-A structurerait les centromères lors de la spermatogenèse et serait impliqué dans la bonne ségrégation des chromosomes au cours de la mitose et de la méiose. D'autre part, CENP-A est présent dans les spermatozoïdes bovins (Palmer et al., 1990).

2.3.3 - H3.3

Chez la souris, deux gènes indépendants codent pour H3.3, *H3f3a* et *H3f3b*, et génèrent une protéine identique. La double invalidation des gènes *H3f3a* et *H3f3b* conduit à une létalité embryonnaire précoce. Au cours de la spermatogenèse, la majorité des histones H3 est remplacée par le variant H3.3 durant la première prophase de méiose (Akhmanova et al., 1995). Ce variant disparaît dans les stades tardifs de la spermiogénèse, au moment où la quasi-totalité des histones est échangée par les protamines. Les KO individuels de ces gènes n'ont pas d'impact sur la spermatogenèse, suggérant une compensation de l'expression de chacun des gènes respectivement. Par contre, il existe un effet de dosage de gènes, en effet *H3.3a^{+/-}/H3.3b^{-/-}* conduit à une absence totale de cellules germinales mâles (Jang et al., 2015).

Il a été montré un remplacement massif de l'histone canonique H3 par H3.3 sur les chromosomes sexuels des cellules méiotiques (van der Heijden et al., 2007). Au cours de la méiose, les chromosomes non synchronisés X et Y créent un domaine spécifique dans le noyau des spermatocytes appelé vésicule sexuelle et subissent une inactivation transcriptionnelle

totale au cours de la méiose connue sous le nom d'inactivation méiotique du chromosome sexuel (MSCI). L'incorporation sélective de H3.3 sur les chromosomes sexuels permet des combinaisons pertinentes avec d'autres variants d'histones. Dans les spermatocytes, le variant macroH2A s'accumule également dans la vésicule sexuelle, par contre dans les cellules post-méiotiques, H2A.Z est enrichi sur les chromosomes sexuels (Greaves et al., 2006; Hoyer-Fender et al., 2000). La présence simultanée de H3.3 et de macroH2A dans les spermatocytes et de H3.3 et H2A.Z dans les spermatides rondes pourrait générer des associations fonctionnelles. Par exemple, la combinaison H3.3-H2A.Z est décrite pour générer un nucléosome particulièrement instable. Ceci serait important pour la réactivation post-méiotique de gènes (Jin and Felsenfeld, 2007). La question de la fonction de H3.3 dans la MSCI et dans la réactivation partielle post-méiotique des chromosomes sexuels au niveau moléculaire reste ouverte.

2.4 - Les variants de l'histone H2B

Les variants H2B connus sont tous exprimés exclusivement dans la lignée germinale mâle.

2.4.1 - TH2B

TH2B est l'un des plus anciens variants d'histone mis en évidence, sa découverte date de 1975 (Branson et al., 1975; Shires et al., 1975). Contrairement aux autres variants de H2B, TH2B est très conservé entre les espèces (Zalensky et al., 2002). Ce variant est exprimé durant la totalité de la spermatogenèse, des spermatogonies aux spermatozoïdes. TH2B et H2B diffèrent principalement dans leur partie N-terminale à travers l'addition de sites de phosphorylation (S12, T23, T34) et le repositionnement d'autres sites (S5, S6) au niveau de TH2B. Une étude structurale a montré qu'un octamère d'histone contenant TH2B présente une instabilité nucléosomale accrue par rapport à un octamère canonique (Li et al., 2005b). Cette instabilité pourrait s'avérer essentielle dans les étapes d'échanges des histones au cours de la spermiogenèse. D'ailleurs, TH2B reste présent au cours des étapes tardives de la spermatogenèse et au moment du remplacement des histones, dans les structures de transition qui sont générées lors de la transformation des nucléosomes en nucléoprotamines et ce en combinaison avec le variant d'histone H2A.L.2 (Govin et al., 2007).

Les premières études fonctionnelles de TH2B dans son cadre physiologique, au cours de la différenciation des cellules spermatogéniques, ont été publiées grâce à la génération de différents modèles murins (Montellier et al., 2013). Ces études montrent que, dès le début de la méiose, TH2B remplace massivement H2B, et que la plus grande partie du génome est composée de nucléosomes contenant TH2B. Mais de manière surprenante, en l'absence totale de TH2B, la spermatogenèse semble se produire tout à fait normalement, et il n'y a pas d'effet sur la fertilité masculine. Cependant, l'étude de la spermatogenèse chez les souris

déficientes en TH2B a révélé un mécanisme compensatoire conduisant à l'accumulation de l'histone canonique H2B qui remplace le variant afin de permettre la formation de nucléosomes. Une analyse protéomique quantitative et comparative des MPTs des histones entre les cellules spermatogéniques sauvages et déficientes en TH2B a permis de mieux comprendre ce mécanisme compensatoire et montre qu'en l'absence de TH2B, les nucléosomes subissent une reprogrammation épigénétique qui les rend instables. En effet, dans les nucléosomes dépourvus de TH2B, les histones acquièrent plusieurs modifications chimiques qui sont toutes situées à des positions stratégiques et qui diminuent la stabilité globale des nucléosomes. Par exemple, l'addition d'un groupe crotonyle volumineux sur les lysines H3K122 et H4K77 ayant une capacité de neutralisation de charge va affecter la stabilité du nucléosome. D'autres MPTs identifiées dans les nucléosomes dépourvus de TH2B telles que les méthylations de H4R35, H4R55, H4R67 et H2BR72 sont aussi impliquées dans les interactions histone-ADN et histone-histone. Elles ont le potentiel d'affaiblir ces interactions intranucléosomales. Ainsi, en l'absence de TH2B, le mécanisme compensatoire combine une surexpression de l'histone canonique H2B avec des modifications sur des résidus spécifiques ayant des effets déstabilisants sur les nucléosomes. En d'autres termes, la fonction primaire de TH2B pourrait être de générer des nucléosomes moins stables afin de faciliter les échanges d'histones. La propriété de déstabilisation des nucléosomes contenant TH2B a été confirmée par une série d'études structurales (Padavattan et al., 2015; Padavattan et al., 2017; Urahama et al., 2014).

L'absence conjuguée de TH2B et TH2A par double invalidation des gènes correspondants bloque la spermatogenèse en méiose. Dans ce modèle, il y a bien une compensation de TH2B par H2B par contre aucune accumulation d'H2A n'a été observée pour compenser l'absence de TH2A. Il y a donc un sous-dosage de H2A provoquant ainsi une structure chromatinienne inappropriée (Shinagawa et al., 2015). D'autres études ont montré que TH2A est phosphorylé spécifiquement sur la Thr127 et que cette phosphorylation est indispensable pour un bon déroulement de la spermatogenèse (Hada et al., 2017).

D'autre part, des cellules germinales mâles exprimant une forme étiquetée de TH2B à son extrémité C-terminale, génèrent des souris mâles stériles avec un blocage en début du processus d'élongation. Ce blocage est lié à un défaut d'échange histones/protamines du probablement à une stabilité accrue de la structure nucléosomale suite à un changement de conformation du variant induit par la présence de l'étiquette en C-terminal (Montellier et al., 2013).

2.4.2 - H2BFWT

Le variant H2BFWT, montre peu d'homologie avec l'histone canonique H2B, surtout au niveau de son extrémité N-terminale (Boulard et al., 2006). Il serait spécifiquement associé aux télomères dans les spermatozoïdes humains matures (Churikov et al., 2004). Il a été montré *in vitro* que les nucléosomes contenant H2BFWT sont aussi stables que les nucléosomes canoniques mais ne permettent pas une bonne condensation et un assemblage correct des chromosomes au cours de la mitose (Boulard et al., 2006)

2.4.3 - SubH2Bv/H2BL1

SubH2Bv est un variant de H2B exprimé spécifiquement dans la lignée germinale mâle bovine. Du fait de sa localisation en périphérie du noyau, au niveau de la région subacrosomale du spermatozoïde, ce variant serait plutôt impliqué dans l'assemblage de l'acrosome (Aul and Oki, 2002). Chez la souris, son homologue, identifié au laboratoire, serait H2BL1 dont le rôle reste à déterminer (Govin et al., 2007).

L'ensemble des études structurales de ces variants exprimés dans la lignée germinale mâle a révélé leur capacité à induire une instabilité des nucléosomes. Bien que ces variants induisent des caractéristiques de chromatine ouverte, ces histones sont exprimées à des étapes très différentes de la spermatogenèse. Par conséquent, la configuration de la chromatine semble progressivement plus instable à partir de l'engagement des cellules dans les divisions méiotiques jusqu'au stade post-méiotique tardif lors de la transition histones/protamines.

3 - Remplacement des histones par les protéines de transition et les protamines

Au cours de la spermiogénèse, plus précisément dans les spermatides en élongation de stade 9 à 11 chez la souris, les histones sont remplacées par des protéines de transition qui sont à leur tour déplacées par les protamines (Figure 25).

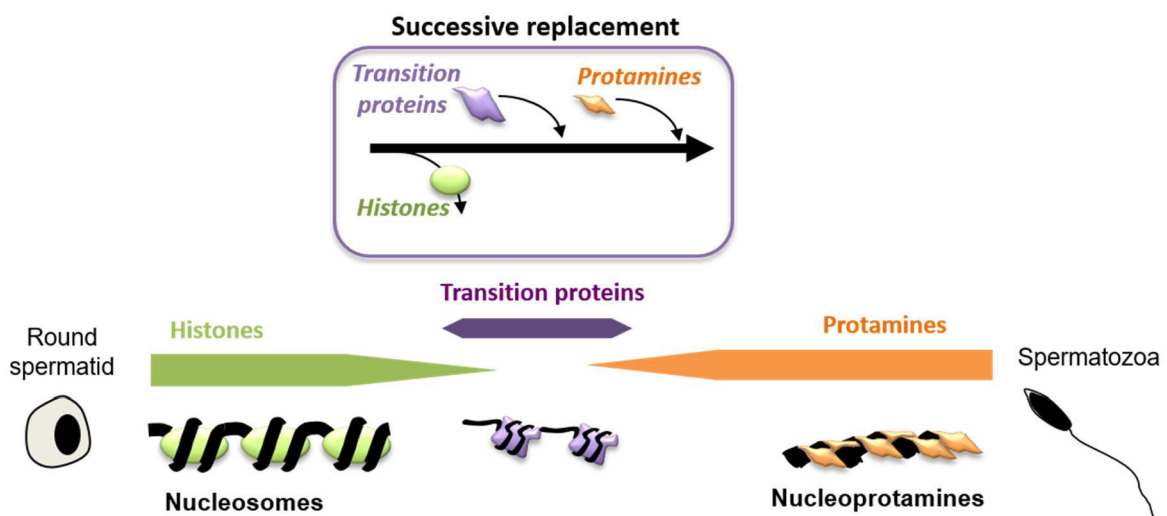


Figure 25 : Remplacement successif des histones par les protéines de transition puis par les protamines lors de l'élongation des spermatides.

3.1 - Les protéines de transition

Les protéines de transition (TP) sont des protéines très riches en résidus arginines, lysines et histidines, de caractéristiques très basiques. Ces protéines se fixent de manière transitoire à l'ADN avant le remplacement par les protamines. Les protéines de transition représentent 90% des protéines basiques de la chromatine dans les spermatides de stade 12-13, stades où les histones sont remplacées (Meistrich et al., 2003). Chez les mammifères, quatre protéines de transition ont été identifiées : TP1 à TP4. Les protéines TP1 et TP2 représentent respectivement 50% et 40% des protéines nucléaires des spermatides. Elles sont les plus étudiées et les mieux décrites.

Ces deux protéines sont de petite taille, 6,2 kDa pour TP1 et 13 kDa pour TP2. Chez la souris, les gènes *TP1* et *TP2* sont transcrits dans les spermatides rondes aux stades 6-7, puis les ARN messagers correspondants sont stockés dans le cytoplasme pendant 3 à 7 jours après la transcription sous forme de ribonucléoprotéines avant d'être traduits dans les spermatides en condensation aux stades 11-13 (Mali et al., 1989; Platz et al., 1977; Yelick et al., 1989).

TP1 et TP2 condensent l'ADN avec une efficacité accrue pour TP2 (Baskaran and Rao, 1990). Des modifications post-traductionnelles de TP2, par phosphorylation et/ou acétylation, pourraient modifier sa capacité à condenser l'ADN (Brewer et al., 2002). Des enzymes catalysant ces modifications ont été identifiées : la protéine kinase A phosphoryle des sérines dans la partie C-terminale de TP2 et l'acetyltransférase p300 est responsable de l'acétylation (Meetei et al., 2002; Pradeepa et al., 2009).

Les mécanismes de prise en charge et d'incorporation des TPs à la chromatine sont encore mal connus. On sait que lorsqu'elles ne sont pas associées à l'ADN, les protéines de transition sont associées à HSP70.2 une chaperonne exprimée spécifiquement dans la lignée germinale mâle (Govin et al., 2006).

Les souris homozygotes invalidées pour les gènes *TP1* ou *TP2* sont hypofertiles (Adham et al., 2001; Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001). Pourtant aucun phénotype radical n'a été détecté, les testicules sont normaux et le processus de remplacement des histones par les protamines ne semble pas affecté. En l'absence de TP1, on note une augmentation de TP2 dans le testicule, et inversement en l'absence de TP2, la protéine TP1 est plus abondante, on a donc un phénomène de compensation. Dans ces deux invalidations individuelles, on retrouve une anomalie au niveau de la compaction de la chromatine des spermatozoïdes et un défaut de maturation de la protamine 2.

L'obtention de lignées de souris doublement invalidées pour les gènes *TP1* et *TP2* a permis d'éliminer un effet redondant des deux protéines (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004). Les souris mâles dépourvues de TP1 et TP2 sont stériles. Un tiers des spermatides condensées montrent des défauts morphologiques au niveau de la tête, de l'implantation et de la structuration du flagelle et présentent une condensation déficiente de la chromatine. Les

mâles montrent une réduction drastique du nombre de spermatozoïdes dans l'épididyme, ces derniers n'étant pas féconds *in vitro*.

3.2 - Les protamines

Lorsque les histones sont échangées par les protéines de transition, celles-ci sont remplacées par des petites protéines encore plus basiques, les protamines (Prm) (Balhorn, 2007).

La plupart des mammifères possède une seule protamine d'environ 5,5 kDa, Prm1. Cependant certains mammifères, dont la souris et l'homme, possèdent deux protamines, Prm1 et Prm2 (Figure 26).

A la différence de Prm1 qui est directement traduite à partir de l'ARNm correspondant, Prm2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 14kDa (Pre-Prm2). Après son incorporation à l'ADN, ce précurseur Pre-Prm2 subit 6 clivages protéolytiques successifs coté N-terminal qui vont générer la forme mature de Prm2 de masse moléculaire d'environ 7 kDa (Chauviere et al., 1992).

Chez la souris, la transcription des gènes codants pour les protamines Prm1 et Prm2 débute dans les spermatides rondes au stade 7, simultanément à celle des gènes des protéines de transition (Mali et al., 1989). Les protéines correspondantes sont principalement traduites dans les spermatides condensées aux stades 12-14 pour Prm1 et aux stades 14-16 pour Prm2. Le délai pour Prm2 est lié au fait de sa maturation post-traductionnelle (Balhorn et al., 1984; Biggiogera et al., 1992).

Ces protéines sont constituées de plusieurs domaines structuraux qui leur confèrent différentes propriétés (Figure 26).

Le domaine central, très riche en arginine, faciliterait leur interaction avec l'ADN en créant des liaisons hydrogènes entre l'ADN et les deux groupements amines des arginines. On parle de domaine d'ancrage à l'ADN. De la même manière que pour les protéines de transition, ces interactions avec l'ADN pourraient être modifiées par la phosphorylation des protamines sur les résidus sérines et thréonines. L'addition de groupement phosphate sur Prm2 est catalysé par la kinase Camk4. La phosphorylation des protamines semble essentielle à leur fonctionnement. En effet, une mutation de la protéine kinase Camk4 induit un défaut de spermatogénèse et une stérilité des mâles (Wu et al., 2000; Wu and Hecht, 2000).

De façon similaire aux protéines de transition, les protamines condensent l'ADN (Balhorn et al., 2000; Brewer et al., 2003; Iuso et al., 2015; Kwon and Hecht, 1993). Les protamines possèdent deux extrémités terminales enrichies en résidus cystéines qui sont essentiels pour la compaction finale de la chromatine dans les spermatozoïdes. Après liaison à l'ADN, les groupements thiol de ces cystéines sont oxydés pour former des ponts disulfures entre les

cystéines des différentes protamines. Ces liaisons covalentes permettent de relier les protamines voisines entre elles et stabilisent fortement la chromatine au cours de la maturation des spermatozoïdes. Les ponts disulfures se forment progressivement au cours de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme. Ces ponts disulfures seront réduits au moment de la fécondation, juste après l'entrée du spermatozoïde dans l'oocyte.

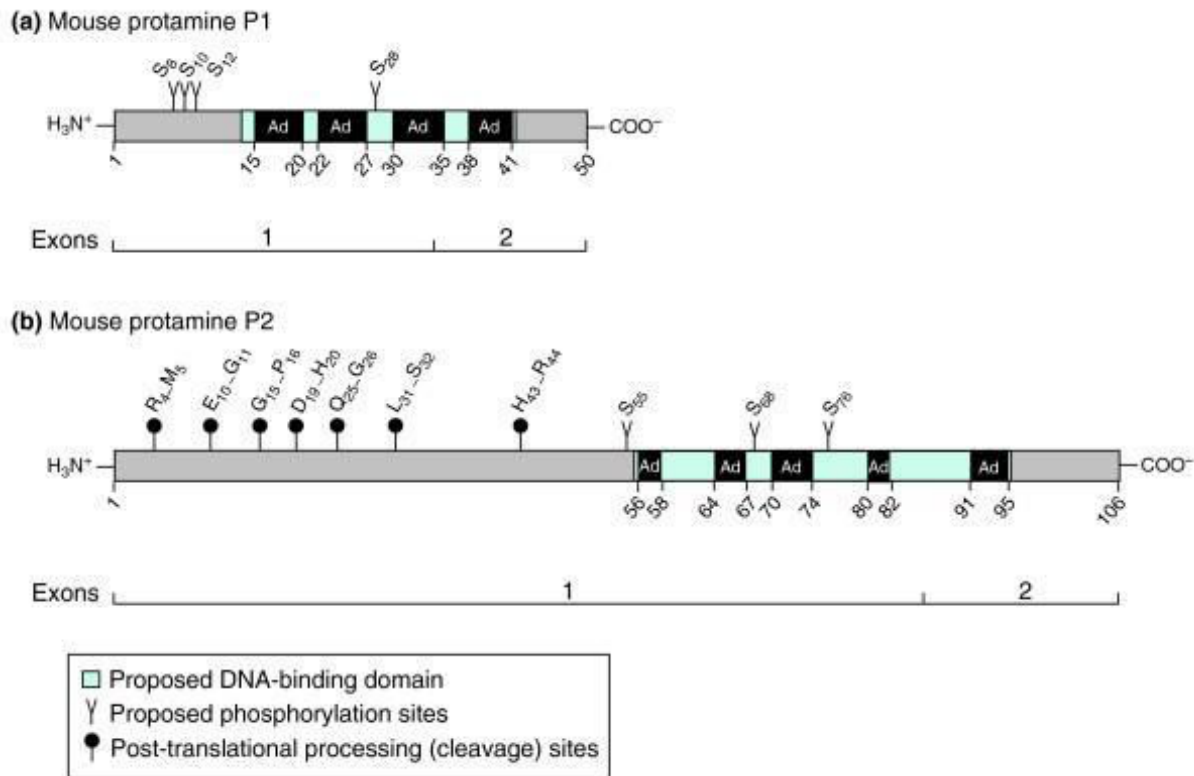


Figure 27 : Structure des protamines murines. Les sites de phosphorylation, les domaines de liaison à l'ADN et les sites de clivage sont indiqués (Balhorn, 2007).

Les protamines sont cruciales pour la spermiogénèse car l'inactivation de *Prm1* ou de *Prm2* empêche la production normale de spermatozoïdes et génère des souris hétérozygotes stériles (Cho et al., 2001). La diminution du niveau d'expression de l'une ou l'autre des protamines induit des défauts de formation du noyau spermatique.

4- Information épigénétique transmise par les spermatozoïdes

Au cours de la spermatogénèse, les histones sont remplacées massivement par les protamines mais ce remplacement n'est pas total. Il subsiste une proportion non négligeable

d'histones dans le spermatozoïde et donc de nucléosomes de l'ordre de 10% chez l'homme (Gatewood et al., 1987) et il est en de même chez la souris (Pittoggi et al., 1999; Yoshida et al., 2018).

Le spermatozoïde conserve donc des marques épigénétiques, comme des variants d'histones, des MPTs ou encore des modifications de l'ADN ainsi que des ARN non codants venant de l'épididyme (Sharma et al., 2018). Ainsi, le spermatozoïde porte sa propre information épigénétique nécessaire pour le développement embryonnaire précoce (Figure 28) (Schagdarsurengin et al., 2012).

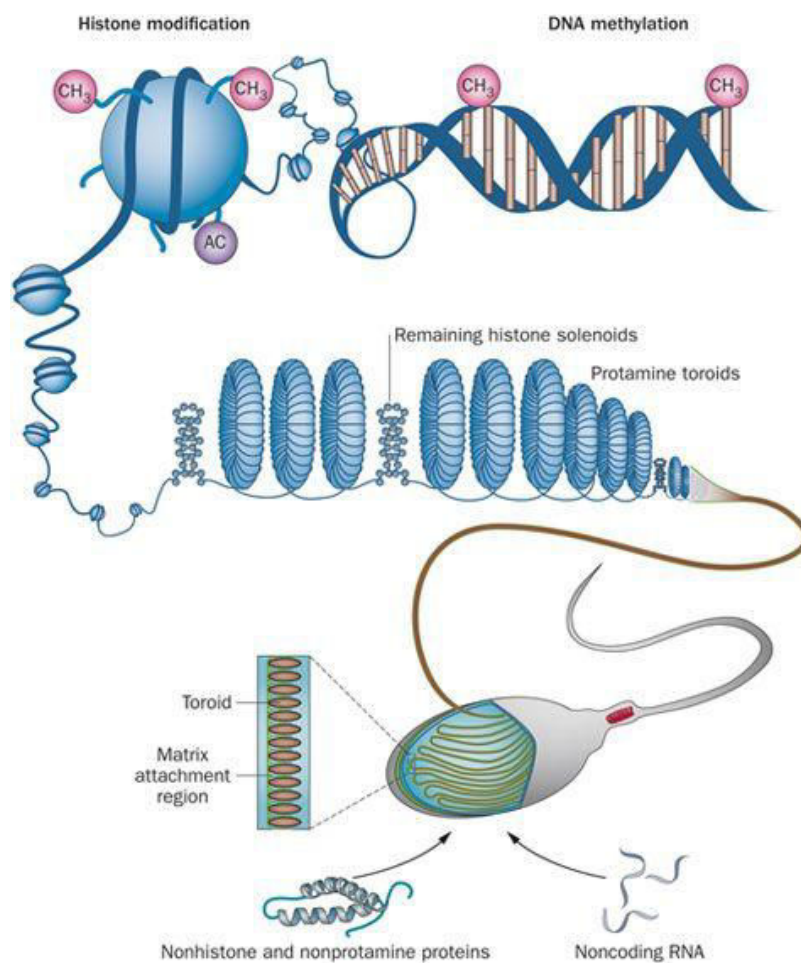


Figure 28 : Structure de la chromatine du spermatozoïde. La chromatine du spermatozoïde conserve des informations épigénétiques (Schagdarsurengin et al., 2012).

Au sein même du spermatozoïde, la composition en histones ou en protamines de certains gènes est finement régulée. En effet, les gènes exprimés durant la spermiogénèse ou l'embryogenèse sont plutôt associés à des structures nucléosomales en revanche les gènes

réprimés durant cette période s'organise autour des protamines. Les gènes de la famille β -globine sont souvent pris comme exemple pour expliquer ce phénomène. Les gènes γ et ϵ qui s'expriment spécifiquement au début du développement embryonnaire sont organisés sous forme nucléosomale, alors que les gènes δ et β qui codent pour les formes adultes et ne sont donc pas exprimés lors du développement embryonnaire vont être associés aux protamines (Gardiner-Garden et al., 1998). Il existe donc au sein des spermatozoïdes une programmation des régions génomiques qui sont exprimées tôt au cours du développement embryonnaire.

D'autres régions d'ADN se trouvant sous forme nucléosomale serait dû à une transcription très active en fin de spermatogénèse, c'est le cas notamment des gènes codant pour les protéines de transitions et les protamines (Wykes and Krawetz, 2003).

Certaines marques épigénétiques ont été retrouvées au niveau de la chromatine du spermatozoïde.

Il a été montré chez le bovin et chez l'homme, la présence du variant d'histone CENP-A dans les spermatozoïdes et son association avec les centromères (Palmer et al., 1990; Zalensky et al., 1993). Une autre étude chez la drosophile a mis en évidence des défauts lors de la première division mitotique après fécondation lors d'une diminution du taux de CENP-A. Ce variant aurait donc un rôle dans la définition du centromère lors des étapes précoces du développement embryonnaire (Raychaudhuri et al., 2012).

Chez la souris, les régions d'hétérochromatine péricentromérique sont elles aussi enrichies en nucléosomes dans les spermatozoïdes (van der Heijden et al., 2006). Les MPTs H4K8ac et H4K12ac ainsi que les variants d'histones H2A.L.1 et H2A.L.2 sont présents dans ces régions (Govin et al., 2007). L'ensemble de ces acteurs épigénétiques est donc transmis par le spermatozoïde et jouerait un rôle dans la spécification des zones péricentromériques après la fécondation (Wu et al., 2008).

D'autres variants d'histones ont également été retrouvé au sein du spermatozoïde mais aucun rôle de ceux-ci n'a été défini. On retrouve notamment H2BL1 chez la souris (Govin et al., 2007) et un variant de H1, HILS1 (Rathke et al., 2010).

Les nucléosomes retenus dans les spermatozoïdes sont principalement présents au niveau de promoteurs de gènes nécessaires pour le développement embryonnaire précoce (Brykczynska et al., 2010; Hammoud et al., 2009). Ces promoteurs des gènes régulés au cours du développement possèdent les marques activatrices de la transcription telles que H3K4me2/3 et/ou répressive comme H3K27me3. On retrouve la marque H3K4me3 au niveau des promoteurs des gènes HOX, de certains microARN et des gènes soumis à l'empreinte paternelle. En revanche, H3K27me3 va être associé à des promoteurs de gènes développementaux qui ne sont pas exprimés lors d'étape précoce du développement embryonnaire. Ainsi les MPTs portées par les spermatozoïdes ont aussi un rôle important pour la programmation du génome mâle lors du développement embryonnaire précoce (Erkek et al., 2013).

OBJECTIFS DE THESE

Au cours des phases post-méiotiques de la spermatogenèse, une réorganisation drastique de la chromatine des cellules germinales mâles s'effectue. Ce changement de structure vise d'une part à compacter le génome du spermatozoïde afin de le protéger avant et lors de la fécondation et d'autre part à établir un épigénome mâle spécifique nécessaire pour le développement embryonnaire précoce. Cette réorganisation est initiée par une vague d'acétylation des histones, suivie par un remplacement massif des histones par de petites protéines basiques, les protéines de transition et les protamines. Les mécanismes moléculaires responsables de cette réorganisation de la chromatine sont très mal connus.

L'objectif principal de mon travail de thèse va être de comprendre les bases moléculaires qui régissent l'échange histones / protamines et ce en explorant les fonctions de deux acteurs : le facteur nucléaire Nut (Nuclear protein in testis) et le variant d'histone H2A.L.2.

Ces études ont été réalisées grâce à l'utilisation de deux modèles murins, l'un après invalidation du gène *Nut* et l'autre du gène *H2A.L.2*. Ces deux modèles nous ont permis de définir le lien entre ces deux protéines et la réorganisation de la chromatine dans le contexte de la spermatogenèse *in vivo*. Grâce à ces études, nous avons établi pour la première fois un modèle moléculaire expliquant la transformation des nucléosomes en nucléoprotamines.

La partie résultats sera ainsi divisée en deux sections, l'une associant le facteur Nut à la vague d'acétylation des histones et l'autre mettant en évidence le rôle crucial de H2A.L.2 au niveau du remplacement des histones par les protamines.

RESULTATS

I- Implication du facteur Nut dans la vague d'acétylation des histones dans les cellules germinales mâles post-méiotiques.

Le facteur NUT (NUclear protein in Testis) est une protéine exclusivement testiculaire qui est aussi impliquée dans les carcinomes hautement agressifs (NMC : NUT midline carcinoma). Ces cancers sont caractérisés par une translocation chromosomique qui aboutit dans 90% des cas à la fusion des gènes *BRD4* ou *BRD3*, correspondants à des protéines à double bromodomaine de la famille BET (Bromodomain and Extra Terminal), avec le gène *NUT* codant pour une protéine spécifiquement exprimée dans le testicule (French 2008). On ne connaissait pas de fonction physiologique à cette protéine. L'activité oncogénique de la protéine fusion BRD4-NUT entraîne la formation de domaines chromatiniens acétylés après recrutement de l'histone acétyltransférase p300 (Reynoird et al., 2010).

Les protéines de la famille BET ont la propriété de se lier à la chromatine acétylée à travers l'interaction avec leur bromodomaine. Les bromodomains reconnaissent des résidus acétylés spécifiques (voir paragraphe introduction III-4-2). Des études structurales et fonctionnelles ont montré que le premier bromodomaine de Brdt, un facteur exprimé spécifiquement dans les testicules, interagit simultanément avec les résidus acétylés K5 et K8 de l'histone H4 (Moriniere et al., 2009). Des études antérieures réalisées dans notre laboratoire ont montré que Brdt participe à l'enlèvement des histones. La délétion d'un de ses bromodomains (BD1) entraîne un défaut d'élongation des spermatides et une stérilité des souris mâles (Gaucher et al., 2012; Shang et al., 2007).

L'ensemble de ces travaux, nous a amené à étudier un lien possible entre Nut et Brdt au cours de la spermatogénèse et à définir le rôle de Nut dans la vague d'acétylation des histones, nécessaire pour le remplacement des histones dans les cellules germinales mâles post-méiotiques.

Afin d'explorer les fonctions du facteur Nut durant la spermatogénèse, un modèle murin a été généré au laboratoire dans lequel le gène codant pour la protéine Nut a été invalidé génétiquement (*Nut-KO*).

Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec la plateforme TGML de séquençage haut-débit d'ADN de Marseille et la plateforme de protéomique BIG-BGE du CEA de Grenoble.

Résumé des résultats

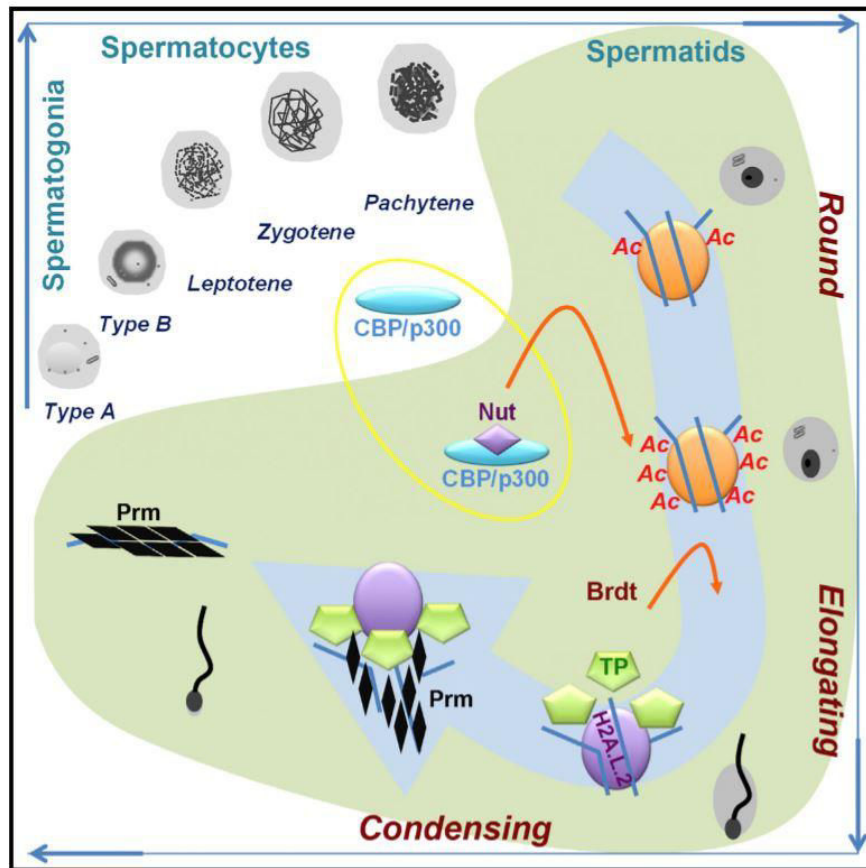


Figure 29 : Schéma bilan illustrant le rôle du facteur Nut dans la vague d'acétylation au sein des cellules germinales mâles.

Au cours de la spermatogénèse, nous avons montré dans ce travail que Nut est exprimé spécifiquement dans les spermatides ronds et dans les spermatides en début d'élongation lors de la phase post-méiotique. Son expression corrèle avec l'induction de l'acétylation de H4K5.

Afin de démontrer le rôle de Nut dans la spermatogénèse et sur la fertilité masculine, nous avons généré des souris et nous avons montré que les souris *Nut-KO* mâles sont totalement stériles avec un arrêt de la spermatogénèse au moment du remplacement des histones aboutissant à une absence totale de production de spermatozoïdes.

De plus et de manière remarquable, l'absence de Nut induit une forte baisse du niveau d'acétylation sur les sites H4K5 et H4K8 dans les spermatides ronds et en début d'élongation. Nut est donc le facteur régulant l'acétylation des résidus K5 et K8 de l'histone H4.

Nous avons également démontré que Nut interagit avec l'acétyltransférase p300 et est responsable de son recrutement. Ce recrutement permet l'acétylation des marques H4K5 et H4K8 ciblant ainsi l'interaction avec le premier bromodomaine de la protéine Brdt afin d'initier le processus de remplacement des histones par les protamines. L'ensemble de ces données sur le facteur Nut ont permis de compléter les mécanismes moléculaires responsables de la vague d'acétylation des histones dans les cellules germinales mâles post-méiotiques (Figure 29).

Ces résultats ont fait récemment l'objet d'une publication dans la revue Cell Reports en 2018.

Nut Directs p300-Dependent, Genome-Wide H4 Hyperacetylation in Male Germ Cells

Hitoshi Shiota,^{1,10} Sophie Barral,^{1,10} Thierry Buchou,^{1,10} Minjia Tan,² Yohann Couté,³ Guillaume Charbonnier,⁴ Nicolas Reynoird,¹ Fayçal Boussouar,¹ Matthieu Gérard,⁵ Mingrui Zhu,² Lisa Bargier,⁴ Denis Puthier,⁴ Florent Chuffart,¹ Ekaterina Bourova-Flin,¹ Sarah Picaud,⁶ Panagis Filippakopoulos,⁶ Afsaneh Goudarzi,¹ Ziad Ibrahim,⁷ Daniel Panne,^{7,8} Sophie Rousseaux,¹ Yingming Zhao,⁹ and Saadi Khochbin^{1,11,*}

¹CNRS UMR 5309, Inserm U1209, Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble 38700, France

²Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, 555 Zuchongzhi Road, Shanghai 201203, P.R. China

³Université Grenoble Alpes, CEA, Inserm U1038, CEA, BIG-BGE, Grenoble 38000, France

⁴TGML, platform IbiSA, Aix Marseille Université, Inserm U1090, TAGC, Marseille, France

⁵CEA, iBiTec-S, Gif-sur-Yvette 91191, France

⁶Structural Genomics Consortium & Ludwig Institute for Cancer Research, Old Road Campus Research Building, Roosevelt Drive, Oxford OX3 7DQ, UK

⁷EMBL Grenoble, BP 181, 71 Avenue des Martyrs, 38042 Grenoble Cedex 9, France

⁸Leicester Institute of Structural and Chemical Biology, Department of Molecular and Cell Biology, University of Leicester, Lancaster Road, Leicester LE1 7RH, UK

⁹Ben May Department of Cancer Research, The University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA

¹⁰These authors contributed equally

¹¹Lead Contact

*Correspondence: saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.069>

SUMMARY

Nuclear protein in testis (Nut) is a universal oncogenic driver in the highly aggressive NUT midline carcinoma, whose physiological function in male germ cells has been unclear. Here we show that expression of Nut is normally restricted to post-meiotic spermatogenic cells, where its presence triggers p300-dependent genome-wide histone H4 hyperacetylation, which is essential for the completion of histone-to-protamine exchange. Accordingly, the inactivation of *Nut* induces male sterility with spermatogenesis arrest at the histone-removal stage. Nut uses p300 and/or CBP to enhance acetylation of H4 at both K5 and K8, providing binding sites for the first bromodomain of Brdt, the testis-specific member of the BET family, which subsequently mediates genome-wide histone removal. Altogether, our data reveal the detailed molecular basis of the global histone hyperacetylation wave, which occurs before the final compaction of the male genome.

INTRODUCTION

In mammals, unique physiological, genome-wide histone hyperacetylation has been observed, associated with a near-total histone eviction that occurs during the late stages of spermatogenesis. In this context, an outstanding issue is the understanding of the causes and consequences of this histone hyperacetylation and, more precisely, of its role in histone eviction (Goudarzi et al., 2014). After meiosis, haploid cells, named spermatids, engage in one of the most dramatic known chromatin remodel-

ing and genome reorganization processes, which essentially takes place in cells known as elongating and condensing spermatids. It consists of the genome-wide removal of histones and their replacement by small basic proteins, transition proteins (TPs) and protamines (Prms) (Barral et al., 2017; Gaucher et al., 2010). Spermatids are produced following two successive meiotic divisions of spermatocytes, which are continuously generated from the progenitor cells known as spermatogonia.

During the past decades, we have developed strategies to discover the molecular basis of this genome-wide histone hyperacetylation taking place in late haploid male germ cells (Goudarzi et al., 2014). These strategies included a series of structural and functional studies of the testis-specific bromodomain-containing BET factor Brdt. These investigations showed that Brdt's first bromodomain specifically recognizes histone H4 bearing the simultaneous acetylation of K5 and K8 (Goudarzi et al., 2016; Miller et al., 2016; Morinière et al., 2009; Sasaki et al., 2009) and somehow mediates the eviction of histones (Gaucher et al., 2012).

In the frame of these studies, we also became interested in a testis-specific gene of unknown function, nuclear protein in testis (*NUT*), which is involved in a cancer known as NUT midline carcinoma (NMC). NMC is characterized by a series of chromosomal translocations that fuse the *NUT* gene located on chromosome 15q14 to partner genes, most frequently one of the double bromodomain proteins of the BET family, *BRD4* (67% of cases) or *BRD3* (25% of cases). Therefore, in more than 90% of NMC cases, NUT is fused to a double bromodomain BET factor (French, 2012).

Because of the testis-specific nature of *NUT* expression and its cooperation with somatic members of BETs, BRD3 and BRD4 in NMC, we hypothesized that a possible cooperation between NUT and BRDT in the physiological setting of spermatogenesis could occur and be involved in the establishment and management of histone hyperacetylation. Molecular investigations of the



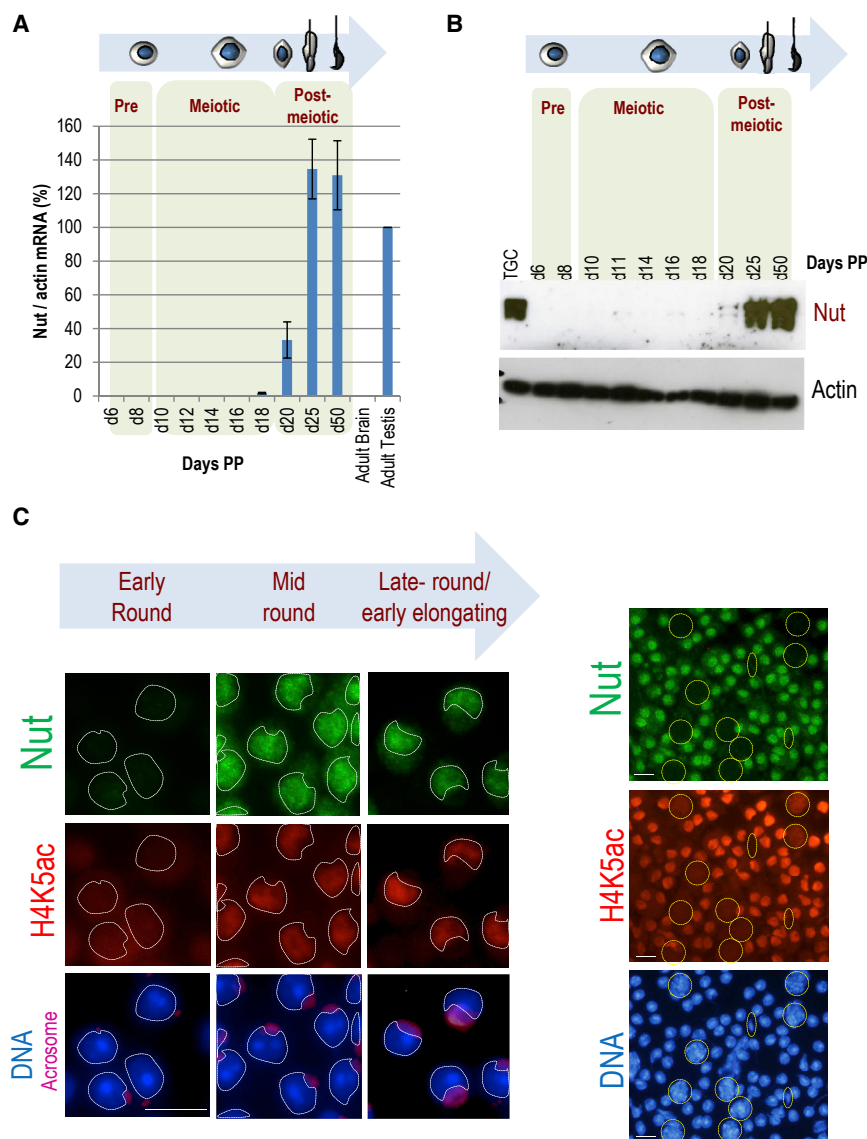


Figure 1. Nut Is Exclusively Expressed in Post-meiotic Spermatogenic Cells and Is Associated with Enhanced Histone H4 Hyperacetylation

(A) RNA was prepared from testes harvested at the indicated times after birth, and the expression of *Nut* was monitored by qRT-PCR, normalized with respect to *actin* expression and represented as the percentage of *Nut* expression in adult testis. Adult testis and adult brain RNAs were used as positive and negative controls, respectively. The histograms represent four experiments. Values represent averages \pm SDs (error bars).

(B) In another set of experiments, protein extracts were prepared from testes harvested as described in (A). The corresponding immunoblot was successively probed with the anti-Nut and anti-actin antibodies.

(C) In the left panels, cells from seminiferous tubule preparations were used to co-detect in the same cells Nut (rabbit polyclonal antibodies) and H4K5ac (mouse monoclonal antibody). Lectin was used to simultaneously visualize the acrosomes (in pink). The right panels show images of Nut-expressing round spermatids mixed with spermatocytes and a few condensed spermatids (indicated) taken at lower magnification. The staining was performed as for left panels, except that lectin was not used.

Scale bars: 10 μ m. See Figure S1 for tissue-specific patterns of *Nut/NUT* expression in human and mouse tissues.

oncogenic activity of the fusion protein BRD4-NUT revealed that it mediates the creation of hyperacetylated chromatin domains. In cells expressing BRD4-NUT, a feed-forward loop drives histone acetylation propagation (Reynoird et al., 2010). This BRD4-NUT-driven histone acetylation is constrained by cellular deacetylases (Reynoird et al., 2010; Schwartz et al., 2011) and remains limited to the nuclear topologically associated domains (TADs) (Aleksyenko et al., 2015), leading to the creation of hyperacetylated chromatin domains.

The discovery of the molecular basis of the activity of the fusion protein BRD4-NUT in NMC and of a role for NUT in inducing enhanced histone acetylation in NMC cancer cells prompted us to propose that Nut could also have a role in inducing the genome-wide histone hyperacetylation in post-meiotic male germ cells. To explore this hypothesis, we designed a series of experiments aiming to address the role of Nut during spermatogenesis at a molecular level.

post-meiotic spermatogenic cells. The sequence of events triggered by this interaction becomes oncogenic when it operates “off context.”

RESULTS

Nut Is a Testis-Specific Factor Exclusively Expressed in Post-Meiotic Spermatogenic Cells

The fusion partner of *BRD4*, *NUT*, was identified as a gene expressed in testis. However, until now, no information was available on its tissue-specific activity or on the pattern of its expression in testis during male germ cell differentiation.

Using publicly available transcriptomic data from different human and mouse tissues, we found that in both human and mouse, *NUT/Nut* is exclusively expressed in testis (Figure S1). We prepared RNA and protein extracts from developing mouse testes to precisely define the timing of

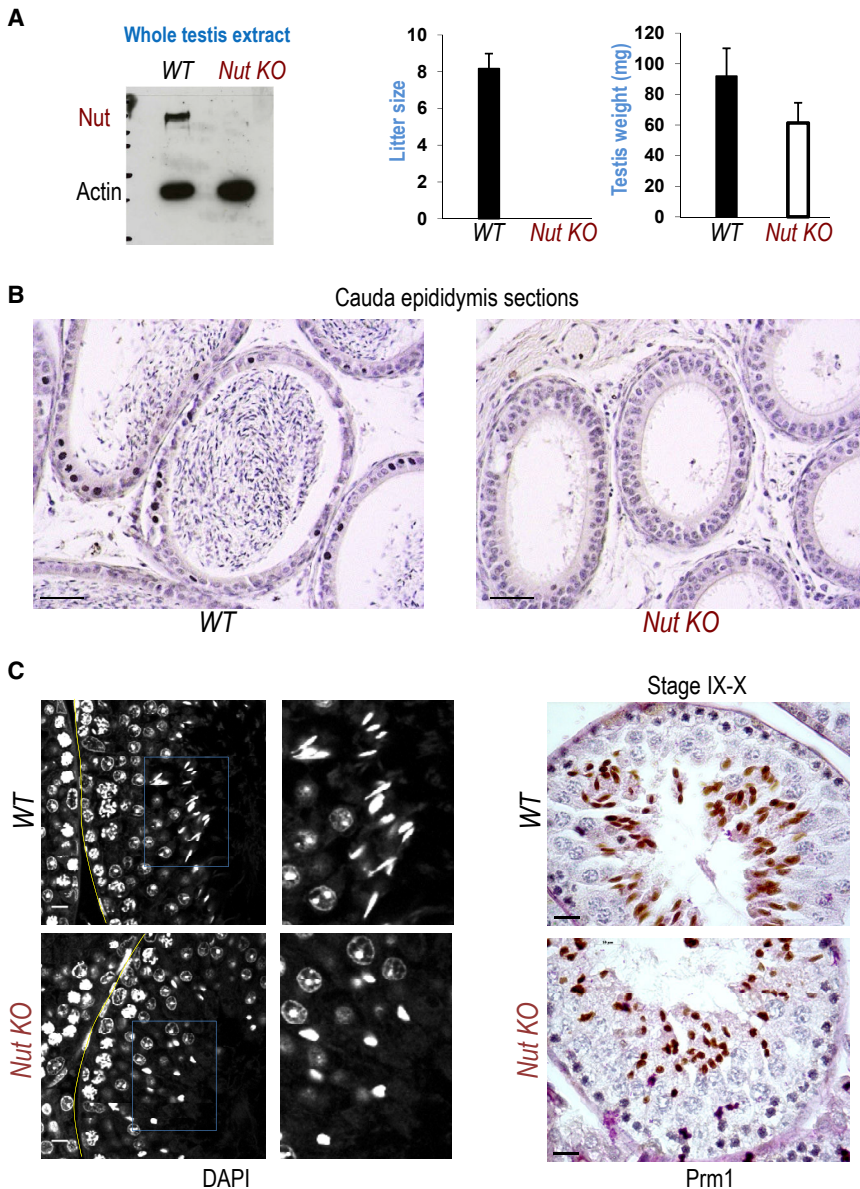


Figure 2. Inactivation of the *Nut* Gene Leads to Spermatogenesis Arrest and Male Infertility

(A) Protein extracts from wild-type and *Nut* KO mouse testes were probed with the anti-Nut and anti-actin antibodies as indicated (left panel). The right panels show litter sizes obtained after crossing wild-type female mice with wild-type (n = 12) or *Nut* KO (n = 5) male mice. The average weights of testes of wild-type (n = 16) and *Nut* KO (n = 19) mice were determined. Litter sizes and testis weights are represented as histograms. Each histogram represents averaged values \pm SDs (error bars).

(B) Histological preparations of cauda epididymis from wild-type or *Nut* KO mice are shown as indicated. Scale bar: 50 μ m.

(C) Histological sections of paraffin-embedded testes from wild-type and *Nut* KO mice testes at stages IX and X of spermatogenesis were stained with DAPI (left panels). The regions corresponding to the insets are shown at a higher magnification on the right. The right panels show the same types of sections as in the left panels but immunostained with an anti-Prm1 antibody and counterstained with hematoxylin. Scale bars: 10 μ m. See Figure S2 for the *Nut* KO strategy.

observation prompted us to co-detect Nut and H4K5ac (acetyl), a critical histone mark in post-meiotic cells (Gaucher et al., 2012; Goudarzi et al., 2016). Figure 1C (left panels) shows that the accumulation of Nut is associated with the induction of histone H4K5 acetylation in differentiating spermatids. Additional *in situ* co-detection of Nut and H4K5ac confirms this strict correlation between the accumulation of Nut and the occurrence of enhanced H4K5 acetylation. Only background H4K5ac could be detected in spermatocytes that do not express Nut compared to Nut-expressing round spermatids (Figure 1C, right panel).

Nut gene expression and Nut protein accumulation during spermatogenesis.

Post-meiotic haploid round spermatids first appear at 20 days post-partum (dpp). Traces of *Nut* mRNA (Figure 1A) and protein (Figure 1B) also appear at day 20. Both *Nut* mRNA and protein strongly accumulate at 25 dpp, when late round and early elongating spermatids are produced. *In situ* co-detection of Nut, along with the acrosome on spermatogenic cell preparations, shows that Nut is not detectable in early round spermatids, as defined by the size of their acrosomes, but instead accumulates in mid-round, late round, and early elongating spermatid populations (Figure 1C, left panel).

The observed timing of Nut accumulation in round and early elongating spermatids corresponds to when histone H4 hyperacetylation is known to first occur (Goudarzi et al., 2014). This

The question therefore arose of whether Nut could be a direct player in the induced acetylation of histone H4 in early elongating spermatids.

Nut Is Essential for the Completion of Spermiogenesis and Mature Sperm Production

To evaluate the function of Nut in post-meiotic spermatogenic cells, we set up a strategy based on the deletion of *Nut* exon 2 to generate *Nut*^{KO/KO} mice (*Nut* knockout [*Nut* KO] mice) (Figure S2). Western blots using our antibody on total testis extracts demonstrated the absence of Nut in spermatogenic cells of *Nut* KO mice (Figure 2A, left panel). *Nut* KO mice harbored smaller testes and were sterile (Figure 2A, middle and right panels). Cauda epididymis from *Nut* KO mice showed the absence of spermatozoa (Figure 2B), demonstrating an arrest

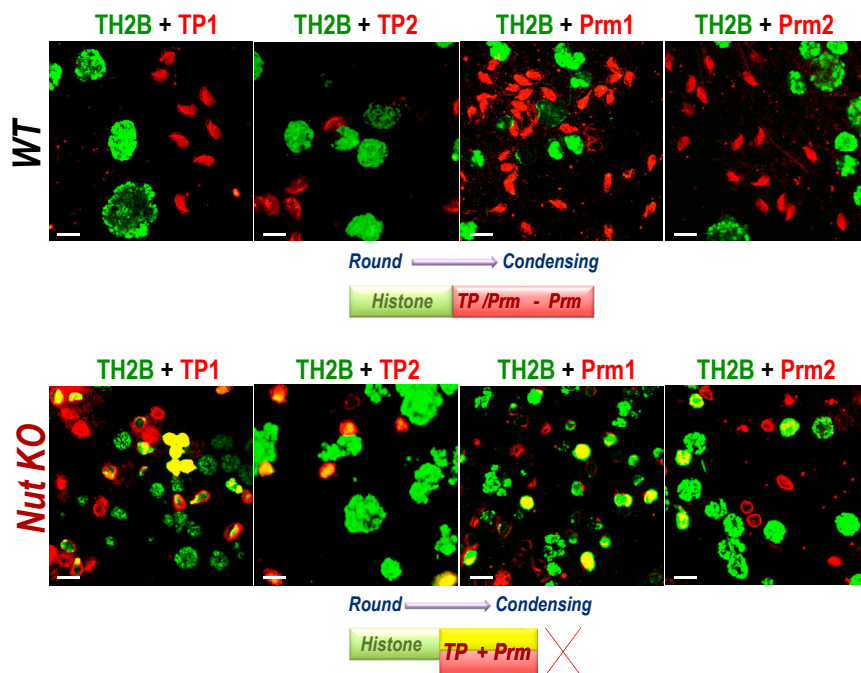


Figure 3. Nut Is Required for Histone-to-Protamine Replacement

TH2B (in green) was co-detected, along with TP1, TP2, Prm1, and Prm2 (in red) in wild-type and *Nut* KO male germ cells. See also Figure S3, showing Prm1 detection in both *Nut* KO and *Brdt* Δ BD1/ Δ BD1 elongating and condensing spermatids. Scale bars: 10 μ m.

of spermatogenesis at earlier stages. To precisely define spermatogenesis stages affected by the absence of Nut, we prepared histological sections of paraffin-embedded testes from wild-type (*WT*) and *Nut* KO mice. In *Nut* KO mice testes, spermatogenesis seems to occur normally until the appearance of condensing spermatids. Although round spermatids could be easily detected in both wild-type and *Nut* KO testes, no condensing spermatids were found in *Nut* KO testes (Figure 2C, DAPI panels). Immunohistochemistry on these sections using an anti-Prm1 antibody showed that in the absence of Nut, the Prm1-expressing spermatids do not undergo nuclear elongation and mostly remain round (Figure 2C, Prm1 panels).

Because Nut accumulation is associated with the induction of histone H4 acetylation (Figure 1C), which is associated with the replacement of histones by TPs and protamines (Gaucher et al., 2012; Goudarzi et al., 2016), we focused on the process of histone-to-protamine replacement. Accordingly, TH2B, which is the major spermatogenic cell histone H2B variant (Montellier et al., 2013), was co-detected, along with histone-replacing proteins TP1, TP2, Prm1, and Prm2. Figure 3 shows that although TH2B was never observed in wild-type cells expressing histone-replacing proteins, in *Nut* KO spermatids, TH2B was co-detected with TP1, TP2, Prm1, and Prm2. These observations demonstrate that even though the histone-replacing proteins are expressed in the absence of Nut, they are incapable of replacing histones.

To further demonstrate the defective histone replacement in the *Nut* KO spermatids, we made the hypothesis that the accumulation of TPs and protamines in the absence of histone replacement should leave an imprint on nucleosomes, especially on the more accessible DNA linker regions. The interaction of these highly basic proteins with linker DNA should protect DNA linker regions against micrococcal nuclease (MNase) digestion

and therefore generate DNA fragments longer than the canonical 147 base pairs (bp). To test this hypothesis, we prepared nuclei from fractionated round-elongating spermatids from wild-type and *Nut* KO testes and submitted them to extensive digestion with MNase to generate nucleosomal monomers. We then used paired-end sequencing to accurately determine DNA fragment lengths at the highest (base pair) resolution following two independent experiments (different mice and different fractionations). Both experiments revealed an enrichment of nucleosomal DNA

fragments with lengths longer than the canonical 147 bp in *Nut* KO spermatids compared to wild-type spermatids (Figures 4A and 4B).

Altogether, the co-immunodetection of TH2B and histone-replacing proteins, as well as the accumulation of nucleosomes with longer linker DNA in *Nut* KO spermatids, strongly support an impairment of histone replacement in the absence of Nut.

The defective histone replacement observed in the absence of Nut was reminiscent of the impaired TP and protamine assembly previously detected in mouse spermatogenic cells expressing a *Brdt* mutant lacking its first bromodomain (BD1) (Gaucher et al., 2012) (Figure S3), suggesting a possible functional link between Nut and *Brdt*'s first bromodomain in histone replacement.

Nut Sustains Site-Specific Histone Acetylation

Because *Brdt*'s BD1 binds to histone H4 acetylated on K5 and K8 (Goudarzi et al., 2016; Miller et al., 2016; Morinière et al., 2009; Sasaki et al., 2009), and *Brdt*'s BD1 is necessary for histone-to-protamine replacement (Gaucher et al., 2012), the impairment of histone removal in the absence of Nut (Figures 3 and S3) could be attributed to the absence of functional *Brdt* or to a defective histone acetylation specifically at H4K5 and H4K8.

A western blot on extracts from fractionated post-meiotic round and early elongating spermatids showed no change in the level of *Brdt* expression in the absence of Nut (Figure 5A). This result, along with our observation that Nut accumulation in mid- and late round and early elongating spermatids corresponds to the induction of histone hyperacetylation (Figure 1C), prompted us to perform a comparative analysis of the level of histone acetylation on histones extracted from round and early elongating spermatids from wild-type and *Nut* KO testes.

Consequently, we sought an unbiased approach to quantitatively monitor histone acetylation in the wild-type and *Nut* KO

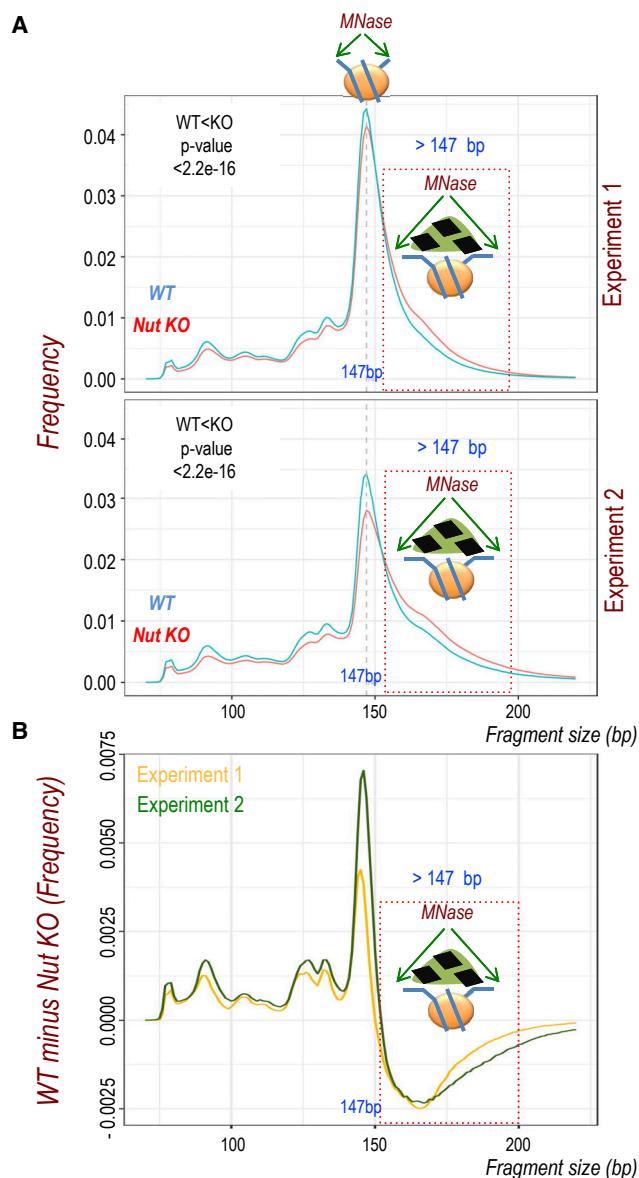


Figure 4. Genome-wide High-Resolution Studies Show Chromatin Changes in *Nut* KO Spermatids

(A) Paired-end sequencing was used for the high-resolution determination of nucleosomal DNA fragment lengths protected against extensive MNase digestion of nuclei prepared from fractionated spermatids from *wild-type* and *Nut* KO testes. Standard MNase fragment size distributions (mode at 147 bp) are observed for the two independent experiments. A more prominent shift toward DNA lengths > 147 bp is observed in *Nut* KO spermatids. The length shift significance was statistically assessed using a one-sided Wilcoxon rank-sum test with continuity correction.

(B) Comparison by subtraction of *wild-type* versus *Nut* KO distribution frequency of fragment size, highlighting the enrichment of standard nucleosomes and sub-nucleosomal structures in *wild-type* spermatids and the enrichment of longer nucleosomal DNAs in the chromatin of *Nut* KO spermatids. The results of two independent experiments are shown. For each experiment, round spermatid fractions were obtained from 3 to 5 mice (6 to 10 testes) and nuclei were prepared and extensively digested by MNase to reduce chromatin to nucleosome monomers. The nucleosomal DNA obtained from each experiment was then purified and used for paired-end sequencing.

round and early elongating spermatids. *In vitro* isotopic labeling followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis was performed to quantify histone post-translational modifications (PTMs). Histone extracts were digested with trypsin, and the resulting peptides were propionylated using light ($^{12}\text{C}_6$) and heavy ($^{13}\text{C}_6$) propionic anhydride. The light and heavy propionylated tryptic peptides were mixed in equal amounts and analyzed by HPLC-MS/MS.

The quantification of histone acetylation revealed a decrease in histone H4 and H2A acetylation, with a remarkable downregulation of acetylation at H4K5 and H4K8, as well as of H2AK5 and H2AK9 (Figure 5A, lower panel; Tables S1 and S2).

The downregulation of acetylation, especially at the critical H4K5 and H4K8 sites, in *Nut* KO round and early elongating spermatids compared to the wild-type spermatids was confirmed by western blotting, with the corresponding antibodies on independently prepared round and early elongating spermatid-enriched fractions (Figure 5B). Because none of the H3 tail lysines analyzed here by mass spectrometry were significantly affected by the absence of Nut, H3K9 acetylation was additionally checked by immunoblotting, showing only a slight decrease in *Nut* KO spermatids (Figure 5B).

These results show that the expression of *Nut* in round and early elongating spermatids (Figure 1C) is required for histone H4 hyperacetylation. In addition, the impairment of Nut-mediated acetylation of H4 demonstrates the inability of Brdt's BD1 to bind chromatin, explaining the similarity between *Nut* KO and *Brdt*^{delta BD1/delta BD1} phenotypes (Figure S3).

Nut Controls the Expression of a Subset of Genes Expressed in Spermatids

Our previous work on NMC identified p300 and/or CBP as the major cellular histone acetyltransferases (HATs) recruited by the NUT moiety of the BRD4-NUT fusion protein in a NMC cell line or upon transfection (Reynoird et al., 2010). We therefore hypothesized that when expressed in its physiological setting, spermatids, Nut could interact with p300 and/or CBP and use a similar mechanism to enhance histone acetylation. To verify this hypothesis, we performed two independent sets of experiments. First, the round and early elongating spermatid fractions from wild-type and *Nut* KO testes were used to obtain and compare the corresponding transcriptomes and to identify genes whose expression depends on Nut. The absence of Nut was found to be associated with the downregulation of 1,184 genes and the upregulation of 499 genes (using a cutoff of 1.5 for the absolute log₂ fold change value and a t test p value, after adjustment for multiple tests by Benjamini-Hochberg, of $p < 0.05$) (Figure 6A).

To ensure the observed changes in gene expression in the absence of Nut were not due to changes in the cell-type composition of the *Nut* KO round and elongating cell fraction compared to the same fraction of wild-type cells, we performed an additional analysis. By comparing wild-type meiotic and post-meiotic cell populations, we identified genes that are normally activated in wild-type post-meiotic cells. The observation that only a fraction of these genes was downregulated in *Nut* KO post-meiotic cells was supportive of a specific action of Nut on gene

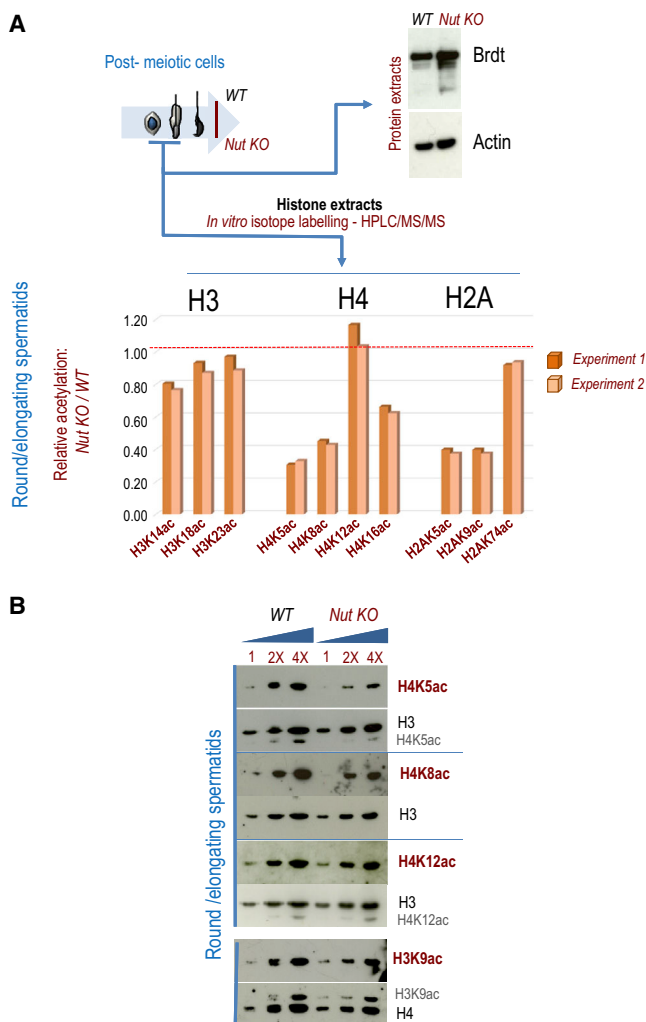


Figure 5. Nut Sustains Histone H4 Hyperacetylation in Spermatids
(A) Spermatogenic cell suspensions from wild-type and *Nut KO* testes were fractionated to prepare cell suspensions enriched in round and elongating spermatids. In one experiment, the corresponding extracts were used to detect Brdt and actin as indicated. In another experiment, histone extracts from these fractions (wild-type and *Nut KO*) were analyzed by *in vitro* isotopic labeling followed by HPLC-MS/MS. The relative abundance of identified site-specific acetylation was determined and expressed as the ratio *Nut KO*/wild-type. H3, H4, H2B, and H2A peptides were used to normalize the *Nut KO*/wild-type samples. For more information on the normalization process, refer to [Table S2](#) and its legend and to [Quantification of Histone PTMs](#).
(B) Independent cell fractionation experiments were set up to prepare extracts from round and elongating spermatid-enriched fractions. Increasing amounts of extracts (1×, 2×, and 4×) were used for immunoblots as indicated. H4K5ac, H4K8ac, and H4K12ac were visualized with the corresponding specific antibodies in wild-type and *Nut KO* cell extracts as indicated. Each of these blots was re-probed with anti-H3 antibody as indicated. H3K9ac was also detected (lowest panel) and the corresponding blot was re-probed with anti-H4 antibody (the remaining H4K5ac, H4K12ac, and H3K9ac signals after anti-H3 and anti-H4 re-probing are indicated in gray letters).

expression as opposed to the loss of particular cell types. The expression of a significant number of the genes, 317, including the *Prr1*-encoding gene, that are normally activated in wild-

type post-meiotic cells did not significantly change in the absence of Nut ([Figures S4A and S4B](#)), demonstrating that our transcriptomic data from wild-type and *Nut KO* spermatids could be compared, because they were obtained from two comparable cell populations.

We then used a series of stage-specific transcriptomes that were produced in wild-type male germ cells from our previous studies ([Boussouar et al., 2014](#); [Montellier et al., 2013](#)) and the present work to establish the normal pattern of these Nut-regulated genes during spermatogenesis. [Figure S4C](#) shows that the genes that require Nut to be active (downregulated genes in *Nut KO*) are normally activated in post-meiotic cells, with the highest activity in late round and early elongating spermatids.

In a previous work, we identified genes that are specifically responsive to post-meiotic p300 and/or CBP variations in spermatids ([Boussouar et al., 2014](#)). We used these data to define whether Nut regulates gene expression through p300 and/or CBP by comparing our two Nut- and p300 and/or CBP-dependent transcriptomes, both obtained in comparable post-meiotic cell populations. We looked for a significant enrichment of Nut-regulated genes in the lists of p300 and/or CBP-regulated genes, which would suggest the involvement of p300 and/or CBP in gene regulation by Nut. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to look for the expression in *Nut KO* spermatids of genes whose expression in spermatids had previously been found to be affected by a targeted post-meiotic deletion of *p300* and *CBP* ([Boussouar et al., 2014](#)). Although following this latter approach, the inheritance of both p300 and CBP from preceding stages led to only a small decrease in the enzyme levels in post-meiotic cells, it was enough to observe a change in the expression of a specific set of genes whose expression is highly dependent on, and sensitive to, p300 and CBP dosage ([Boussouar et al., 2014](#)).

[Figure 6B](#) shows a clear enrichment of the p300 and/or CBP-regulated genes among the genes up- and downregulated in *Nut KO* mice, supporting the idea that Nut-p300 and/or CBP, while directing the global histone acetylation, also affects the expression of late active genes before the general shutdown of transcription in elongating spermatids.

p300 and/or CBP Are the Only Acetyltransferases Present in the Nut Interactome

The question arises of whether Nut uses CBP and p300 in spermatids as it does in NMC cells or if other HATs are also involved. To answer this question, in an additional set of experiments, we prepared extracts from fractionated wild-type and *Nut KO* round and early elongating spermatids, which were submitted to anti-Nut immunoprecipitation and a proteomic analysis in two independent assays.

The aim of this experiment was two-fold: first, to confirm the presence of p300 and CBP in association with Nut, and second, to see whether additional cellular acetyltransferases interact with Nut in post-meiotic cells undergoing histone hyperacetylation. To maximize the chance of detecting any HAT associated with Nut, we used non-stringent immunoprecipitation conditions and performed the experiment twice on independent mice and fractionated cells. As expected from non-stringent immunoprecipitation conditions, many proteins were identified as

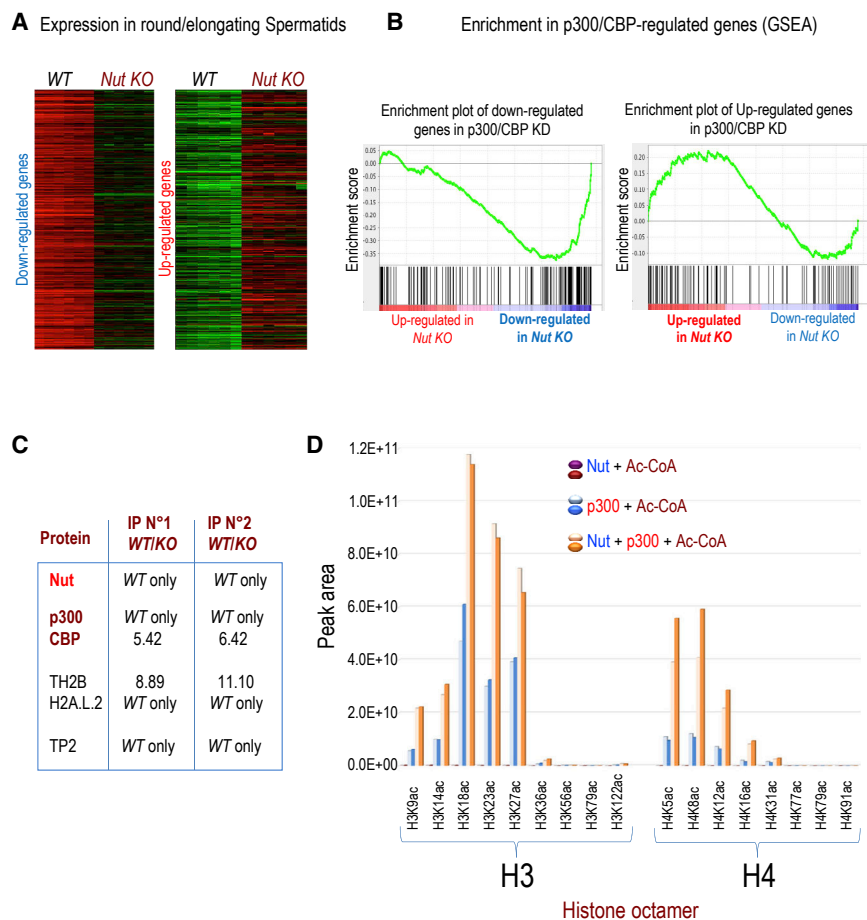


Figure 6. Nut Is Involved in the Control of Gene Expression by p300 and/or CBP and Uses p300 to Acetylate Histones

(A) Round and elongating spermatid fractions were obtained as in Figures 5A and 5B, but this time RNA was purified and used to compare the transcriptomes of *Nut* KO cells and wild-type cells. The heatmaps show genes that are down-regulated (left panel, $n = 1,184$) and upregulated (right panel, $n = 499$) in *Nut* KO compared to wild-type round and elongating spermatids. See Figure S4 and its legend.

(B) Gene set enrichment analysis (GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) in the *Nut* KO versus wild-type transcriptomic experiment (obtained in A) was performed for two lists of genes (used as gene sets) previously established as downregulated or upregulated in round and elongating spermatids after the conditional post-meiotic knockout of *p300* and *CBP* (Boussouar et al., 2014). Genes that are down- or upregulated after double *p300* and/or *CBP* KO are significantly enriched in genes that are, respectively, down- or upregulated in *Nut* KO spermatids.

(C) Spermatogenic cell fractions identical to those shown in (A) and Figure 5 were used to perform the immunoprecipitation of Nut. Mass spectrometry was then used to identify Nut-associated proteins, meaning proteins present or significantly enriched in the wild-type cell extracts and absent from *Nut* KO cell extracts. The wild-type/KO ratio of proteins corresponding to the only identified HATs (*p300* and *CBP*), as well as proteins known to be involved in histone-to-protamine replacement, is shown. The indicated values represent protein enrichment in wild-type cell immunoprecipitations over *Nut* KO. The list of identified

proteins functionally linked to chromatin and/or transcription and/or RNA and/or metabolism is presented in Table S3.

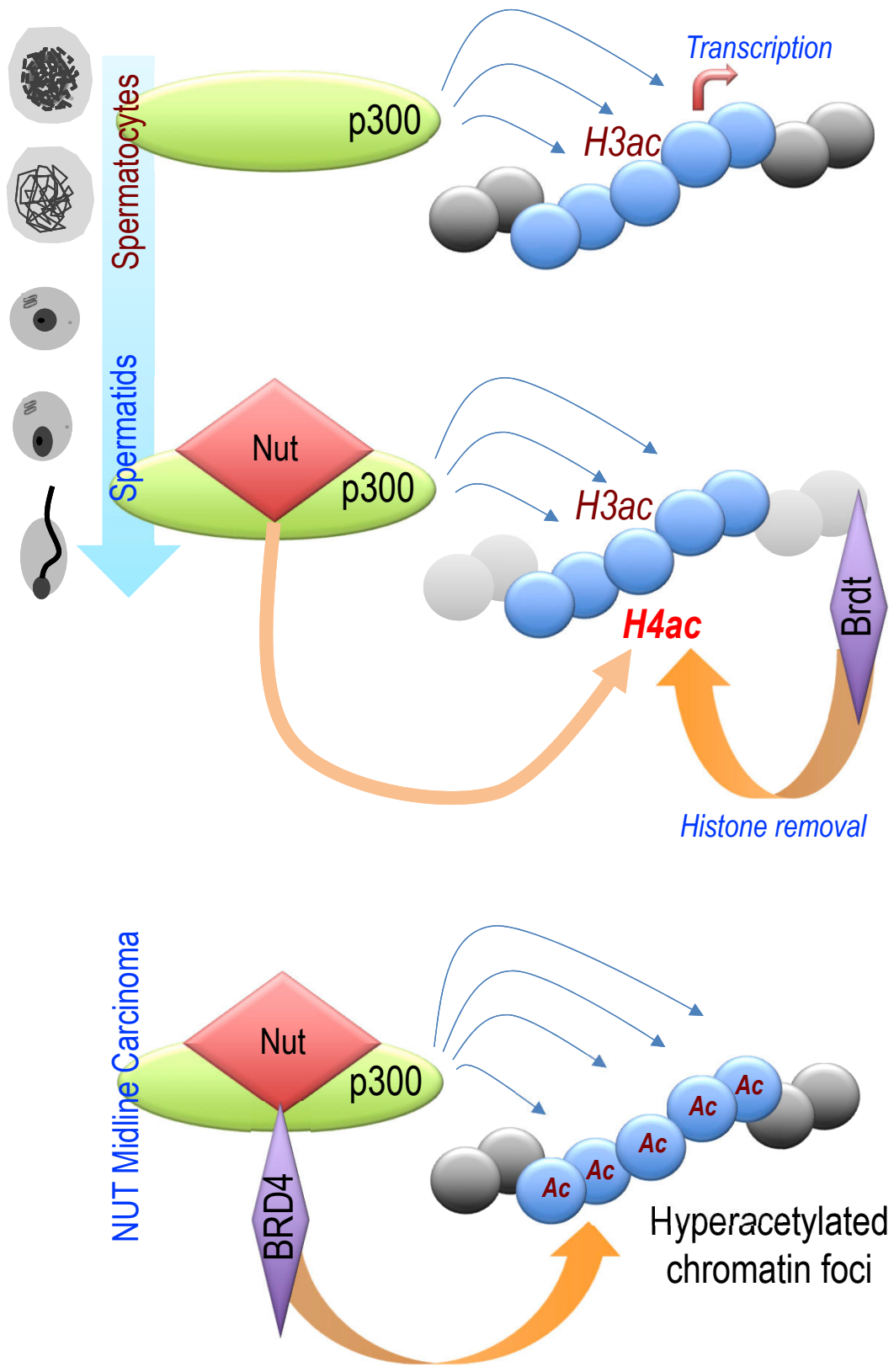
(D) Reconstituted histone octamers were incubated with acetyl-CoA, as well as purified *p300* (residues 340–2,094: *p300*_{short}) and the *p300*-interacting domain of NUT as indicated. HPLC-MS/MS was used to quantify site-specific H3 and H4 acetylation by label-free quantification *in vitro*. Five high-abundance unmodified peptides were used to normalize the amount of each histone. The peak area of histone octamer was then normalized, and the data corresponding to two experiments are shown (with different color codes as indicated). See related Figure S5.

specifically enriched in *Nut* wild-type cells and were observed in both experiments. However, in an effort to focus on proteins relevant to the present study, especially HATs, we chose to highlight the transcription and/or chromatin and/or RNA and/or metabolism-related proteins. Table S3 lists the proteins that were only found in the wild-type cell extracts or enriched at least 5 times in these extracts compared to *Nut* KO cell extracts. Despite the non-stringent immunoprecipitation conditions, *p300* and *CBP* were the only known HATs found to be exclusively or significantly enriched in the Nut immunoprecipitates in wild-type extracts compared to *Nut* KO extracts (Figure 6C). In the Nut-dependent proteome, we also found TH2B-H2A.L.2 and transition protein 2 (TP2), shown to allow protamines to efficiently invade nucleosomes at the time of histone-to-protamine replacement (Barral et al., 2017) (Figure 6C). Because the generation of these nucleosomal transitional states also involves H4 acetylation and Brdt's BD1, these findings reinforce the hypothesis that Nut could also be a player in the process of acetylation-dependent histone replacement.

A proteomic analysis of BRD4-NUT fusion partners from a human cell line generated similar data, with *p300* and *CBP* as the only BRD4-NUT-associated HATs (Alekseyenko et al., 2017), confirming our early finding that *p300* and *CBP* are the major HAT partners of NUT (Reynoird et al., 2010). Altogether, these data are in agreement with our comparative transcriptomic analysis (Figure 6B), pointing to *p300* and/or *CBP* as the only cellular HAT partners of Nut.

Nut Enhances p300-Induced H3 and H4 Acetylation

We previously demonstrated that *p300* interacts with a specific fragment of NUT, which stimulates its HAT activity on purified histone H3 (Reynoird et al., 2010). Here, to have a comprehensive vision of the action of Nut on histone acetylation, and more specifically to evaluate the action of NUT on site-specific histone acetylation by *p300*, we incubated purified recombinant *p300* with the *p300*-interacting fragment of NUT and histone octamers (Figure S5). Isotopic labeling following HPLC-MS/MS was used to quantitatively measure the impact of NUT on



(legend on next page)

p300-mediated histone H3 and H4 acetylation. In histone octamers, p300 more efficiently acetylated histone H3 compared to histone H4 (p300 + Ac-coenzyme A [CoA]) (Figure 6D). For both histones, acetylation occurred at the tails, with no significant acetylation of the internal lysines (Figure 6D). The addition of the p300-interacting fragment of NUT enhanced H3 and H4 tail acetylation (Figure 6D; Tables S4 and S5; Figure S5). These data were confirmed after independent HAT assays following immunodetection with two site-specific antibodies against H3K9ac and H4K5ac (Figures S5B and S5C).

Altogether, these data show that Nut directly recruits p300 and/or CBP to control both histone H3 and H4 acetylation, although *in vivo*, in early elongating spermatids, the most important impact is observed on H4 acetylation. In contrast to the action of Nut on H3 and H4 acetylation observed *in vitro* (Figure 6D), although the absence of Nut affected H4 acetylation in round and elongating spermatids, none of the considered H3 acetyl acceptor sites seemed to be significantly affected by the absence of Nut (Figure 5).

DISCUSSION

Quantitative measurements of Nut-dependent histone acetylation in round and early elongating spermatids reported here demonstrated that Nut has a histone-specific and site-specific action on chromatin acetylation, particularly targeted on H2A and H4, including H4K5 and H4K8 acetylation.

A wave of histone hyperacetylation had long been described in elongating spermatids. In this context, H4 acetylation seems to play a central role, because it provides a specific binding site for the essential factor involved in histone removal, Brdt (Gouzarzi et al., 2014, 2016).

All investigations reported here point to p300 and/or CBP as major HATs, which in addition to a role in maintaining a basal acetylation of H3, become involved in H4 hyperacetylation in post-meiotic cells because of the expression of Nut. However, an important question was whether Nut could control the activity of other HATs in post-meiotic spermatogenic cells to direct the observed H4 hyperacetylation. Our Nut interactomic analysis shows that p300 and CBP are the only cellular Nut-interacting HATs. In an immunopurification of BRD4-NUT followed by mass spectrometry identification of the associated proteins, p300 and CBP were the only HATs found in a complex with BRD4-NUT in somatic cells (Alekseyenko et al., 2017), which highlights the conserved mode of action of Nut both in spermatogenic cells and after its ectopic expression in NMC cancer cells.

Although the action of Nut on H4 acetylation seems to be dramatic, its transcriptional regulatory role only concerns a subset of genes expressed in transcriptionally active late spermatids. Our data show that in round and early elongating spermatids,

most Nut-regulated genes are those previously found to be highly sensitive to the cellular levels of p300 and CBP in elongating spermatids before the transcriptional shutdown (Bousouar et al., 2014). It is therefore possible that the enhancement of H4 acetylation by Nut-p300 and/or CBP, in addition to the basal role of these HATs in H3 acetylation (Figure 6) in elongating spermatids, in preparation for histone replacement, stimulates a subset of genes that are normally active immediately before the general transcriptional inactivation.

These data therefore depict Nut's function in post-meiotic germ cells. Nut appears as a stimulator of p300 and CBP, which, in addition to H3 acetylation that normally occurs in spermatogonia and spermatocytes, drives cell-type-specific H4 hyperacetylation in post-meiotic cells in preparation for histone eviction. This gene is exclusively expressed in cells in which global H4 hyperacetylation naturally occurs, strongly supporting this conclusion. In agreement with a role of histone hyperacetylation in histone removal and a role of Nut in H4 hyperacetylation, we observed that in the absence of Nut, the acetylation of histone H4 is downregulated and histone removal is impaired.

The similarity of phenotypes between *Nut* KO and *BrdtdeltaBD1/deltaBD1* mouse models also supports a role of Nut in histone acetylation that occurs upstream of histone removal. In both cases, although TPs and protamines are produced, they are unable to replace histones. This observation strongly suggests that Nut and Brdt function in the same molecular pathway, leading to histone-to-protamine replacement. The molecular mechanism linking Nut activity to histone acetylation, specifically that of H4K5 and H4K8, explains how Nut and Brdt are functionally related. In *Nut* KO-elongating spermatids, because of insufficient acetylation of H4, Brdt's BD1 remains non-functional, leading to the same phenotype as observed in *BrdtdeltaBD1/deltaBD1* cells.

These studies also place Nut at the heart of the molecular mechanisms controlling histone-to-protamine replacement. Nut could link histone hyperacetylation to histone exchange and nucleosome invasion by protamines (Barral et al., 2017). Our Nut-interactomic approach also identified TH2B, H2A.L.2, and TP2 as Nut partners. Therefore, p300 could be part of a machinery that would couple histone H4 acetylation, Brdt binding, and the exchange of TH2B-H2A for TH2B-H2A.L.2 in a series of events that are essential for nucleosome opening and TP-controlled protamine invasion of nucleosomes and histone replacement (Barral et al., 2017). In agreement with this hypothesis, published data have reported the ability of p300 to cooperate with Nap1 to mediate nucleosome disassembly (Asahara et al., 2002; Luebben et al., 2010; Sharma and Nyborg, 2008).

Therefore, at the time of p300-Nut interaction and histone H4 hyperacetylation, nucleosomes adopt an increasingly open configuration and are largely remodeled. It is possible that under these conditions, histone accessibility to HATs such as p300 becomes similar to that of histones in octamers rather than histones

Figure 7. Model for the Cooperation between Nut-p300 and/or CBP-BET in Physiological and Pathological Settings

Along spermatogenesis, the ubiquitous HATs p300 and/or CBP drive transcription, mainly through histone H3 acetylation. Upon its expression in late round and elongating spermatids, Nut interacts with p300 and/or CBP and stimulates its HAT activity, leading to a genome-wide increase in H4 acetylation, specifically at H4K5 and H4K8. Brdt uses its first bromodomain to recognize the two indicated sites on H4 to bind chromatin and to eventually replace histones (upper panel). In NMC cells, where a chromosomal translocation fuses *BRD4* to *NUT*, p300 recruitment by the fusion protein creates an obligatory functional loop involving cycles of NUT-stimulated histone acetylation and BRD4-NUT binding (lower panel).

in regular nucleosomes. In our *in vitro* HAT assays, histone octamers were used instead of nucleosomes. In our hands, nucleosomes seemed to be poor substrates for p300. However, in spermatids *in vivo*, in contrast to our *in vitro* conditions, Nut seems to be indispensable for H4 acetylation, whereas its absence seems to have only minor effects on H3 acetylation. It is possible that *in vivo*, in spermatids, H3 acetylation is inherited from earlier stages and that only H4 acetylation occurs *de novo* at the time of Nut synthesis. This hypothesis is in good agreement with our previous observations that in post-meiotic cells, CBP and p300 are mostly inherited from earlier stages (Boussouar et al., 2014). This possibility could therefore explain why *in vivo* Nut only affects H4 acetylation, which occurs *de novo* in these cells, while most H3 acetylation comes from the preceding stages (Figure 7).

Hence, our data support the hypothesis that Nut is a factor required by CBP and p300 to include H4 as a substrate *in vivo* and ensure H4 hyperacetylation in spermatids. In contrast, its impact on the level of H3 acetylation *in vivo* is relatively modest, because these enzymes already efficiently acetylate H3 in male germ cells at earlier stages of spermatogenesis (Figure 7).

In summary, we found that Nut's major function is to direct histone H4 hyperacetylation, leading to the cooperative action of p300, CBP, and the BET factor Brdt in haploid male germ cells. In NMC cells, a chromosomal translocation induces NUT-mediated forced cooperation between p300 and/or CBP and BRD4 to induce hyperacetylated histone chromatin foci (Figure 7). An extension of this work would be to explore the similarities between NMC cells and elongating spermatids. Rescue experiments with *Nut* re-expression under the control of different promoters, active at earlier stages of spermatogenesis, could be performed in the context of mice bearing *Nut* KO alone or both *Nut* KO and *Brat*^{deltaBD1/deltaBD1}, which would demonstrate the cooperation between Nut and BD1 in the process of histone hyperacetylation.

This work also highlights a concept that cells can use particular auxiliary factors in a tissue- and cell-type-specific manner to enhance the activity of chromatin-modifying enzymes that are ubiquitously expressed and thus achieve a large-scale, tissue-specific chromatin modification such as H4 hyperacetylation in post-meiotic spermatogenic cells. The ectopic activation of such factors could initiate an oncogenic molecular circuit as it does in NMC cells expressing the BRD4-NUT fusion protein.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Animal care and breeding
 - Generation of Mouse: B6.129/SvPas-*nutm1*^{KO/KO} (*Nut* KO)
- METHOD DETAILS
 - Epididymis and testis histology
 - Round and early elongating spermatids enrichment
 - Histone preparation
 - RNA preparation and transcriptomics

- Protein sample preparation, western blotting
- Immunofluorescence Analysis
- Antibodies' Dilutions
- Recombinant protein expression
- *In vitro* Histone acetyltransferase assays
- Proteomics of histone modifications
- Proteomics of Nut interactome
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS
 - Statistics and quantifications
 - Nucleosomal DNA length determination
- DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY
 - Data Resources
- ADDITIONAL RESOURCES
 - Anti Nut-purified antibody

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures and five tables and can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.069>.

ACKNOWLEDGMENTS

The S.K. laboratory is supported by a grant from the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM), "analyse bio-informatique pour la recherche en biologie" program, as well as by the ANR Episperm3 program and by INCA libre program (RPT13001CCA). Additional support came from the Université Grenoble Alpes (ANR-15-IDEX-02) LIFE and SYMER programs, as well as from Fondation ARC "Canc'air" project (RAC16042CLA) and Plan Cancer (CH7-INS15B66 and ASC16012CSA). Z.I. and D.P. were supported by a Worldwide Cancer Research foundation grant (16-0280) to D.P. H.S. was a recipient of a Marie Curie Initial Training Network funded by European Commission (FP7-PEOPLE-2011-ITN and PITN-GA-289880) for 3 years and then supported by La Ligue Nationale Contre Le Cancer for a 4th year of PhD pursuit. G.C. is a bioinformatic expert benefiting from a FRM fellowship. Mice were bred in the High Technology Animal Facility (PHTA) of Grenoble University with the help of Natacha Pitoun and Kevin Escot. The TGML Platform is supported by grants from Inserm, GIS IBI SA, and Aix-Marseille Université (ANR-10-INBS-0009-10). We are grateful to Hortense Vachon for her help with library preparation and sequencing. The proteomic analyses were partially supported by the French National Research Agency ProFi grant (ANR-10-INBS-08-01). P.F. and S.P. were supported by a Wellcome Trust Cancer Development Fellowship (095751/Z/11/Z). Y.C. thanks the support of the discovery platform and informatics group at EDyP. Most computations presented in this paper were performed using the GRICAD infrastructure (<https://gricad.univ-grenoble-alpes.fr>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.S., S.B., and T.B. performed most experiments. M.T., M.Z., and Y.Z. performed quantitative measurements of *in vivo* and *in vitro* histone acetylation. F.B., T.B., and N.R. designed the *Nut* KO strategy and prepared the necessary materials and controlled the various steps toward mouse production, which was carried out in the M.G. laboratory. Y.C. performed the characterization of the Nut interactome. A.G., Z.I., and D. Panne performed recombinant p300 purification and *in vitro* HAT assays. S.P. and P.F. did Nut fragment purification for anti-Nut antibody production. L.B. constructed and sequenced the library for micrococcal nuclease sequencing (MNase-seq) experiments. G.C., D. Puthier, F.C., E.B.-F., and S.R. performed the bioinformatics analyses. S.K. conceived and coordinated the project and wrote the manuscript. All authors discussed the data and read and commented on the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

Y.Z. is a shareholder and a member of the scientific advisory board of PTM BioLabs, Co. (Chicago). The other authors declare no competing interests.

Received: April 20, 2018
Revised: July 19, 2018
Accepted: August 23, 2018
Published: September 25, 2018

REFERENCES

- Alekseyenko, A.A., Walsh, E.M., Wang, X., Grayson, A.R., Hsi, P.T., Kharchenko, P.V., Kuroda, M.I., and French, C.A. (2015). The oncogenic BRD4-NUT chromatin regulator drives aberrant transcription within large topological domains. *Genes Dev.* 29, 1507–1523.
- Alekseyenko, A.A., Walsh, E.M., Zee, B.M., Pakozdi, T., Hsi, P., Lemieux, M.E., Dal Cin, P., Ince, T.A., Kharchenko, P.V., Kuroda, M.I., and French, C.A. (2017). Ectopic protein interactions within BRD4-chromatin complexes drive oncogenic megadomain formation in NUT midline carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, E4184–E4192.
- Asahara, H., Tartare-Deckert, S., Nakagawa, T., Ikehara, T., Hirose, F., Hunter, T., Ito, T., and Montminy, M. (2002). Dual roles of p300 in chromatin assembly and transcriptional activation in cooperation with nucleosome assembly protein 1 *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2974–2983.
- 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.
- Boussouar, F., Goudarzi, A., Buchou, T., Shiota, H., Barral, S., Debernardi, A., Guardiola, P., Brindle, P., Martinez, G., Arnoult, C., et al. (2014). A specific CBP/p300-dependent gene expression programme drives the metabolic remodelling in late stages of spermatogenesis. *Andrology* 2, 351–359.
- Buchou, T., Tan, M., Barral, S., Vitte, A.-L., Rousseaux, S., Arechaga, J., and Khochbin, S. (2017). Purification and analysis of male germ cells from adult mouse testis. *Methods Mol. Biol.* 1510, 159–168.
- Casabona, M.G., Vandenbrouck, Y., Attree, I., and Couté, Y. (2013). Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 13, 2419–2423.
- Chen, Y., Kwon, S.W., Kim, S.C., and Zhao, Y. (2005). Integrated approach for manual evaluation of peptides identified by searching protein sequence databases with tandem mass spectra. *J. Proteome Res.* 4, 998–1005.
- French, C.A. (2012). Pathogenesis of NUT midline carcinoma. *Annu. Rev. Pathol.* 7, 247–265.
- Garcia, B.A., Mollah, S., Ueberheide, B.M., Busby, S.A., Muratore, T.L., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2007). Chemical derivatization of histones for facilitated analysis by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* 2, 933–938.
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J.* 277, 599–604.
- Gaucher, J., Boussouar, F., Montellier, E., Curtet, S., Buchou, T., Bertrand, S., Hery, P., Jounier, S., Depaux, A., Vitte, A.-L., et al. (2012). Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J.* 31, 3809–3820.
- Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2014). Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J. Mol. Biol.* 426, 3342–3349.
- Goudarzi, A., Zhang, D., Huang, H., Barral, S., Kwon, O.K., Qi, S., Tang, Z., Buchou, T., Vitte, A.-L., He, T., et al. (2016). Dynamic competing histone H4 K5K8 acetylation and butyrylation are hallmarks of highly active gene promoters. *Mol. Cell* 62, 169–180.
- Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombining-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome Res.* 13, 476–484.
- Luebben, W.R., Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2010). Nucleosome eviction and activated transcription require p300 acetylation of histone H3 lysine 14. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19254–19259.
- Luger, K., Rechsteiner, T.J., and Richmond, T.J. (1999). Expression and purification of recombinant histones and nucleosome reconstitution. *Methods Mol. Biol.* 119, 1–16.
- Miller, T.C.R., Simon, B., Rybin, V., Grötsch, H., Curtet, S., Khochbin, S., Carlomagno, T., and Müller, C.W. (2016). A bromodomain-DNA interaction facilitates acetylation-dependent bivalent nucleosome recognition by the BET protein BRDT. *Nat. Commun.* 7, 13855.
- 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.
- Morinière, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-López, M., Curtet, S., Vitte, A.-L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., et al. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664–668.
- Panne, D., McWhirter, S.M., Maniatis, T., and Harrison, S.C. (2007). Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation-dependent switch. *J. Biol. Chem.* 282, 22816–22822.
- Reynoird, N., Schwartz, B.E., Delvecchio, M., Sadoul, K., Meyers, D., Mukherjee, C., Caron, C., Kimura, H., Rousseaux, S., Cole, P.A., et al. (2010). Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. *EMBO J.* 29, 2943–2952.
- Sasaki, K., Ito, T., Nishino, N., Khochbin, S., and Yoshida, M. (2009). Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 16257–16262.
- Schwartz, B.E., Hofer, M.D., Lemieux, M.E., Bauer, D.E., Cameron, M.J., West, N.H., Agoston, E.S., Reynoird, N., Khochbin, S., Ince, T.A., et al. (2011). Differentiation of NUT midline carcinoma by epigenomic reprogramming. *Cancer Res.* 71, 2686–2696.
- Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. (2007). The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 134, 3507–3515.
- Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2008). The coactivators CBP/p300 and the histone chaperone NAP1 promote transcription-independent nucleosome eviction at the HTLV-1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7959–7963.
- Vizcaíno, J.A., Csordas, A., del-Toro, N., Dianas, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., et al. (2016). 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44 (D1), D447–D456.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit polyclonal anti-Nut	This paper	N/A
Mouse monoclonal anti-Actin	Sigma	Cat#A5441; RRID: AB_476744
Rabbit polyclonal anti-Brdt	Shang et al., 2007	N/A
Mouse monoclonal anti-H3K9ac	Active Motif	Cat#61251
Mouse monoclonal anti-H4K5ac	Active Motif	Cat#61523
Rabbit polyclonal anti-H4K5ac	Abcam	Cat#ab51977
Rabbit polyclonal anti-H4K8ac	PTM Biolabs	Cat#120
Rabbit polyclonal anti-H4K12ac	Active Motif	Cat#39165; RRID: AB_2615076
Rabbit polyclonal anti-H3	Abcam	Cat#ab1791; RRID: AB_302613
Rabbit polyclonal anti-TH2B	Abcam	Cat#ab61245
Goat polyclonal anti-TP2 (K18)	Santa Cruz	Cat#SC-21106; RRID: AB_2206859
Mouse monoclonal anti-Prm2	Briar Patch Biosciences	Cat#HUP2B; RRID: AB_2687949
Rabbit polyclonal anti-TP1	Gift by S. Kistler	N/A
Rabbit polyclonal anti-H4	Abcam	Cat#ab10158; RRID: AB_296888
Mouse monoclonal anti-Protamine P1	Briar Patch Biosciences	Cat#HUP1N; RRID: AB_2651186
Lectin PNA Alexa Fluor 647 conjugate	Life Technologies	Cat#L32460
Bacterial and Virus Strains		
EMBAC-Y baculovirus	This paper	https://geneva-biotech.com/product_category/insect-cell-expression/multibac/
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Complete Protease Inhibitor EDTA-free	Sigma-Aldrich	Cat#4693159001
n-Butyric Acid	Sigma-Aldrich	Cat#B-2503
Nicotinamide	Sigma-Aldrich	Cat#N-3376
nProtein A Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare	Cat#17-5280-01
Trichloroacetic Acid Solution	Sigma-Aldrich	Cat#T-0699
Deposited Data		
MNase-Seq: Gene Expression Omnibus accession number: GSE111931	This paper	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE111931
Raw mass spectrometry proteomics: ProteomeXchange consortium via the PRIDE partner repository; accession number: PXD008727	This paper	http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PX008727
Mendeley Data	This paper	https://data.mendeley.com/datasets/9xt8rgn265/draft?a=1653d1d4-ee86-4c50-b465-8ee1a0fc283a
Illumina expression raw and normalized data: Gene Expression Omnibus accession number: GSE118969	This paper	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE118969
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: B6.129/SvPas- <i>nutm1</i> KO/KO	This paper	N/A
Oligonucleotides		
RT-qPCR <i>Nut</i> forward primer: ACCTCGGATTATGGCATCAG	This paper	N/A
RT-qPCR <i>Nut</i> reverse primer: GCCAGTGCCAGGTTTCAT	This paper	N/A
Genotyping <i>Nut</i> wild-type forward primer: ACACAAGCAACAACCATGGA	This paper	N/A

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Genotyping <i>Nut</i> KO forward primer: AGAGGAAGTCTCCCAGCCTT	This paper	N/A
Genotyping <i>Nut</i> wild-type and KO reverse primer: TCTGGATTCATCGACTGTGG	This paper	N/A
Southern blot <i>Nut</i> probe forward: AAATACATGGTGGGCAGGAA	This paper	N/A
Southern blot <i>Nut</i> probe reverse: ACAGTCCTGGGCTGAGAGAA	This paper	N/A
Recombinant DNA		
cDNA sequence encoding residues 347-588 (NUT-F1C fragment) cloned in pETM30 vector with a TEV cleavable N-terminal glutathione S-transferase (GST) tag	This paper	EMBL
Software and Algorithms		
Bowtie2 v2.2.9	NA	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
Samtools v1.3.1	NA	http://samtools.sourceforge.net/
DeepTools v2.2.4	NA	https://github.com/fidelram/deepTools
GSEA	Broad Institute	http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp
DANPOS v2.2.2	NA	https://sites.google.com/site/danposdoc/
R v3.3.1	R Development Core Team	https://cran.r-project.org/
Snakemake v3.9.0	NA	https://snakemake.readthedocs.io/en/latest/
Fastx-toolkit v0.0.13	NA	http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html
Xcalibur 2.1	Thermo Scientific	OPTON-20487
Mascot Distiller	Matrix Science	Version 2.6.0
Mascot Server	Matrix Science	Version 2.6.0
Proline	Open source	http://www.profipteomics.fr/proline

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Saadi Khochbin (saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animal care and breeding

Mice were housed in the Grenoble High Technology Animal Facility (PHTA, University Grenoble Alpes). For this study no experimentation was required on live animals. Mice were euthanized following a procedure approved by the official ethic committee of the University Grenoble Alpes (COMETH, C2EA-12) and all of the investigators directly involved in care and breeding have an official animal-handling authorization obtained after 2 weeks of intensive training and a final formal evaluation.

Generation of Mouse: B6.129/SvPas-*nutm1*^{KO} / *KO* (*Nut* KO)

The *nutm1*^{KO} (*Nut*^{KO}) allele was constructed as follows using the gap-repair recombineering technique adapted from (Liu et al., 2003). An 11.3-kb DNA fragment encompassing exons 1, 2, and 3 (4.7-kb upstream and 6.6-kb downstream of the start codon) of the *Nut* gene was retrieved from a BAC (bMQ 235110, CHORI) into the Spel-linearized PL253 retrieval plasmid after induction of recombination in SW102 electro-competent cells. Two ~0.3-kb fragments surrounding the exon 2 of the *Nut* gene (0.9-kb and 3.7-kb downstream of the start codon) were cloned into a PL452 plasmid upstream and downstream of a neomycin cassette, respectively. An *EcoRI* restriction site was inserted at the 3' end of the first fragment to facilitate the identification of the mutant allele. In order to generate the *Nut* KO targeting vector, a *Sall/NotI* fragment encompassing the neomycin cassette was purified from the *Nut* PL452-derived plasmid and cloned into the PL253 retrieval plasmid, containing the 11.3-kb DNA fragment of the *Nut* gene, after induction of recombination in SW102 cells and kanamycin selection. This strategy replaces the exon 2 of the *Nut* gene by a neomycin cassette. For gene targeting, 50 µg of *NotI*-linearized *Nut* KO targeting vector DNA (PL253) was electroporated (250V, 500 mF) into 10⁷ AT1 embryonic stem cells (ESC) grown on mitomycin C-inactivated mouse embryo fibroblasts. Colonies were positively

and negatively selected in ESC medium with neomycin and ganciclovir, respectively. One hundred neomycin-resistant clones were picked and analyzed by Southern blotting using *EcoRI* digests with a 3' external probe to check for homologous targeting (see [Figure S2](#)). Three selected ES clones were then used to generate the corresponding mouse model (Mouse B6.129/SvPas-*nutm1 KO/KO*).

Studies were carried out on male adult mice (3 to 10 months old), except for [Figures 1A](#) and [1B](#), where prepubertal male mice were used from day post-partum 6 to day post-partum 50.

METHOD DETAILS

Epididymis and testis histology

Six micrometre paraffin-embedded formalin-fixed cauda epididymis sections were stained with hematoxylin. Testis sections were either processed for DAPI staining or Protamine 1 immunostaining. For details see ([Gaucher et al., 2012](#)) and ([Barral et al., 2017](#)).

Round and early elongating spermatids enrichment

Fractions enriched in spermatogenic cells at different stages of maturation, including post meiotic round and early elongating spermatids were obtained by sedimentation on a BSA gradient as detailed in a recent dedicated method publication ([Buchou et al., 2017](#)).

Histone preparation

Histone extraction was performed on germ cell nuclei of enriched round and early elongating spermatids, using 0.2 M H₂SO₄ at 4°C for 16 h followed by centrifugation at 16,000 x *g* for 10 min at 4°C to isolate solubilized histones. For germ cell preparation, see ([Buchou et al., 2017](#)). Histone precipitation was performed with TCA, 20% final concentration, added drop by drop for 30 min at 4°C and centrifuged at 16,000 x *g* for 10 min to obtain histone pellets. The pellets were washed once with cold acetone with 0.1% HCl, and twice with cold acetone. Precipitates were dried completely at room temperature.

RNA preparation and transcriptomics

RNA from testes harvested at various times after birth or from enriched round and early elongating spermatids was extracted in Trizol reagent followed by purification using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN; for details, see ([Buchou et al., 2017](#))). RNA was used on Illumina mouse whole-genome chip as performed in ([Gaucher et al., 2012](#)).

Protein sample preparation, western blotting

For total protein extracts, whole testes were homogenized in 8 M urea and sonicated at 250 J. Dried extracted histones were dissolved in 8 M urea. Protein dosage was assessed by Bradford assay. Western blots with SDS-PAGE were carried out using the antibodies listed in [Key Resource Table](#).

Immunofluorescence Analysis

Testes were frozen in liquid nitrogen and cut, and then gently pressed onto glass slides and air-dried. Slides were incubated in 90% ethanol during 15 min, and air-dried again. Slides were permeabilized in 0.5% saponine, 0.2% Triton X-100, and 1x PBS at room temperature during 15 min. Saturation was performed by incubating slides in 5% dry milk, 0.2% Tween 20, and 1x PBS at room temperature for 30 min. Primary antibodies, diluted in 1% dry milk, 0.2% Tween 20, and 1x PBS, were applied onto the slides, followed by overnight incubation in a humidified chamber at 4°C, and washed 3 x 5 min in the dilution buffer. The secondary antibodies, diluted at 1:500 in the same buffer, was then applied and the slides incubated in a humidified chamber for 30 min at 37°C, and then washed as previously. After counterstaining by DAPI, the slides were mounted in Dako fluorescent mounting medium.

Antibodies' Dilutions

Rabbit polyclonal anti-Nut: 1/500 (immunoblotting), 1/25 (immunofluorescence); Mouse monoclonal anti-Actin: 1/5000 (immunoblotting); Rabbit polyclonal anti-Brdt: 1/500 (immunoblotting); Mouse monoclonal anti-H3K9ac: 1/2000 (immunoblotting); Mouse monoclonal anti-H4K5ac: 1/500 (immunofluorescence); Rabbit polyclonal anti-H4K5ac: 1/2000 (immunoblotting); Rabbit polyclonal anti-H4K8ac: 1/2000 (immunoblotting); Rabbit polyclonal anti-H4K12ac: 1/1000 (immunoblotting); Rabbit polyclonal anti-H3: 1/5000 (immunoblotting); Rabbit polyclonal anti-TH2B: 1/1000 (immunofluorescence); Goat polyclonal anti-TP2 (K18): 1/250 (immunofluorescence); Mouse monoclonal anti-Protamine P1: 1/100 (immunohistochemistry and immunofluorescence); Rabbit polyclonal anti-H4: 1/1000 (immunoblotting); Rabbit polyclonal anti-TP1, 1/500 (immunofluorescence); Mouse monoclonal anti-Prm2: 1/100 (immunofluorescence).

For precise reference regarding antibodies, please see [Key Resource Table](#).

Recombinant protein expression

Expression and purification of Flag-tagged p300 protein (NCBI reference sequence: NM_001429.3) encoding residues 340–2094 was done as previously described ([Panne et al., 2007](#)). The procedure of p300 and NUT-p300 interacting fragment is as follows.

We used EMBA-C-Y baculovirus for p300 expression. The recombinant baculoviruses were propagated in Sf21 insect cells with Sf-900 III SFM medium (Invitrogen). Hi5 insect cells (Invitrogen) in Express Five SFM medium were infected with recombinant baculovirus at a multiplicity of infection of 2, maintained in shake flasks at 27°C and harvested by centrifugation 68–72 h post infection. Cells were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH 7.5, 500 mM NaCl, 5 microM ZnCl₂, 10 μl benzonase (SIGMA), Complete Protease Inhibitors EDTA-Free (Roche), 5% glycerol, 0.1% Tween) and sonicated. The lysate was clarified by centrifugation and applied to anti-Flag M2 affinity resin according to instructions by the manufacturer (Sigma). The resin was washed with the same buffer and the protein was eluted with buffer containing 0.2 mg/ml flag peptide and further purified by gel filtration on a Superdex 200 10/300 column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM HEPES buffer pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.5 mM TCEP and 5 microM ZnCl₂.

For NUT expression, cDNA sequence encoding residues 347–588 (NUT-F1C fragment) was cloned into the pETM30 vector (EMBL) with a TEV cleavable N-terminal glutathione S-transferase (GST) tag. The recombinant GST-NUT fusion protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in LB medium. Cell pellets were resuspended in buffer 1 containing 20 mM Tris pH 7, 300 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, Complete Protease Inhibitor EDTA-free (Roche) and sonicated. The lysate was clarified by centrifugation and applied to a Glutathione Sepharose 4 Fast Flow resin (GE Healthcare). The resin was washed with buffer 1 and the protein was eluted with buffer containing 20 mM Glutathione. The protein was further purified by gel filtration in buffer 1 on a Superdex 75 10/300 GL column (GE Healthcare).

Recombinant *Xenopus laevis* histones H2A, H2B, H3 and H4 were expressed, purified and refolded according to standard procedures (Luger et al., 1999). Histone octamers were assembled by mixing equimolar amounts of each histone subunit. After mixing H2A, H2B, H3 and H4, the sample was incubated for one hour on ice then run on Superdex 75 10/300 GL size exclusion column in refolding buffer (10 mM Tris pH 7.5, 2M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoethanol). All preparations were confirmed by SDS-PAGE and mass spectrometry.

In vitro Histone acetyltransferase assays

Histone octamer acetylation reactions were performed in acetylation buffer (20 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol and Complete Protease Inhibitor EDTA-free (Roche)) with 100 microM Acetyl-CoA, 2 μg of p300, 4 μg of purified histone octamers in the presence or absence of 4 μg of GST-NUT-F1C (p300:NUT, 1:10 molar stoichiometry). Control experiments were performed with NUT-F1C and histone octamers. The reactions were incubated for one hour at 30°C and stopped by addition of 1X SDS Laemmli buffer. The samples were then analyzed by SDS-PAGE and mass spectrometry.

Proteomics of histone modifications

Digestion and chemical derivatization

For histone peptides with no chemical derivatization, the sample was digested with trypsin at 37°C overnight. For stable chemical isotope labeling samples, chemical derivatization was carried out as described previously (Garcia et al., 2007). Twenty micrograms of each histone sample were propionylated with C₁₂ or C₁₃ propionic anhydride in buffer (100 mM NH₄HCO₃, 100 mM NaHCO₃, pH 8.0) at 37°C for one hour, and the propionylation reaction was then repeated. The sample was then digested with trypsin at 37°C overnight. After digestion, N-terminal of tryptic peptides were further propionylated with C₁₂ or C₁₃ propionic anhydride, respectively. The light and heavy labeling peptides were then mixed, and subjected to MS analysis.

Nano-HPLC-MS/MS analysis

Peptides were injected onto a manually packed reversed phase C18 column (170 mm × 79 microm, 3-microm particle size, Dikma, China) connected to an Easy-nLC 1000 chromatography system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Peptides were dissolved in solvent A (0.1% formic acid in 2% acetonitrile and 98% H₂O) and eluted using a 2-h gradient of 8% to 80% solvent B (0.1% formic acid in 90% acetonitrile and 10% H₂O) at a flow rate of 300 nl/min, and analyzed by an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). The full MS range was set from *m/z* 350 to 1800 with a resolution of 240,000 at *m/z* 400. For MS/MS scans, the twenty most intense ions with intensity greater than 5,000 and charge states of +1, +2, or +3 in each full MS spectrum were sequentially fragmented in a linear ion trap by collision-induced dissociation, using a normalized collision energy of 35%. The dynamic exclusion duration was set to 15 s, and the isolation window was 1.5 *m/z*. All histone samples were analyzed twice.

Mass spectrometric data analysis

All acquired MS raw files were transformed into MGF format by Proteome Discoverer software (version 1.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), then all MGF files were analyzed by Mascot software (version 2.3.01, Matrix Science Ltd., London, UK) against a mouse histone sequence database (94 sequences, 14,024 residues, updated on 05/07/2014) generated in-house from the UniProt database. For stable isotope labeling, propionyl (N-terminal of peptide), propionyl_C13 (N-terminal of peptide), propionyl (K), propionyl_C13 (K), propionylation-methylation (K), propionylation_C13-methylation (K), dimethyl (K), trimethyl (K), and acetyl (K) were specified as variable modifications. For histone peptides with no chemical derivatization, acetyl (K), methyl (KR), dimethyl (KR) and trimethyl (K) were specified as variable modifications. Other parameters for all analyses were specified as follows: mass error was ± 10 ppm for parent ions and ± 0.5 Da for fragment ions. The enzyme was specified as trypsin with a maximum of 5 missing cleavages. Peptide ion score cut-off was 20, and the spectra of all identified peptides were checked manually according to criteria reported previously to ensure the accuracy of peptide identification (Chen et al., 2005).

Quantification of histone PTMs

Identified peptides bearing modifications were manually quantified using the QualBrowser version 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific). Extracted ion chromatograms were constructed for each precursor *m/z* value with a mass tolerance of 10 ppm and mass precision up

to four decimal places. For stable isotope labeling, peak areas for a pair of heavy and light peptides with the same retention time interval were calculated. Precursor ion AUC of prDNIQGITKprPAIR for H4, prEIAQDFKprTDLR for H3, prIASEASR for H2B and prAGLQFPVGR for H2A were used to normalize the amount of each histone in stable isotope labeling quantification. For histone peptides with no chemical derivatization, precursor ion AUC of YRPGTVALR, STELLIR, EIAQDFK, DNIQGITKPAIR, ISGLIYEETR were used to normalize the amount of each histone. Two technical replicates were used to quantify histone marks.

For the identification and quantification of histone acetylation following *in vitro* HAT with p300, we followed the previously published procedure (Goudarzi et al., 2016). See also the legend of Figure 6D.

Proteomics of Nut interactome

Immunoprecipitation of Nut

Soluble extracts of enriched round and early elongating spermatids from wild-type and *Nut* KO mice (5.10^6 cells) were obtained in LSBD⁵⁰⁰ (50 mM HEPES pH 7, 3 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 20% Glycerol, 1 mM DTT, 100 ng/ml TSA, Protease Cocktail Inhibitor). Extracts were immediately diluted with an equal volume of LSBD⁰ (no KCl) buffer and incubated with 2.5 μg of purified anti-Nut antibody for 16h at 4°C followed by incubation with protein A Sepharose beads for 6h at 4°C under rotation. After two washing steps in LSBD²⁵⁰ (250 mM KCl) buffer and two with PBS, 1 mM DTT, 100 ng/ml TSA, Protease Cocktail Inhibitor, proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer. After separation in SDS-PAGE and staining in Coomassie blue, each sample was cut in 6 pieces for MS-based analyses.

Mass spectrometric data analysis

Proteins were in-gel digested using modified trypsin (Promega, sequencing grade) as previously described (Casabona et al., 2013). Resulting peptides were analyzed by online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific). For this, peptides were sampled on a 300 μm x 5 mm PepMap C18 pre-column and separated on a 75 μm x 250 mm C18 column (PepMap, Thermo Scientific). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Peptides and proteins were identified using Mascot (version 2.6.0) through concomitant searches against Uniprot (*Mus musculus* taxonomy, August 2017 version), classical contaminants database (homemade) and the corresponding reversed databases. The Proline software (<http://www.profipteomics.fr/proline>) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR < 1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, minimum peptide score of 25, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group) before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the different samples. Proteins were considered as potential partners of the bait if they were identified only in the positive co-IPs with a minimum of 3 specific spectral counts or enriched at least 5 times in positive co-IPs compared to control ones on the basis of weighted spectral counts.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaino et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD008727.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Statistics and quantifications

Figure 1A, the histograms show the average values of 4 experiments ± standard deviations.

Figure 2A, right panels, the histograms show the average values ± standard deviations of litter sizes and testis weights. The average litter sizes were obtained after crossing wild-type female mice with wild-type (n = 12) or *Nut* KO (n = 5) male mice. The average weights of testes of wild-type (n = 16) and *Nut* KO (n = 19) mice were determined.

Figure 4 shows the results of two independent experiments. For each experiment round spermatid fractions were prepared from 3 (wild-type) or 5 (KO) mice (6 to 10 testes).

Figures 5 and 6C each shows the results of two independent experiments. For each experiment round spermatid fractions were prepared from 5 (wild-type) or 7 (KO) mice (10 to 14 testes).

RNAs for transcriptomic analyses (Figure 6A) were prepared from three independent experiments corresponding to three independent cell fractionations for each genotype. For each fractionation, cell suspensions from testes from two wild-type mice or three *Nut* KO mice were used. For each genotype (wild-type and *Nut* KO), 6 samples were prepared as follows. Samples 1, 2 and 3 were directly prepared from the three above-mentioned fractionations and three additional samples were obtained by respectively mixing samples 1 with 2, 2 with 3, and 1 with 3 (from left to right).

The Nut regulated genes (genes downregulated and upregulated in *Nut* KO cells compared to wild-type cells) correspond to genes showing an absolute value of fold change above 1.5 between *Nut* KO versus wild-type cells, with an adjusted Student test p value less than 5%. The Student test p values for fold changes were adjusted for multiples tests according to the method published by Benjamini & Hochberg.

Nucleosomal DNA length determination

Nuclei from fractionated round-elongating spermatids (equivalent of 100 μg of chromatin) were extensively digested with MNase. Digestion conditions were setup to completely digest chromatin to monomers. DNA was then prepared by the digestion of proteins by proteinase K in a SDS buffer and Phenol/Chloroform extraction.

Paired-end sequencing 2*75bp was performed using Illumina NextSeq 500. Base calling was performed using RTA version 2. MNase-Seq fragments were aligned to the mm10 genome assembly using Bowtie version 2.2.9 with default arguments.

Fragment sizes were taken from the 9th column of SAM files (TLEN) using Samtools version 1.3.1 and plotted as distributions using R version 3.3.1.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

Data Resources

The accession number for the raw and processed MNase sequencing data reported in this paper is GEO: GSE111931.

The accession number for the raw and processed transcriptomic Illumina data reported in this paper is GEO: GSE118969.

Proteomic data: the list of all identified proteins immunoprecipitated by the anti-Nut antibody has been deposited with ProteomeXchange consortium via the PRIDE database with the accession number: PXD008727.

ADDITIONAL RESOURCES

Anti Nut-purified antibody

5 cDNA “fragments” covering the entire mouse *Nut* sequence (Reynoird et al., 2010), were used to produce the corresponding biotinylated peptides, which were injected to rabbits. Sera from final bleedings were differently screened for a ~150kDa signal by western blotting using total germ cell lysed in 15mM Tris HCl pH 7.4, 60mM KCl, 15mM NaCl, 0.34M Sucrose, 2mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0.65mM Spermidine, 1mM Dithiothreitol, 0.03% Triton X-100, 1% Glycerol, Protease Cocktail Inhibitor 10mM Na Butyrate, followed by centrifugation for 15 min at 200 x g at 4°C in order to obtain nuclear extracts from testis of wild-type versus *Nut* KO male mice.

Positive samples were immunopurified against the Nut f1c fragment (Reynoird et al., 2010), bound to CNBr-activated Sepharose 4B beads, after elution with 0.1M Glycine pH2.5. Purified antibodies were dialysed and concentrated in a PBS, 350mM NaCl, 10% glycerol buffer at 0.5 µg/microliter and kept at –20°C until use.

Cell Reports, Volume 24

Supplemental Information

Nut Directs p300-Dependent, Genome-Wide

H4 Hyperacetylation in Male Germ Cells

Hitoshi Shiota, Sophie Barral, Thierry Buchou, Minjia Tan, Yohann Couté, Guillaume Charbonnier, Nicolas Reynoird, Fayçal Boussouar, Matthieu Gérard, Mingrui Zhu, Lisa Bargier, Denis Puthier, Florent Chuffart, Ekaterina Bourova-Flin, Sarah Picaud, Panagis Filippakopoulos, Afsaneh Goudarzi, Ziad Ibrahim, Daniel Panne, Sophie Rousseaux, Yingming Zhao, and Saadi Khochbin

Supplemental Figures and Tables

Supplemental information includes 5 Figures and 5 Tables.

Shiota_Figure S1 (related to Figure 1)

Nut expression in silico in human and mouse tissues (RNAseq data from ncbi)

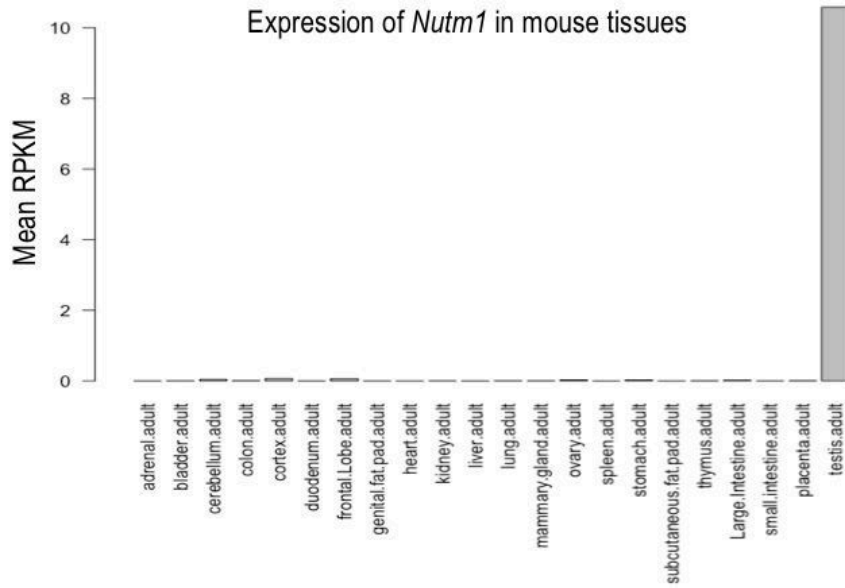
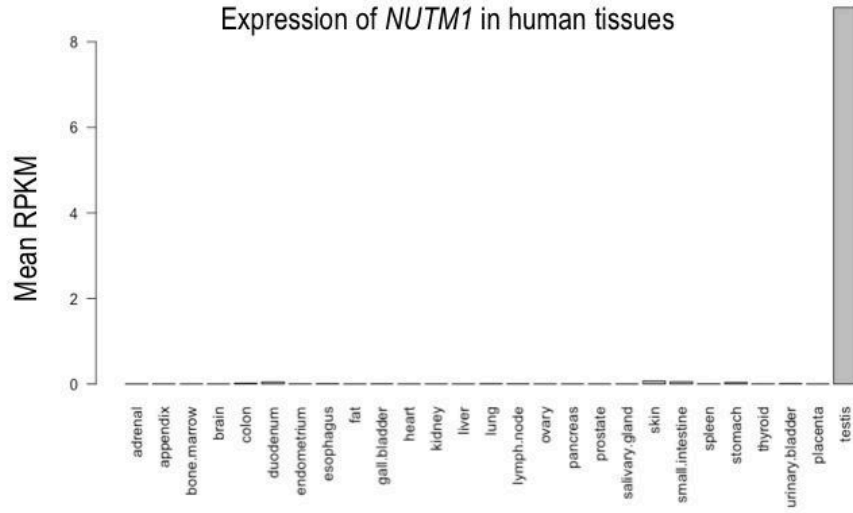


Figure S1 (related to Figure 1)

NUT/Nut is a testis-specific gene

Using publicly available normalized RNAseq data from 22 mouse

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA66167/>) and 27 human

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJEB4337/>) adult normal tissues, the tissue-specific expression of

Nut/NUT is visualized. Related to **Figure 1A**.

Shiota_Figure S2 (related to Figure 2)

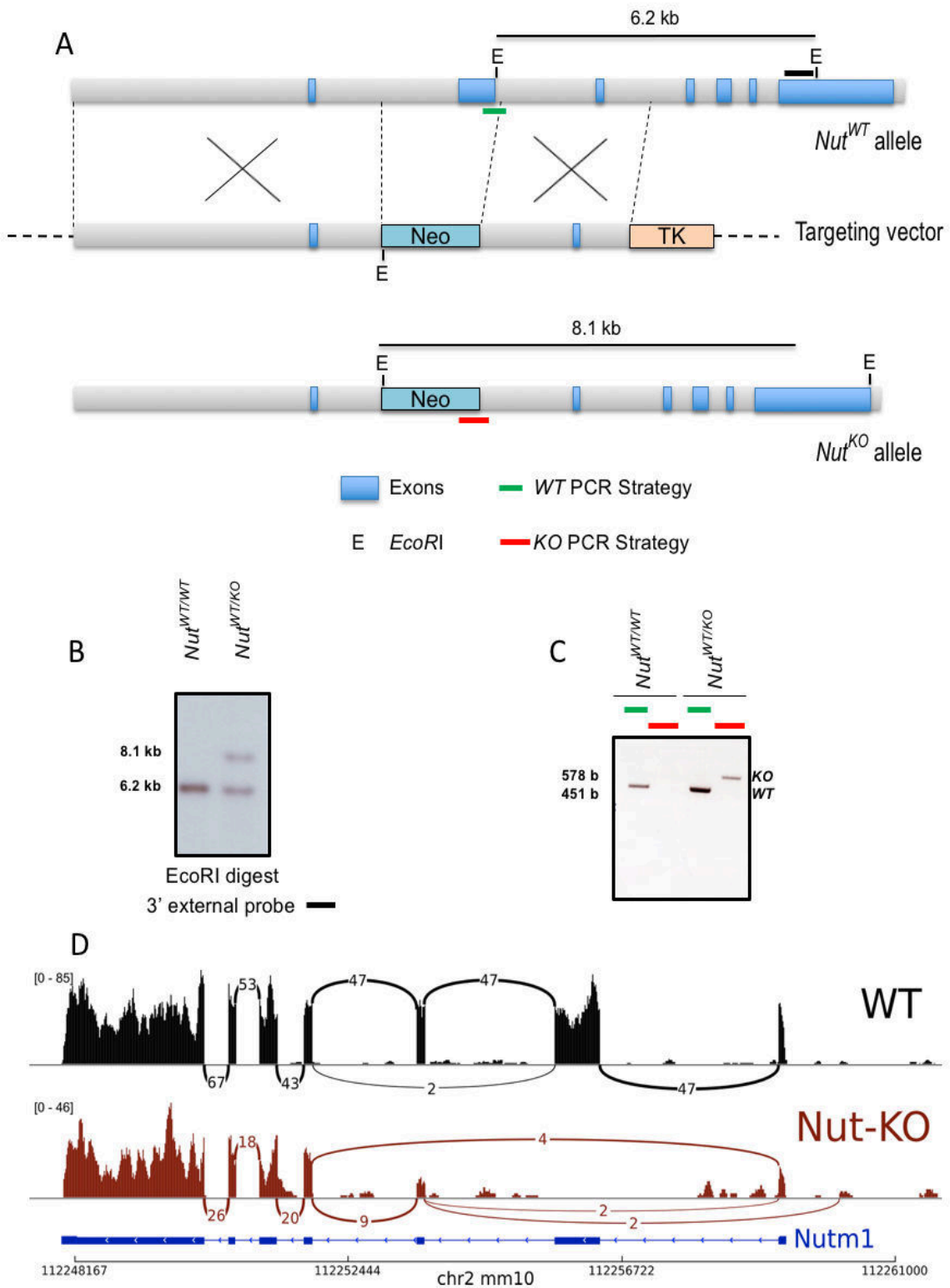


Figure S2 (related to Figure 2)

Generation of *Nut* KO mice

(A) Strategy to inactivate *nutm1* (*Nut*) by inserting a *Neo* cassette instead of the second exon and validation of the insertion event by Southern blotting (B) and PCR (C). The positions of the probe used in the Southern blot analysis and the regions amplified by PCR are indicated. (D) To control the result of our genetic manipulations, we also sequenced RNAs from *WT* and *Nut* KO round/elongating spermatids from one of the cell fractionations described in the legend of [Figure 6A](#). The alignment of RNA-seq reads from *WT* and *Nut* KO round/elongating spermatids shows the disruption of *Nut* transcription in *Nut* KO cells. Sashimi plots represent the raw RNAseq coverage around *Nut* genomic coordinates. Arcs show junction events in reads. Values are the number of junction reads for their relative arc. Junction events occurring only once are not displayed.

Shiota_Figure S3 (related to Figure 3)

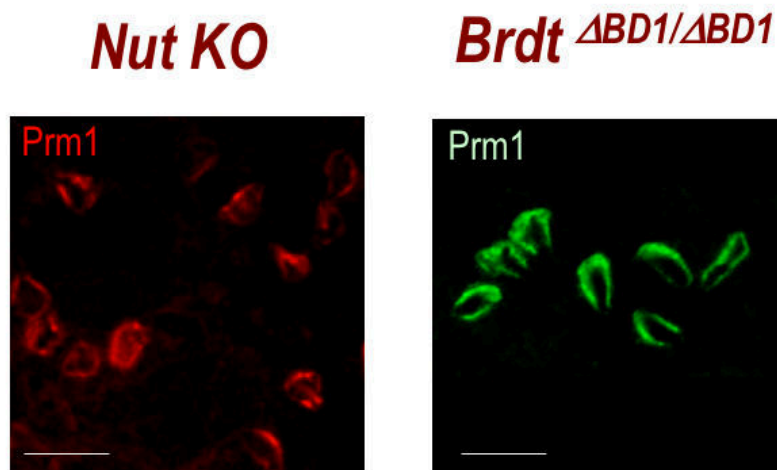


Figure S3 (related to Figure 3)

Similar impairment of protamine assembly is observed in *Nut KO* as in *Brdt* ^{$\Delta BD1/\Delta BD1$} condensing spermatids. The left and right panels show condensing spermatids in testes from *Nut KO* and *Brdt* ^{$\Delta BD1/\Delta BD1$} respectively (Gaucher et al., 2012) after immunodetection of protamine 1 (Prm1) as indicated. Note that different colours are used to detect Prm1 in the two preparations. Scale bar: 10 micrometres.

Shiota_Figure S4 (related to Figure 6)

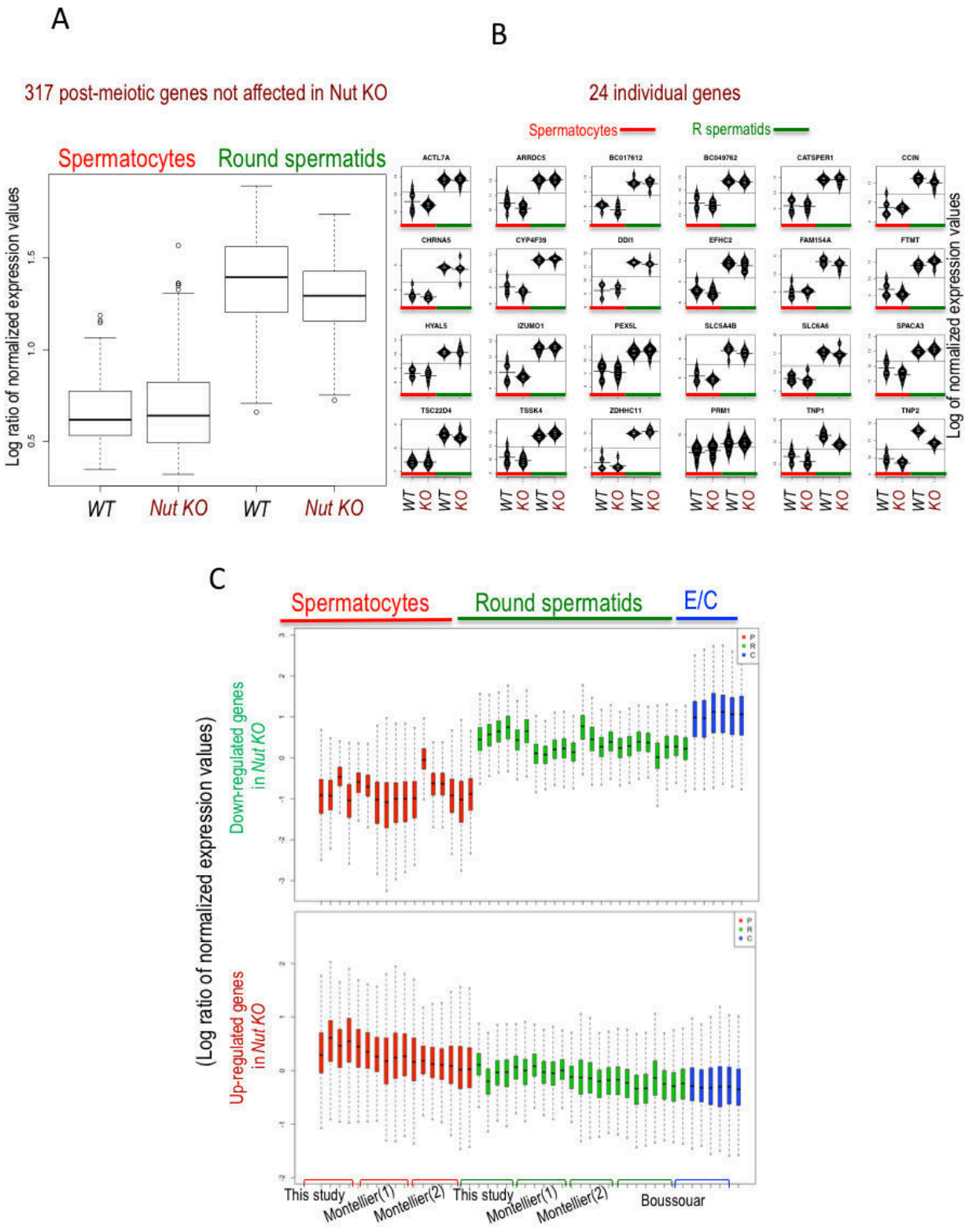


Figure S4 (related to Figure 6A)

Nut activates the expression of post-meiotic genes.

(A) and (B) show the expression of genes not affected by Nut, that are up-regulated in post-meiotic cells in *WT* cells and their expression in *Nut KO* cells.

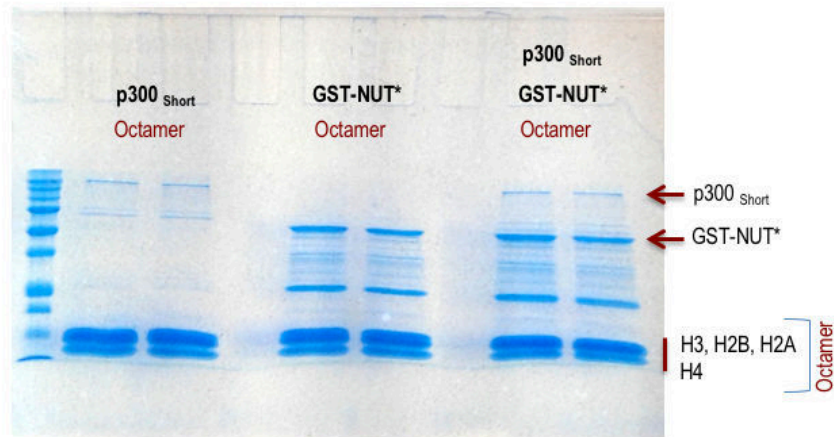
(A) Quality control of *WT* and *Nut KO* spermatocytes and round/early elongating spermatid fractions. In order to confirm that post-meiotic *WT* and *Nut KO* populations are comparable, the global expression of 317 genes that are activated in post-meiotic cells compared to spermatocytes, was monitored. Nut regulated genes (shown in C) were excluded from this list of genes.

(B) Expression of 24 individual genes within the genes whose expression is globally shown in (A). The expression of 21 individual post-meiotic genes in both *WT* and *Nut KO* cell populations is shown. The expression of Prm1, TP1 and TP2-encoding genes is also shown. It is of note that the Illumina microarray used does not include probes for Prm2 expression.

(C) Expression of Nut regulated genes during spermatogenesis. The expression profiles during spermatogenic cells differentiation of the genes identified here as Nut-regulated genes by the comparative analysis of transcriptomes between *WT* and *Nut KO* round/elongating spermatids (Fig. 6A), was visualized. For this purpose, we used independent stage-specific transcriptomic data previously generated from *WT* germ cells (Boussouar et al., 2014; Montellier et al., 2013) as well as in the present study as indicated. Montellier (1) and Montellier (2) correspond to the *WT* cells of two different experiments, respectively used to compare with germ cells of *TH2B KO* and *Th2Btag* mutated mice (Montellier et al. 2013). The upper panel shows the stage-specific expression of genes whose expression are down-regulated in the absence of Nut and the lower panel shows genes whose expression are upregulated in *Nut KO* cells. The stages are colour coded as indicated. E/C means elongating/condensing spermatids.

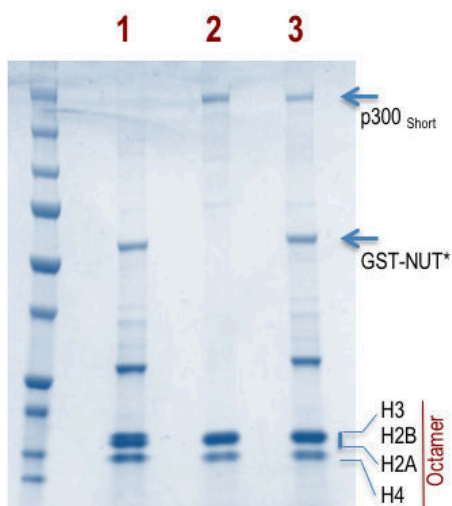
Shiota_Figure S5 (related to Figure 6)

A



B

- 1 GST-NUT* + Histone octamer
- 2 p300_{Short} + Histone octamer
- 3 GST-NUT* + p300_{Short} + Histone octamer



C

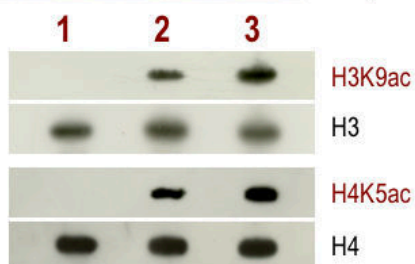


Figure S5 (related to Figure 6D)

NUT mediates the stimulation of H4 acetylation by p300.

(A) Coomassie stained gel corresponding to each reaction and the histones prior to the HPLC/MS/MS analysis. This panel shows the Coomassie gel staining of proteins used in the HAT assays presented in [Figure 6D](#) is shown. Histone-containing regions of the gel were cut and used for further analysis by mass spectrometry ([Fig. 6D](#)). p300_{short} corresponds to residues 340-2094 of p300. GST-NUT* corresponds to residues 347-588 of NUT, previously shown to interact with p300 ([Reynoird et al., 2010](#)).

(B) and (C) correspond to an experiment similar to the one shown in [Fig. 6D](#), except that the acetylation of H3K9ac and H4K5ac was monitored by specific antibodies.

(B) A fraction of the experiment described above was analysed by SDS-PAGE and stained by Coomassie.

(C) Another fraction of the experiment performed in (B) was used to detect the indicated histone acetylation. H3 and H4 were also detected with the corresponding antibodies as indicated.

Shiota_Table S1 (related to Fig. 5A)

No	Modifications	Replications	Ratio Nut-/-/WT (Normalized)	Average Ratio Nut-/-/WT (Normalized)
1	H3K14ac	1	0.81	0.79
	H3K14ac	2	0.77	
2	H3K18ac	1	0.93	0.90
	H3K18ac	2	0.87	
3	H3K23ac	1	0.97	0.93
	H3K23ac	2	0.89	
4	H4K5ac	1	0.31	0.32
	H4K5ac	2	0.33	
5	H4K8ac	1	0.45	0.44
	H4K8ac	2	0.43	
6	H4K12ac	1	1.17	1.10
	H4K12ac	2	1.04	
7	H4K16ac	1	0.66	0.64
	H4K16ac	2	0.62	
8	H2AK5ac (Isoform,Uniprot No.A0AUV1)	1	0.40	0.39
	H2AK5ac (Isoform,Uniprot No.A0AUV1)	2	0.37	
9	H2AK9ac (Isoform,Uniprot No.A0AUV1)	1	0.40	0.39
	H2AK9ac (Isoform,Uniprot No.A0AUV1)	2	0.37	
10	H2AK74ac (Isoform,Uniprot No.A0AUV1)	1	0.92	0.93
	H2AK74ac (Isoform,Uniprot No.A0AUV1)	2	0.94	

Table S1 (related to Figure 5A)

Relative quantitative analysis of site-specific histone acetylation in *WT* round/elongating spermatids compared to their *Nut KO* counterpart.

All the identified peptides with Mascot score above 20 were manually verified according to the rules described previously (Chen et al., 2005). The relative ratios of abundance of histone peptides in *WT* and *Nut KO* histone samples were calculated by the peak area of the light and heavy isotope peaks. The PTM with more than 1.5 times variations are indicated in red (see Table S2 for details).

Shiota_Table S2 (related to Fig. 5A)

No	Modifications	Replications	Sequence	Peak area		Ratio Nut ^{+/} /WT	Ratio Nut ^{+/} /WT (Normalized)	Average Ratio Nut ^{+/} /WT (Normalized)		
				Nut	WT					
1	H3K14ac	1	pr-K(me2)STGGK(ac)APR	2.22E+07	2.97E+07					
				1.49E+08	2.05E+08					
		2	pr-K(pr)STGGK(ac)APR	3.69E+07	5.76E+07					
				7.67E+08	1.10E+09					
		1	pr-K(me3)STGGK(ac)APR	3.91E+07	5.12E+07					
				2.60E+08	3.43E+08					
SUM	1		9.82E+07	1.39E+08	0.71	0.81				
	2		1.18E+09	1.65E+09	0.71	0.77	0.79			
2	H3K18ac	1	pr-K(ac)QLATK(ac)AAR	4.96E+07	5.64E+07					
				7.67E+08	8.61E+08					
		2	ac)QLATK(pr)AAR or pr-K(pr)QLATK(ac)	3.37E+08	3.96E+08					
				5.01E+09	6.14E+09					
		1	pr-K(ac)QLATK(me1+pr)AAR	8.11E+08	1.01E+09					
				1.52E+10	1.88E+10					
SUM	1		1.20E+09	1.46E+09	0.82	0.93				
	2		2.10E+10	2.58E+10	0.81	0.87	0.90			
3	H3K23ac	1	pr-K(ac)QLATK(ac)AAR	4.96E+07	5.64E+07					
				7.67E+08	8.61E+08					
		2	ac)QLATK(pr)AAR or pr-K(pr)QLATK(ac)	3.37E+08	3.96E+08					
				5.01E+09	6.14E+09					
		1		3.86E+08	4.52E+08	0.85	0.97			
				5.78E+09	7.00E+09	0.82	0.89	0.93		
SUM	1		5.61E+07	2.08E+08	0.27	0.31				
	2		5.48E+08	1.80E+09	0.30	0.33	0.32			
4	H4K5ac	1	pr-GK(ac)GGK(pr)GLGK(pr)GGAK(pr)R	NA	6.38E+07					
				NA	4.59E+08					
		2	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(pr)GGAK(ac)R	1.84E+07	4.69E+07					
				1.65E+08	3.78E+08					
		1	pr-GK(ac)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(ac)R	3.67E+07	9.39E+07					
				3.30E+08	7.56E+08					
		2	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.01E+06	4.35E+06					
				5.38E+07	2.04E+08					
		SUM	1		5.61E+07	2.08E+08	0.27	0.31		
			2		5.48E+08	1.80E+09	0.30	0.33	0.32	
		5	H4K8ac	1	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(pr)GGAK(pr)R	NA	3.81E+08			
						NA	2.78E+09			
				2	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(pr)R	1.78E+08	6.36E+07			
						1.28E+09	4.59E+08			
1	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(pr)GGAK(ac)R			1.84E+07	4.69E+07					
				1.65E+08	3.78E+08					
2	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R			1.84E+07	4.69E+07					
				1.65E+08	3.78E+08					
1	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R			1.01E+06	4.35E+06					
				5.38E+07	2.04E+08					
SUM	1				2.18E+08	5.43E+08	0.40	0.45		
	2				1.65E+09	4.18E+09	0.40	0.43	0.44	
6	H4K12ac			1	pr-GK(pr)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(pr)R	6.12E+08	6.62E+08			
						5.94E+09	6.68E+09			
		2	pr-GK(pr)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.78E+08	6.36E+07					
				1.28E+09	4.59E+08					
		1	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(pr)R	1.78E+08	6.36E+07					
				1.28E+09	4.59E+08					
		2	pr-GK(ac)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(pr)R	NA	6.36E+07					
				NA	4.59E+08					
		1	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.84E+07	4.69E+07					
				1.65E+08	3.78E+08					
		2	pr-GK(ac)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(ac)R	3.67E+07	9.39E+07					
				3.30E+08	7.56E+08					
		1	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.01E+06	4.35E+06					
				5.38E+07	2.04E+08					
SUM	1		1.02E+09	9.98E+08	1.03	1.17				
	2		9.04E+09	9.38E+09	0.96	1.04	1.10			
7	H4K16ac	1	pr-GK(pr)GGK(pr)GLGK(pr)GGAK(ac)R	1.02E+09	1.55E+09					
				9.89E+09	1.55E+10					
		2	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(pr)GGAK(ac)R	NA	3.81E+08					
				NA	2.78E+09					
		1	pr-GK(pr)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.78E+08	6.36E+07					
				1.28E+09	4.59E+08					
		2	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(pr)GGAK(ac)R	1.84E+07	4.69E+07					
				1.65E+08	3.78E+08					
		1	pr-GK(pr)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.84E+07	4.69E+07					
				1.65E+08	3.78E+08					
		2	pr-GK(ac)GGK(pr)GLGK(ac)GGAK(ac)R	3.67E+07	9.39E+07					
				3.30E+08	7.56E+08					
		1	pr-GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.01E+06	4.35E+06					
				5.38E+07	2.04E+08					
SUM	1		1.27E+09	2.18E+09	0.58	0.66				
	2		1.19E+10	2.05E+10	0.58	0.62	0.64			
8	H2AK5ac	1	pr-GK(ac)QGGK(pr)AR	7.96E+06	2.28E+07	0.35	0.40			
				9.62E+07	2.77E+08	0.35	0.37	0.39		
9	H2AK9ac	1	pr-GK(pr)QGGK(ac)AR	3.98E+06	1.14E+07	0.35	0.40			
				4.81E+07	1.38E+08	0.35	0.37	0.39		
10	H2AK74ac	1	pr-DNK(ac)K(me1+pr)TR	4.43E+07	5.48E+07	0.81	0.92			
				8.81E+08	1.01E+09	0.87	0.94	0.93		

Normalization Nut ^{+/} /WT		
Replications	1	2
H3 EIAQDFKTDLR	0.94727342	0.98400088
H4 DNIQGITKPAIR	0.88541447	0.875149837
H2A AGLQFPVGR	0.85164992	0.923494784
H2B IASEASR	0.83705144	0.92946393
Average	0.88034731	0.928027358

Coverage of Histone		
Replications	1	2
H3	64%	67%
H4	93%	87%
H2A	52%	52%
H2B	48%	48%

Table S2 (related to Figure 5A)

Detailed quantitative analysis of site-specific histone acetylation in *WT* round/elongating spermatids compared to their *Nut KO* counterpart shown in Table S1. The small Table entitled “Normalization *Nut*^{-/-}/*WT*” shows the values of the precursor ion AUC used to normalize the amount of each histone in stable isotope labelling quantification. The lowest Table indicates the values of histone coverage for each experiment.

Shiota_Table S3 (related to Fig. 6C)


Protein set id	Gene name	title	Coverage	Mol. Weight	WT1_KO	WT2_KO	KO_P ep	KO_S C	KO_S SC	KO_S WSC	WT1_Pep	WT1_SC	WT1_SSC	WT1_WSC	WT2_Pep	WT2_SC	WT2_SSC	WT2_WSC
Nutn1	NUT family member 1	Q8BHP2	21.58	120666	WT1 only	WT2 only					13	14	14	14	11	12	12	12
	HATs																	
Crebpp	CREB-binding protein	P45481	5.9	265494	5.42	6.42	2	2	2	2	10	11	10	10.83	11	13	12	12.83
Ep300	Histone acetyltransferase p300	B2RW56	1.95	262305	WT1 only	WT2 only					3	3	2	2.17	4	4	3	3.17
	Histones, chromatin binding and transcription factors																	
Hist1h2ba	Histone H2B type 1-A (TH2B)	P70896	63.78	14236	8.89	21.10					6	6	6	7.73	7	10	7	9.66
H2af1	Histone H2A-Bbd type 1 (H2AL2)	Q9CQ70	19.82	12842	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	2	2	2	2
H2afv	Histone H2A.V (H2AZ2)	Q3THW5	14.94	13506	8.09	7.06	1	1	0	0.33	2	6	1	2.67	2	5	1	2.33
H1fnt	Testis-specific H1 histone	Q8CJ14	9.55	44400	WT1 only	WT2 only					3	3	3	3	1	1	1	1
Hmgb4	High mobility group protein B4	Q6P8W9	12.15	21604	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Top2	Nuclear transition protein 2	P11378	17.95	13130	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Baz2a	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A	Q911E5	1.96	23616	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	2	2	2	2
Smarca5	SWIKN1-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5	Q912W3	9.42	121627	8.00	6.00	1	1	1	1	8	8	8	8	6	6	6	6
Cenpo	Centromere protein P	Q9C292	7.34	33287	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	2	2	2	2
Salb	Scaffold attachment factor B1	D3YXK2	7.26	105103	WT1 only	WT2 only					4	4	4	4	1	1	1	1
Sltm	SAFB-like transcription modulator	Q8CH25	4.75	116919	WT1 only	WT2 only					3	4	4	4	3	4	4	4
Gemin2	Gem-associated protein 2	Q9CQ04	4.46	30441	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	2	2	2
Dax1	Cell division cycle 5-like protein	F7C7L0	0.83	126714	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Naa40	N-alpha-acetyltransferase 40	Q8VE10	5.06	27229	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Roa3c	RNA polymerase II-associated protein 3	Q9D706	3.18	74056	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Sox30	Transcription factor SOX-30	Q8CGW4	1.66	83938	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Ccar1	Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	Q8CH18	3.32	132060	WT1 only	WT2 only					3	4	4	4	1	3	3	3
Pura	Transcriptional activator protein Pur-alpha	P42699	36.63	34883	WT1 only	WT2 only					5	6	5	5.53	6	6	4	5.06
Odc3	Cell division cycle 5-like protein	Q8A388	5.61	92189	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	3	3	3	3
Pa2g4	Proliferation-associated protein 2G4	P95080	4.31	43598	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Naca	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form	P07670	1.33	220499	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	2	2	2	2
Ddx17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	Q5UJ6	16	72399	10.89	5.07	3	3	0	0.45	10	10	4	4.9	4	4	2	2.28
Trim27	Zinc finger protein RFP	Q82158	2.34	58512	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Rbbp6	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	P97868	3.13	195507	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	3	3	3	3
Khrts1	Kil domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	Q80749	3.16	48315	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Rnf17	RING finger protein 17	Q99M77	1.71	185599	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	2	2	2	2
	Nuclear pore complex																	
Kpnb1	Importin subunit beta-1	P70188	5.25	97184	WT1 only	WT2 only					3	3	3	3	4	4	4	4
Kna6b	Importin subunit alpha-7	Q3C345	9.51	59964	WT1 only	WT2 only					3	3	3	3	1	1	1	1
Nup35	Nucleoporin NUP35	Q8R496	4	40196	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Nup210	Nucleoporin 210-like	Q9R9F7	0.64	208699	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Nup93	Nuclear pore complex protein Nup93	Q8BJ71	2.93	93281	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	2	2	2	2
	Splicing																	
Srpk1	SRSF protein kinase 1	O70561	9.57	73088	WT1 only	WT2 only					3	5	5	5	4	4	4	4
Srpk2	SRSF protein kinase 2	Q54781	1.76	70756	WT1 only	WT2 only					1	2	2	2	1	1	1	1
Csf1l1	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	Q8EPJ4	3.19	162614	WT1 only	WT2 only					5	5	5	5	1	1	1	1
Sf3b4	Splicing factor 3B subunit 4	Q8QZ9Y	8.96	44555	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	2	2	2	2
Isv1	Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog	Q69Z02	4.56	32989	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Puf60	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	Q3UEB3	5.67	60248	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Plra1	Pleiotropic regulator 1	Q82ZV4	8.77	56937	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
	RNA-binding																	
Fxr1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	Q61584	24.57	76221	WT1 only	WT2 only					8	9	8	8.68	10	10	9	9.63
Fxr2	Uncharacterized protein (Fragment)	Q3TA75	14.2	70528	WT1 only	WT2 only					4	5	4	4.32	4	5	4	4.3
Fmr1	Synaptic functional regulator FMR1	P36922	3.58	68689	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	2	2	1	1.07
Cede1	Cold shock domain-containing protein E1	Q91W50	4.26	88790	WT1 only	WT2 only					3	3	3	3	3	4	4	4
Mex3d	RNA-binding protein MEX3D	Q3UE17	17.88	65329	WT1 only	WT2 only					5	5	5	5	2	2	2	2
Eprs	Bifunctional glutamate/proline--rRNA ligase	Q8C3C7	2.38	170079	WT1 only	WT2 only					3	3	3	3	1	1	1	1
Vars	Valine--rRNA ligase	Q821Q9	14.57	140215	WT1 only	WT2 only					12	14	14	14	6	7	7	7
Dars	Aspartate--rRNA ligase, cytoplasmic	Q922B2	8.58	57147	WT1 only	WT2 only					3	3	3	3	1	1	1	1
Lars	Leucine--rRNA ligase, cytoplasmic	Q8BMJ2	0.76	134192	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	2	2	2
Ylpm1	YLP motif-containing protein 1	D3YWX2	3.04	241050	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	4	4	4	4
Tarb2	RISC-loading complex subunit TARBP2	P97473	7.4	38941	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Dnaa3	DnaJ homolog subfamily A member 4	Q5JUC3	9.07	44501	WT1 only	WT2 only					3	4	4	4	2	3	3	3
Dnajb6	DnaJ homolog subfamily B member 6	Q8R946	6.58	35807	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	2	2	2	2
Dnaj2	DnaJ homolog subfamily A member 2	Q9QYJ0	8.5	45745	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Igf2bp1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	Q8477	4.68	63450	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Stau1	Double-stranded RNA-binding protein Stau1 homolog 1	Q82108	5.34	53924	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Un1	Unconventional prefolin RPB5 interactor	Q3TLD5	4.9	59364	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Mto4	mRNA turnover protein 4 homolog	Q8QD08	6.28	27545	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Zf	Zinc finger RNA-binding protein	Q88532	8.29	118658	WT1 only	WT2 only					6	6	6	6	4	4	4	4
Rpl7	60S ribosomal protein L7	P14148	21.85	31419	WT1 only	WT2 only					6	6	6	6	6	6	6	6
Rpl7a	60S ribosomal protein L7a	P12970	12.41	29976	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	3	3	3	3
Rps24	40S ribosomal protein S24	P62849	18.05	15423	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Rps15	40S ribosomal protein S15	P62843	24.83	17040	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Rpl34	60S ribosomal protein L34	Q9D199	6.84	13392	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Rpl38	60S ribosomal protein L38	Q9JL18	14.29	8203	WT1 only	WT2 only					1	2	2	2	1	1	1	1
Alvrf	THO complex subunit 4	Q80583	14.51	26939	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Nxf1	Nuclear RNA export factor 1	Q9JUX7	1.94	70300	WT1 only	WT2 only					1	2	2	2	1	1	1	1
Larp4b	La-related protein 4B	Q6A0A2	5.94	81627	WT1 only	WT2 only					3	4	4	4	1	1	1	1
Exosc4	Exosome complex component RRP41	Q92119	4.9	26250	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
Ddx6	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	P54233	10.77	54191	WT1 only	WT2 only					4	4	4	4	4	4	4	4
Wtap	Pre-mRNA-splicing regulator WTAP	Q9ER69	9.34	44176	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	3	3	3	3
Atxn2l	Ataxin-2-like protein	Q3TGZ2	7.24	105445	11.00	9.00	1	1	0	0.25	6	8	1	2.75	4	6	1	2.25
Dazap1	DAZ-associated protein 1	Q8J15	7.64	43214	WT1 only	WT2 only					2	2	2	2	1	1	1	1
Fip11	Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	Q9D824	5.68	64958	WT1 only	WT2 only					1	1	1	1	1	1	1	1
	Metabolism																	





Table S3 (related to Figure 6C)



List of proteins identified following Nut immunoprecipitation from *WT* round/elongating spermatids and their *Nut KO* counterpart. The identified proteins belonging to the indicated functional categories are shown and highlighted.

Pep: number of identified peptides; SC: Spectral Counts; SSC: Specific Spectral Counts; WSC: Weighted Spectral Counts.

The colour-code is as follows:

-  Classical contaminant

-  Identified with 1 peptide but with SC and SSC ≥ 2
-  Identified with several peptides but with SSC = 1
-  Identified with 1 peptide and SC = 1
-  Protein with SSC = 0

-  Identified only in *WT* sample with WSC ≥ 5 or enriched at least 10 times in *WT* sample compared to *Nut KO* sample
-  Identified only in *WT* sample with WSC ≥ 3 or enriched at least 5 times in *WT* sample compared to *Nut KO* sample

Shiota_Table S4 (related to Fig. 6D)

No	Modifications	Replications	Normalized peak area			Average normalized peak area		
			Nut	p300	Nut+p300	Nut	p300	Nut+p300
1	H3K9ac	1	1.38E+08	5.66E+09	2.18E+10	1.97E+08	5.93E+09	2.21E+10
		2	2.56E+08	6.19E+09	2.24E+10			
2	H3K14ac	1	1.70E+08	9.99E+09	2.69E+10	2.29E+08	9.90E+09	2.88E+10
		2	2.88E+08	9.81E+09	3.08E+10			
3	H3K18ac	1	2.28E+08	4.72E+10	1.18E+11	2.19E+08	5.42E+10	1.16E+11
		2	2.11E+08	6.11E+10	1.14E+11			
4	H3K23ac	1	1.50E+08	3.01E+10	9.16E+10	1.47E+08	3.13E+10	8.89E+10
		2	1.44E+08	3.26E+10	8.62E+10			
5	H3K27ac	1	1.48E+08	3.94E+10	7.47E+10	1.48E+08	4.01E+10	7.01E+10
		2	1.48E+08	4.08E+10	6.55E+10			
6	H3K36ac	1	2.01E+07	6.81E+08	1.97E+09	2.07E+07	8.04E+08	2.23E+09
		2	2.13E+07	9.26E+08	2.50E+09			
7	H3K56ac	1	5.49E+07	2.55E+08	2.91E+08	4.49E+07	2.20E+08	2.55E+08
		2	3.49E+07	1.85E+08	2.19E+08			
8	H3K79ac	1	6.58E+07	7.10E+07	9.94E+07	6.77E+07	7.04E+07	8.97E+07
		2	6.97E+07	6.99E+07	8.00E+07			
9	H3K122ac	1	1.91E+07	3.56E+08	7.80E+08	1.90E+07	3.45E+08	7.34E+08
		2	1.89E+07	3.33E+08	6.89E+08			
10	H4K5ac	1	7.81E+07	1.10E+10	3.93E+10	7.77E+07	1.03E+10	4.76E+10
		2	7.73E+07	9.56E+09	5.59E+10			
11	H4K8ac	1	8.31E+07	1.21E+10	4.10E+10	8.30E+07	1.14E+10	5.01E+10
		2	8.30E+07	1.07E+10	5.92E+10			
12	H4K12ac	1	5.70E+07	7.21E+09	2.18E+10	5.49E+07	6.79E+09	2.52E+10
		2	5.28E+07	6.37E+09	2.87E+10			
13	H4K16ac	1	1.29E+07	2.01E+09	8.20E+09	1.19E+07	1.78E+09	8.80E+09
		2	1.09E+07	1.54E+09	9.40E+09			
14	H4K31ac	1	6.51E+07	1.62E+09	2.52E+09	5.77E+07	1.41E+09	2.71E+09
		2	5.03E+07	1.21E+09	2.90E+09			
15	H4K77ac	1	1.92E+07	4.36E+07	7.17E+07	1.95E+07	4.35E+07	6.83E+07
		2	1.97E+07	4.35E+07	6.49E+07			
16	H4K79ac	1	5.79E+06	1.09E+07	1.89E+07	5.43E+06	1.07E+07	1.56E+07
		2	5.08E+06	1.05E+07	1.23E+07			
17	H4K91ac	1	1.46E+07	2.73E+07	7.16E+07	1.56E+07	2.06E+07	6.54E+07
		2	1.67E+07	1.38E+07	5.92E+07			

Table S4 (related to Figure 6D)

Identified site-specific acetylation of histones incubated with p300 and the p300-interacting domain of NUT (see Table S5 for details).

All the identified peptides with a Mascot score above 20 were manually verified according to the rules described previously (Chen et al., 2005).

Shiota_Table S5 (related to Fig. 6D)

Site	Peptide	Peak area					
		Nut-1	Nut-2	p300-1	p300-2	Nut+p300-1	Nut+p300-2
H3K9ac	K(ac)STGGK(ac)APR	1.38E+08	2.28E+08	7.08E+09	5.75E+09	2.25E+10	1.79E+10
	SUM	1.38E+08	2.28E+08	7.08E+09	5.75E+09	2.25E+10	1.79E+10
H3K14ac	K(ac)STGGK(ac)APR	1.38E+08	2.28E+08	7.08E+09	5.75E+09	2.25E+10	1.79E+10
	KSTGGK(ac)APR	1.78E+07	1.59E+07	1.67E+09	3.23E+08	1.31E+08	4.40E+08
	STGGK(ac)APR	1.48E+07	1.27E+07	3.74E+09	3.04E+09	5.07E+09	6.28E+09
	SUM	1.70E+08	2.56E+08	1.25E+10	9.12E+09	2.77E+10	2.46E+10
H3K18ac	K(ac)QLATK(ac)AAR	1.46E+08	1.24E+08	3.47E+10	2.65E+10	9.25E+10	6.97E+10
	K(ac)QLATK	8.14E+07	6.39E+07	2.42E+10	3.03E+10	2.88E+10	2.16E+10
	SUM	2.28E+08	1.88E+08	5.90E+10	5.69E+10	1.21E+11	9.13E+10
H3K23ac	K(ac)QLATK(ac)AAR	1.46E+08	1.24E+08	3.47E+10	2.65E+10	9.19E+10	6.73E+10
	KQLATK(ac)AAR	NA	NA	1.69E+09	2.93E+09	1.85E+09	1.20E+09
	QLATK(ac)AAR	3.59E+06	4.37E+06	1.20E+09	8.33E+08	6.03E+08	4.83E+08
	SUM	1.50E+08	1.28E+08	3.76E+10	3.03E+10	9.44E+10	6.90E+10
H3K27ac	K(ac)SAPATGGVK	1.46E+08	1.31E+08	4.89E+10	3.76E+10	7.55E+10	5.12E+10
	K(ac)SAPATGGVK(me)	NA	NA	2.40E+07	1.96E+07	3.68E+07	3.32E+07
	K(ac)SAPATGGVK(ac)KPHR	1.86E+06	1.53E+06	2.69E+08	3.60E+08	1.42E+09	1.18E+09
	SUM	1.48E+08	1.32E+08	4.92E+10	3.80E+10	7.70E+10	5.24E+10
H3K36ac	K(ac)SAPATGGVK(ac)KPHR	1.86E+06	1.53E+06	2.69E+08	3.60E+08	1.42E+09	1.18E+09
	SAPATGGVK(ac)KPHR	9.63E+06	9.63E+06	4.60E+08	4.20E+08	3.85E+08	3.32E+08
	KSAPATGGVK(ac)KPHR	8.66E+06	7.81E+06	1.23E+08	7.66E+07	2.26E+08	4.52E+08
	SUM	2.01E+07	1.90E+07	8.52E+08	8.57E+08	2.03E+09	2.00E+09
H3K56ac	RYQK(ac)STELLIR	5.90E+06	4.48E+06	5.92E+07	3.32E+07	4.90E+07	3.10E+07
	YQK(ac)STELLIR	4.90E+07	2.66E+07	2.60E+08	1.39E+08	2.50E+08	1.44E+08
	SUM	5.49E+07	3.10E+07	3.19E+08	1.72E+08	2.99E+08	1.75E+08
H3K79ac	EIAQDFK(ac)TDLR	6.58E+07	6.20E+07	8.87E+07	6.50E+07	1.02E+08	6.40E+07
	SUM	6.58E+07	6.20E+07	8.87E+07	6.50E+07	1.02E+08	6.40E+07
H3K122ac	RVTIM(o)PK(ac)DIQLAR	7.99E+05	3.92E+05	9.54E+07	1.03E+08	2.68E+08	1.94E+08
	VTIM(o)PK(ac)DIQLAR	1.83E+07	1.65E+07	3.50E+08	2.07E+08	5.36E+08	3.57E+08
	SUM	1.91E+07	1.69E+07	4.45E+08	3.10E+08	8.03E+08	5.51E+08
H4K5ac	GK(ac)GGK(ac)GLGK	4.60E+07	3.97E+07	7.49E+09	5.15E+09	2.15E+10	2.49E+10
	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK	2.08E+07	2.08E+07	4.14E+09	2.53E+09	1.17E+10	1.34E+10
	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.14E+07	8.33E+06	2.12E+09	1.20E+09	7.29E+09	6.39E+09
	SUM	7.81E+07	6.88E+07	1.37E+10	8.89E+09	4.04E+10	4.47E+10
H4K8ac	GKGGK(ac)GLGK	4.96E+06	5.03E+06	1.24E+09	9.36E+08	1.26E+09	2.25E+09
	GK(ac)GGK(ac)GLGK	4.60E+07	3.97E+07	7.49E+09	5.15E+09	2.15E+10	2.49E+10
	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK	2.08E+07	2.08E+07	4.14E+09	2.53E+09	1.17E+10	1.34E+10
	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.14E+07	8.33E+06	2.12E+09	1.20E+09	7.29E+09	6.39E+09
	GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	NA	NA	1.49E+08	8.42E+07	5.23E+08	4.26E+08
	SUM	8.31E+07	7.38E+07	1.51E+10	9.91E+09	4.22E+10	4.74E+10
H4K12ac	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK	2.08E+07	2.08E+07	4.14E+09	2.53E+09	1.17E+10	1.34E+10
	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.14E+07	8.33E+06	2.12E+09	1.20E+09	7.29E+09	6.39E+09
	GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	NA	NA	1.49E+08	8.42E+07	5.23E+08	4.26E+08
	GLGK(ac)GGAK	2.32E+07	1.65E+07	2.36E+09	1.96E+09	2.36E+09	2.01E+09
	GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.55E+06	1.41E+06	2.47E+08	1.50E+08	6.35E+08	7.02E+08
	SUM	5.70E+07	4.70E+07	9.01E+09	5.92E+09	2.25E+10	2.29E+10
H4K16ac	GK(ac)GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.14E+07	8.33E+06	2.12E+09	1.20E+09	7.29E+09	6.39E+09
	GGK(ac)GLGK(ac)GGAK(ac)R	NA	NA	1.49E+08	8.42E+07	5.23E+08	4.26E+08
	GLGK(ac)GGAK(ac)R	1.55E+06	1.41E+06	2.47E+08	1.50E+08	6.35E+08	7.02E+08
	SUM	1.29E+07	9.74E+06	2.51E+09	1.43E+09	8.45E+09	7.52E+09
H4K31ac	DNIQGITK(ac)PAIR	6.51E+07	4.47E+07	2.03E+09	1.12E+09	2.60E+09	2.32E+09
	SUM	6.51E+07	4.47E+07	2.03E+09	1.12E+09	2.60E+09	2.32E+09
H4K77ac	DAVYTEHAK(ac)R	1.92E+07	1.76E+07	5.45E+07	4.05E+07	7.38E+07	5.19E+07
	SUM	1.92E+07	1.76E+07	5.45E+07	4.05E+07	7.38E+07	5.19E+07
H4K79ac	K(ac)TVTAM(o)DVVYALK	5.79E+06	4.52E+06	1.37E+07	9.81E+06	1.94E+07	9.83E+06
	SUM	5.79E+06	4.52E+06	1.37E+07	9.81E+06	1.94E+07	9.83E+06
H4K91ac	KTVTAM(o)DVVYALK(ac)R	8.32E+06	8.85E+06	1.73E+07	5.34E+06	2.94E+07	1.84E+07
	TVTAM(o)DVVYALK(ac)R	6.27E+06	5.98E+06	1.68E+07	7.53E+06	4.44E+07	2.89E+07
	SUM	1.46E+07	1.48E+07	3.41E+07	1.29E+07	7.37E+07	4.73E+07
Normalization							
	Peptide	NUT-1	NUT-2	p300-1	p300-2	Nut+p300-1	Nut+p300-2
H3	YRPGTVLALR	8.63E+10	8.07E+10	1.03E+11	7.60E+10	8.68E+10	6.33E+10
	STELLIR	2.33E+11	2.12E+11	2.87E+11	2.15E+11	2.39E+11	1.82E+11
H4	EIAQDFK	1.19E+11	1.04E+11	1.36E+11	1.13E+11	1.27E+11	7.27E+10
	DNIQGITKPAIR	1.01E+11	8.26E+10	1.35E+11	9.24E+10	1.00E+11	9.03E+10
Average	ISGLIYEETR	2.55E+11	2.27E+11	3.29E+11	2.39E+11	2.67E+11	2.28E+11
		1.59E+11	1.41E+11	1.98E+11	1.47E+11	1.64E+11	1.27E+11

Table S5 (related to Figure 6D)

Detailed quantitative analysis of site-specific histone acetylation after octamer incubation with p300 and the p300-interacting domain of NUT shown in [Table S4](#).

II- Rôle du variant d'histone H2A.L.2 dans le remplacement des histones par les protamines au cours de la spermatogénèse.

Une analyse protéomique réalisée au sein de notre laboratoire en 2007 a permis d'identifier par spectrométrie de masse les histones présentes dans un extrait protéique provenant des spermatides condensées. Cette analyse a permis de découvrir de nouveaux variants : H2A.L.1, H2A.L.2 et H2A.L.3 (Govin et al., 2007).

Parmi ces variants d'histones, H2A.L.2 présentait tous les critères pour être un excellent candidat impliqué dans le remplacement des histones. En effet, H2A.L.2 est exprimé dans les étapes tardives de la spermatogénèse, spécifiquement dans les spermatides en cours d'élongation. De plus, H2A.L.2 est retrouvé associé à TH2B, un autre variant de l'histone H2B dans des structures de transition. Ces structures sub-nucléosomales ont été mises en évidence dans les spermatides allongées/condensées après une digestion poussée à la nucléase micrococcale (MNase). Cette petite structure chromatinienne établirait un état transitoire de la chromatine durant la spermiogénèse.

Afin de mieux comprendre l'implication du variant murin H2A.L.2 lors du remplacement des histones par les protamines, au cours de ma thèse, j'ai utilisé un modèle de souris dans lequel le gène codant pour la protéine H2A.L.2 est invalidé (H2AL2-KO).

Une partie de ce travail a été réalisée en collaboration avec des laboratoires spécialisés dans la biochimie des nucléosomes, le séquençage haut-débit d'ADN et la protéomique (Laboratoires de H. Kurumizaka au Japon, plateforme de TGML à Marseille, Laboratoire de protéomique au CEA de Grenoble, BIG-BGE, CEA de Saclay pour la génération du modèle H2AL2-KO).

Résumé des résultats

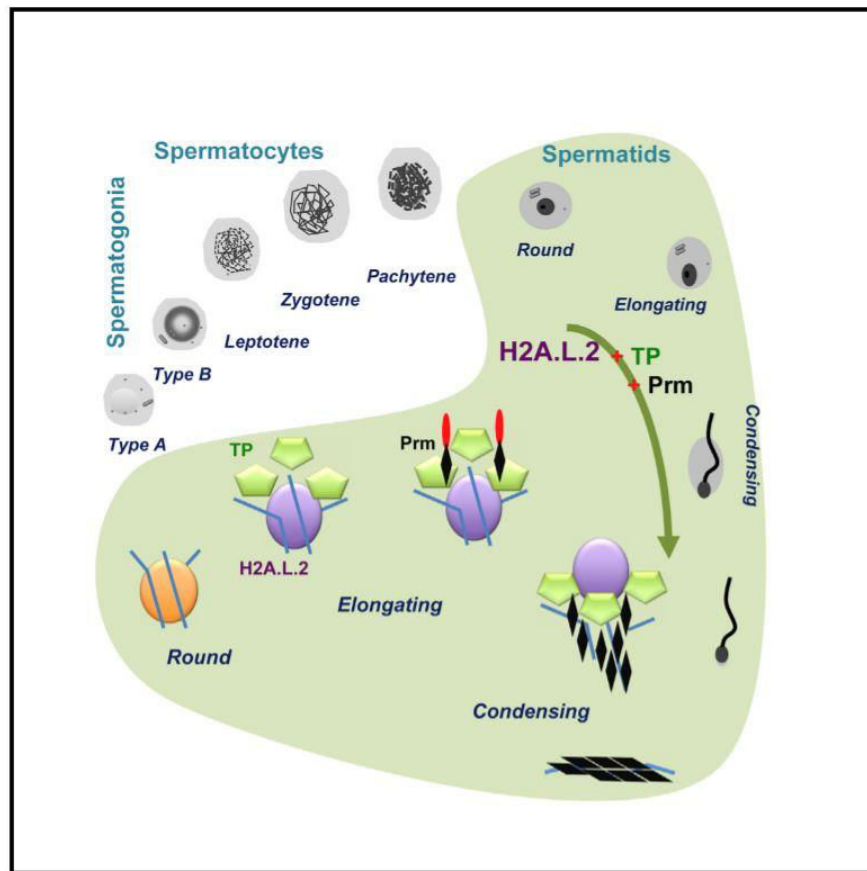


Figure 30 : Schéma bilan illustrant le rôle du variant d'histone H2A.L.2 lors de l'échange histones / protamines dans les cellules germinales mâles post-méiotiques.

Nous avons montré que le variant H2A.L.2 est exprimé parallèlement aux protéines de transition au sein des spermatozoïdes allongés lors des étapes post-méiotiques de la spermatogénèse. Le phénotype observé en absence de H2A.L.2 est très proche de celui des souris homozygotes invalidées pour les gènes codants pour les deux protéines de transitions TP1 et TP2. Les souris *H2A.L.2-KO* présentent une histologie des testicules et un nombre de spermatozoïdes matures presque identiques aux souris sauvages. Pourtant, les mâles sont complètement stériles. Nous avons montré par microscopie électronique que la chromatine des spermatozoïdes des souris *H2A.L.2-KO* présente un défaut de compaction mais également un défaut de maturation de la protamine 2. H2A.L.2 est donc nécessaire pour la compaction finale du génome ainsi que pour la fertilité des mâles.

Une série d'approches biochimiques, protéomiques et génomiques nous a permis de revoir totalement l'ancienne vision du remplacement des histones qui décrivait la transformation

des nucléosomes en nucléoprotamines et de présenter pour la première fois un modèle moléculaire qui inclut l'incorporation de l'histone variant H2A.L.2 avant l'entrée en action des protéines de transition et de proposer un nouveau rôle pour celles-ci (Figure 30).

Premièrement, le variant H2A.L.2 va se dimériser avec le variant TH2B. Ce dimère est ensuite pris en charge par la chaperonne Nap1L4 et incorporé dans le nucléosome afin de remplacer le dimère H2A-TH2B. L'incorporation du variant H2A.L.2 au sein d'un nucléosome lui confère une structure « ouverte » avec des extrémités d'ADN flexibles qui permet le recrutement des protéines de transition sur les nucléosomes. Une des fonctions primaires de H2A.L.2 est donc de permettre le dépôt des protéines de transition sur la chromatine. Nos expériences *in vitro* montrent que seules, les TPs ne permettent pas de déplacer les histones. Nous proposons donc qu'elles génèrent une plateforme pour le recrutement et la maturation des protamines. La fonction des TPs serait essentiellement de contrôler et d'orienter l'action des protamines lors du déplacement des histones. Les protamines seraient ainsi les seuls médiateurs responsables de l'expulsion des histones et induiraient la formation des états transitoires correspondant aux petites structures révélées par une digestion avec la nucléase micrococcale. Ainsi, l'incorporation de H2A.L.2 initie et orchestre une série d'états transitoires qui permet la compaction totale du génome des spermatozoïdes matures.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecular Cell* en 2017.

Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells

Sophie Barral,^{1,7} Yuichi Morozumi,^{1,2,7} Hiroki Tanaka,² Emilie Montellier,¹ Jérôme Govin,³ Maud de Dieuleveult,⁴ Guillaume Charbonnier,⁵ Yohann Couté,³ Denis Puthier,⁵ Thierry Buchou,¹ Fayçal Boussouar,¹ Takashi Urahama,² François Fenaile,⁶ Sandrine Curtet,¹ Patrick Héry,⁴ Nicolas Fernandez-Nunez,⁵ Hitoshi Shiota,¹ Matthieu Gérard,⁴ Sophie Rousseaux,¹ Hitoshi Kurumizaka,² and Saadi Khochbin^{1,8,*}

¹CNRS UMR 5309, Inserm U1209, Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble 38700, France

²Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Research Institute for Science and Engineering, Institute for Medical-oriented Structural Biology, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480, Japan

³Université Grenoble Alpes, Inserm U1038, CEA, BIG-BGE, Grenoble 38000, France

⁴Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette 91198, France

⁵TGML, platform IbiSA, Aix Marseille Univ, Inserm U1090, TAGC, Marseille 13288, France

⁶Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, DSV/iBiTec-S/SPI, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette 91191 Cedex, France

⁷Co-first author

⁸Lead Contact

*Correspondence: saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.025>

SUMMARY

Histone replacement by transition proteins (TPs) and protamines (Prms) constitutes an essential step for the successful production of functional male gametes, yet nothing is known on the underlying functional interplay between histones, TPs, and Prms. Here, by studying spermatogenesis in the absence of a spermatid-specific histone variant, H2A.L.2, we discover a fundamental mechanism involved in the transformation of nucleosomes into nucleoprotamines. H2A.L.2 is synthesized at the same time as TPs and enables their loading onto the nucleosomes. TPs do not displace histones but rather drive the recruitment and processing of Prms, which are themselves responsible for histone eviction. Altogether, the incorporation of H2A.L.2 initiates and orchestrates a series of successive transitional states that ultimately shift to the fully compacted genome of the mature spermatozoa. Hence, the current view of histone-to-nucleoprotamine transition should be revisited and include an additional step with H2A.L.2 assembly prior to the action of TPs and Prms.

INTRODUCTION

Spermatogenesis generates the only cells—spermatozoa—capable of leaving the parent organism and transmitting the male genome to the next generation. Mature spermatozoa are produced through a continuous differentiation of progenitor cells, spermatogonia, that undergo meiotic divisions to generate

haploid cells (spermatids). In mammals, the universal mode of DNA packaging in eukaryotes undergoes a profound transformation when spermatid nuclei start the elongation process (elongating spermatids) (De Vries et al., 2012; Gaucher et al., 2010). Genome-wide histone hyperacetylation seems to signal the initiation of the process (Goudarzi et al., 2014), which is characterized by the replacement of histones by non-histone basic proteins, transition proteins (TPs), and protamines (Prms), in subsequent stages in condensing spermatids (Gaucher et al., 2010).

The current vision of these transformations proposes that histones are replaced by TPs (Meistrich et al., 2003), which in turn are removed and replaced by Prms (Lewis et al., 2003). However, TPs and Prms seem to have the same time frame of appearance in elongating/condensing spermatids when histones are still detectable (Meistrich et al., 2003; Zhao et al., 2004b) and their precise order of action still remains obscure.

Seminal works showed that full production of Prms is required for tight genome packaging (Cho et al., 2001, 2003). In addition, the generation of mouse TP1 and TP2 double knockout (KO) (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a, 2004b) shows that, although these mice are infertile, Prms alone are capable of histone eviction. These data therefore question the functional utility of TPs in the process of histone removal.

These studies also demonstrate that TPs are somehow necessary for the processing of Prm2, which is synthesized as a pre-protein, and for the ultimate male genome compaction (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a), but these observations do not explain the molecular basis of the functional relationship between TP assembly, Prm incorporation, and histone replacement.

In the past years, our laboratory has developed several lines of research to tackle the molecular basis of histone eviction and the establishment of the final Prm-dependent genome packaging (Govin et al., 2012; Rousseaux et al., 2011). One of these

strategies, which is aimed at the identification of histones present in chromatin during the process of histone-to-Prm replacement, led to the discovery of a group of novel H2A- and H2B-type histone variants (Govin et al., 2007). One of the identified H2A variants, H2A.L.2, particularly attracted our attention since it is expressed during late spermatogenesis, precisely at the time of histone replacement (Govin et al., 2007). Further investigations showed that, along with the H2B histone variant, TH2B, H2A.L.2 is essentially present in micrococcal nuclease (MNase)-sensitive sub-nucleosomal particles in elongating/condensing spermatids (Govin et al., 2007). TH2B was first identified many years ago in male germ cells, but its function had remained unexplored until recently (Montellier et al., 2013; Shinagawa et al., 2014). Our recent work demonstrates that TH2B is expressed as soon as spermatogonia commit into meiotic divisions and that it gradually replaces H2B at a genome-wide level (Montellier et al., 2013). Interestingly, we also observed that H2A.L.2 preferentially dimerizes with TH2B (Govin et al., 2007). Therefore, at the time of its expression, H2A.L.2 should compete with other H2As for dimerization with TH2B and hence be massively incorporated into the chromatin of elongating spermatids. Hence, H2A.L.2 seemed to be an excellent candidate whose functional study could bring valuable information on the molecular basis of histone-to-Prm transition.

Following this reasoning, we generated mice lacking H2A.L.2. Interestingly, the phenotypes observed in the absence of H2A.L.2 appeared to be very close to those previously reported for TP1/TP2 double-knockout mice (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a, 2004b). This observation led us to hypothesize that, in the absence of H2A.L.2, TPs could be non-functional. Focusing our investigations on TPs through a series of biochemical, proteomic, and genomic approaches using wild-type (WT) and H2A.L.2-KO condensing spermatids, we explored, in detail, all the critical steps of the transformation of a nucleosomal structure into nucleoprotamine. As a result, we demonstrate that the current vision of histone-to-Prm transition needs to be completed and updated to include a critical step, which is the incorporation of this H2A histone variant prior to the action of transition proteins.

RESULTS

H2A.L.2 Is Co-expressed with Transition Proteins

Previously, we identified H2A.L.2 as a new histone variant specifically expressed in post-meiotic elongating spermatids, when TPs also start to accumulate (Govin et al., 2007). Here, we designed several experiments to precisely define the timing of H2A.L.2 accumulation compared to TPs. Immunoblots on extracts from developing mouse testes show that H2A.L.2 is first detected at 29 days post-partum (dpp), at the same time as TPs (Figure 1A). Co-detection of H2A.L.2 and TP2 by immunofluorescence on cells from 28 and 29 dpp mouse testes, respectively, before and after H2A.L.2 protein accumulation, shows not only that H2A.L.2 is expressed precisely at the same time as TP2, but also that the two proteins are in fact co-expressed in the same cells (Figure 1A). Detection of H2A.L.2 and TP1 and TP2 on testis sections by immunohistochemistry (IH) confirmed the above findings, highlighting that TPs and

H2A.L.2 expression is coordinated and occurs in the same cells at the same time (Figure 1B).

H2A.L.2 Is Required for Final Sperm Genome Compaction and Male Fertility

We then generated H2A.L.2-KO mice following the same strategy as previously used in our TH2B mouse model (Montellier et al., 2013). Briefly, the insertion of a Neomycin (*Neo*) cassette in the 3' part of the gene (Figure S1) leads to a complete lack of H2A.L.2 protein production, since no trace of the protein was detected using either immunodetection or UHPLC-MS approaches in whole-testis extracts or in mature spermatozoa (Figure 2A). Despite normal testis histology (Figure S2A), normal production of TPs and Prms (Figure 2B; Figure S3A), and normal spermatozoa counts (Figure 2B), H2A.L.2-KO male were completely sterile, unable to father any pups (Figure 2C, upper panel). Furthermore, the analysis of oocytes after *in vivo* or *in vitro* fertilization using H2A.L.2-KO male mice spermatozoa showed an absence of fertilized eggs (Figure 2C, middle and lower panels, respectively).

A high-resolution analysis of chromatin texture in mature spermatozoa from WT and H2A.L.2-KO mice by electron microscopy (EM) showed that, whereas the chromatin of WT sperm is relatively uniformly dense with only a few translucent regions, many translucent areas are visible in the chromatin of spermatozoa lacking H2A.L.2, which are indicative of a defective global genome compaction (Figure 2D, upper panels).

Because of the observed spatiotemporal association between H2A.L.2 and TPs expression, we paid specific attention to the published phenotypes of TP1/TP2 double-KO mice, which presented similar defective genome compaction in mature spermatozoa as well as marked defects in the processing of pre-Prm2 (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a). To further examine the phenotypical similarities between the absence of H2A.L.2 and TPs, we also monitored the processing of pre-Prm2 in the absence of H2A.L.2 compared to WT spermatozoa. Figure 2D (lower panels) shows that, in the absence of H2A.L.2, a significant proportion of pre-Prm2 remains unprocessed.

Finally, since we previously showed that a fraction of H2A.L.2 remains in mature spermatozoa and that H2A.L.2 preferentially dimerizes with TH2B (Govin et al., 2007), we also visualized TH2B and H2A.L.2 in epididymal spermatozoa from both genotypes. Figure S2B shows that the absence of H2A.L.2 also leads to defective TH2B retention but does not affect the amounts of retained H3 and H4.

Altogether, these investigations led us to hypothesize that H2A.L.2 and TPs are functioning in interdependent molecular mechanisms, whose respective dysfunctions would lead to the same global defective genome compaction, and prompted us to specifically consider the activity of TPs and Prms in the absence of H2A.L.2.

H2A.L.2 Is Required for Transition Proteins Loading onto the Nucleosome and for Efficient Prm Assembly

In the absence of H2A.L.2, TP1 and TP2 are normally expressed in the expected cell types (Figure 3A, upper panels; Figure S3A). However, a high-resolution analysis of TP1 and TP2 distribution in the nucleus of condensing spermatids demonstrates that, while these proteins are associated with chromatin in WT cells,

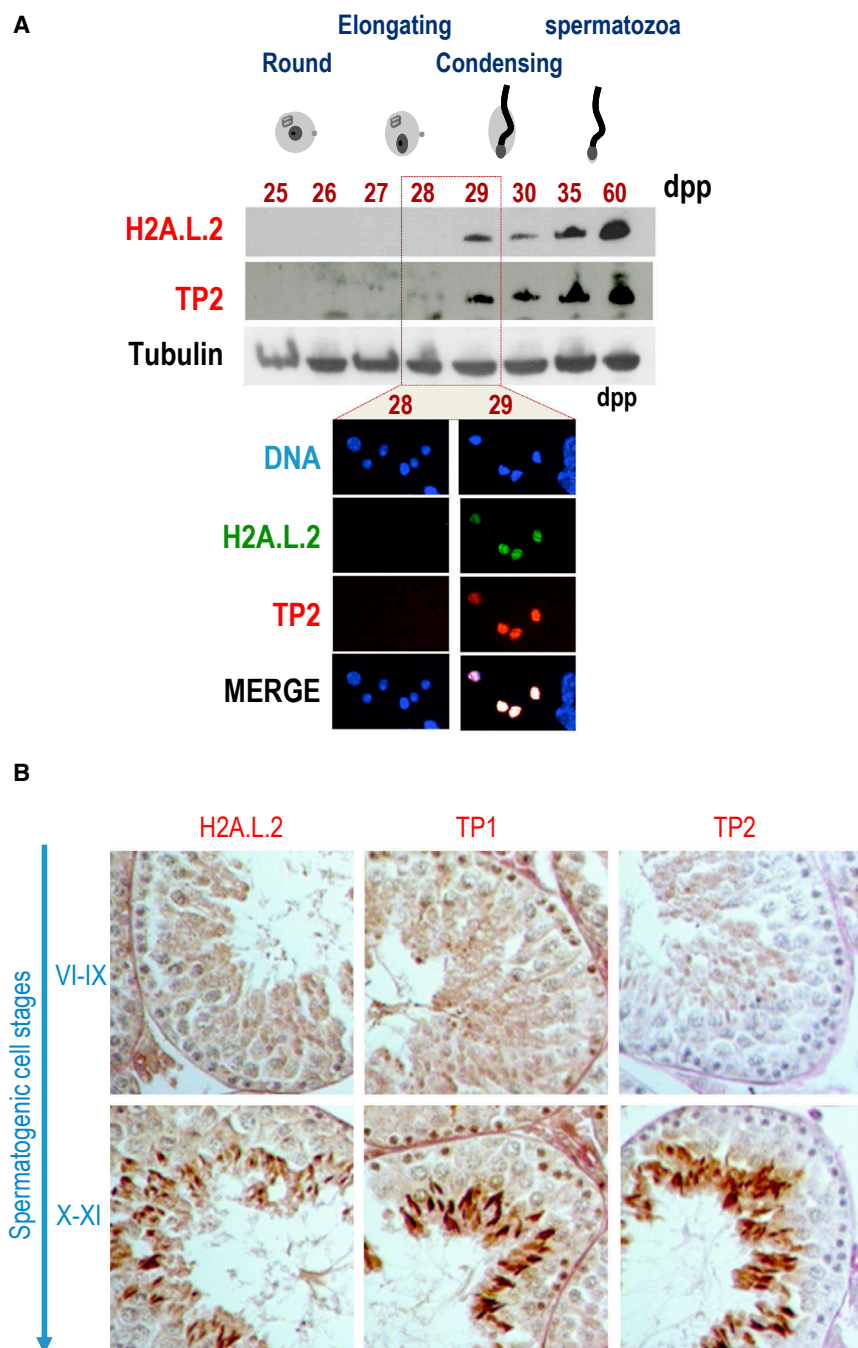


Figure 1. H2A.L.2 and Transition Proteins Are Co-expressed

(A) Total extracts from testes taken at the indicated days after birth (dpp) were successively probed with anti-H2A.L.2, anti-TP2, and anti-tubulin antibodies as indicated (upper panels). The lower panels show the co-detection of H2A.L.2 (rabbit antibody) and TP2 (goat antibody) in testis squash preparations, using testes taken at 28 and 29 dpp as indicated. DNA was stained by DAPI, and the merge panels show the superposition of DNA, TP2, and H2A.L.2 detections.

(B) Sections of paraffin-embedded testes were used to detect cells expressing H2A.L.2, TP1, and TP2. The spermatogenic cell stages for each section are indicated.

extract from purified condensing spermatids, which solubilizes TPs and the associated salt-resistant interactants but does not extract histones from the remaining chromatin (Figure S3C). These extracts were used to immunoprecipitate TP2. Figure 3B shows that TP2 is efficiently and specifically immunoprecipitated in both situations, with no trace of TP2 or its associated proteins, when an irrelevant antibody was used (Figure 3B, Ctl lanes). Co-immunoprecipitation of H3 and TH2B showed that significant amounts of histones become associated with TP2 independently of H2A.L.2. In the absence of H2A.L.2, pre-Prm2 is detected in association with TP2, whereas in the presence of H2A.L.2, only trace amounts of pre-Prm2 are observed (Figure 3B). The presence of pre-Prm2 in soluble extracts from H2A.L.2-KO spermatids and its enrichment in the TP2 immunoprecipitates imply that these cells face a Prm2 deficiency for full genome packaging.

The simplest explanation for the trapping of pre-Prm2 by TP2 would be the ability of the two proteins to interact. To test this hypothesis, we ectopically expressed TP2 in COS cells along with full-length pre-Prm2, its N-terminal half

(normally removed during assembly), or its C-terminal half (the assembled part of the protein). 0.5 M salt extracts were prepared, and TP2 was immunoprecipitated. This experiment demonstrated that TP2 specifically interacts with the full-length Prm2 and with its C-terminal half, but not with its N-terminal half, which is normally proteolytically removed (Figure S4).

Therefore, when TPs are not loaded on chromatin, the accumulating TP2 could create a “sink” that traps a fraction of the incoming pre-Prm2, preventing full Prm2 assembly.

they both show defective localization in the absence of H2A.L.2 (Figure 3A, lower panels). Simultaneous detection of TP1 and TP2 and of the acrosome by lectin in confocal microscopy confirmed the aberrant accumulation of TP1 and TP2 in the peri-nuclear regions that do not overlap with the acrosome (Figure S3B).

These results clearly demonstrate the inability of TPs to normally associate with chromatin in the absence of H2A.L.2.

To further characterize TPs and their associated proteins in the presence or absence of H2A.L.2, we prepared a 0.5 M salt

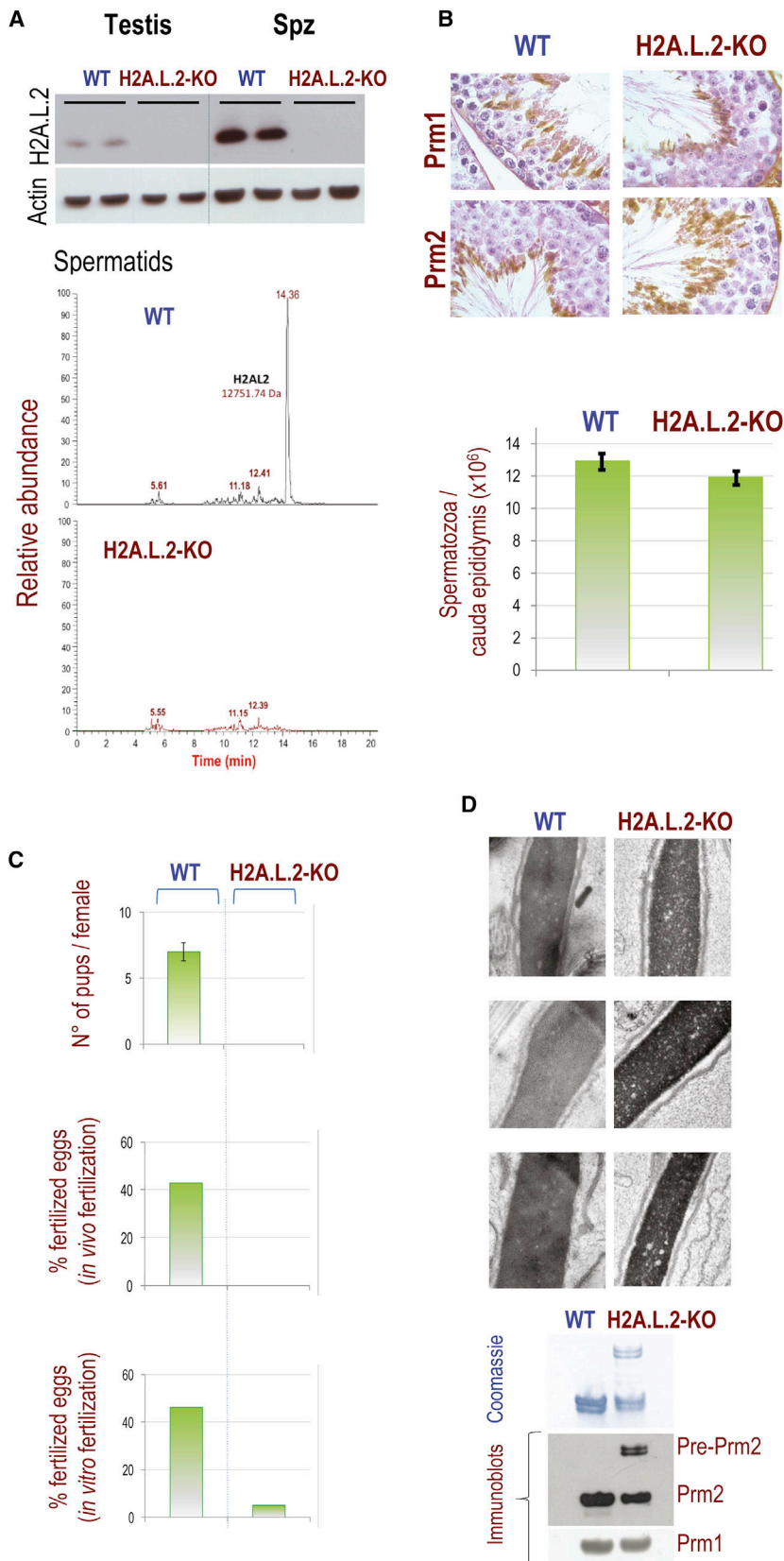


Figure 2. Lack of H2A.L.2 Is Associated with Male Infertility and Results in Deficient Final Genome Compaction and Abnormal Pre-protamine 2 Processing

(A) Whole testis or epididymal spermatozoa extracts from WT and H2A.L.2-KO mice were analyzed by immunoblotting using anti-H2A.L.2 and anti-actin antibodies (upper panels). The lower panels show the UHPLC-MS profiling of histones extracted from the WT or the H2A.L.2-KO condensing spermatids.

(B) Sections of paraffin-embedded testes from WT and H2A.L.2-KO mice were probed with anti-Prm1 and anti-Prm2 antibodies as indicated. The histograms indicate the number of epididymal spermatozoa counted from seven WT and seven H2A.L.2-KO males.

(C) The number of pups per female is indicated after crossing WT female mice with WT ($n = 5$) or H2A.L.2-KO ($n = 5$) males as indicated (upper panel). Oocytes from six WT females mated with WT ($n = 3$) or H2A.L.2-KO ($n = 3$) males were examined for fertilization, and the number of fertilized oocytes is presented as the percentage of analyzed oocytes (middle panels). Oocytes from the same number of WT females as above were obtained and used for in vitro fertilization (IVF) with spermatozoa from WT ($n = 3$) or H2A.L.2-KO ($n = 3$) males. The fertilization success rate is indicated as a percentage of oocytes giving rise to stage 2 embryos (lower panels).

(D) Genome compaction in WT and H2A.L.2-KO spermatozoa was monitored by electron microscopy (upper panels). Acid extracts from WT and H2A.L.2-KO spermatozoa were analyzed after Triton-Acid-Urea (TAU) gel electrophoresis. The gel was stained by Coomassie (indicated) or transferred onto a membrane for immunoblots with the indicated antibodies (lower panels). For (B) and (C), bars show the standard errors.

See Figure S1 for the strategy to generate mice with inactivated *h2a.l.2* gene. The resulting genetically modified mice are called in this manuscript H2A.L.2-KO.

See also Figures S2A and S3A for testis histology and the pattern of TP1 and TP2 expression, respectively.

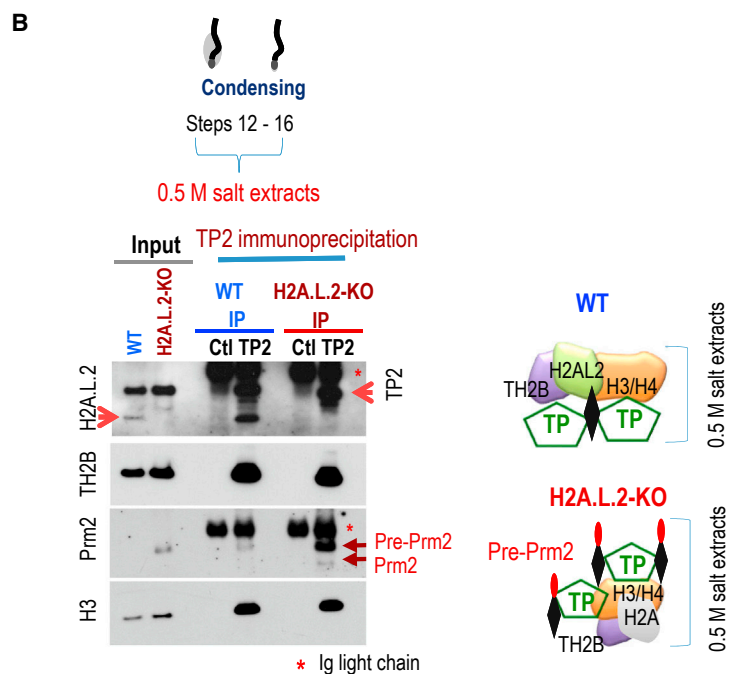
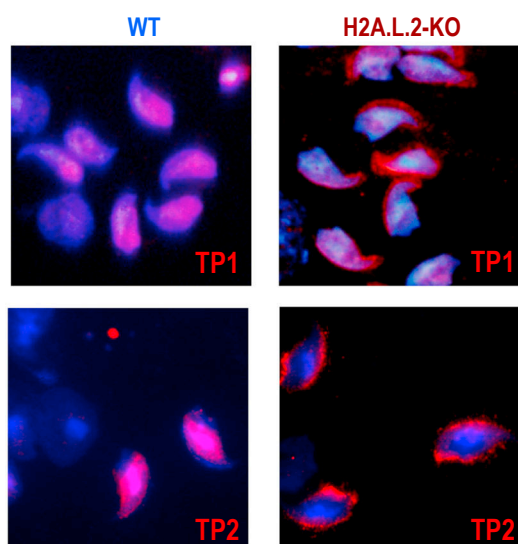
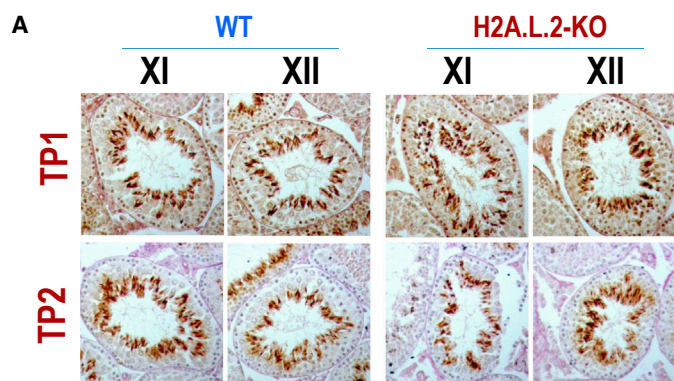
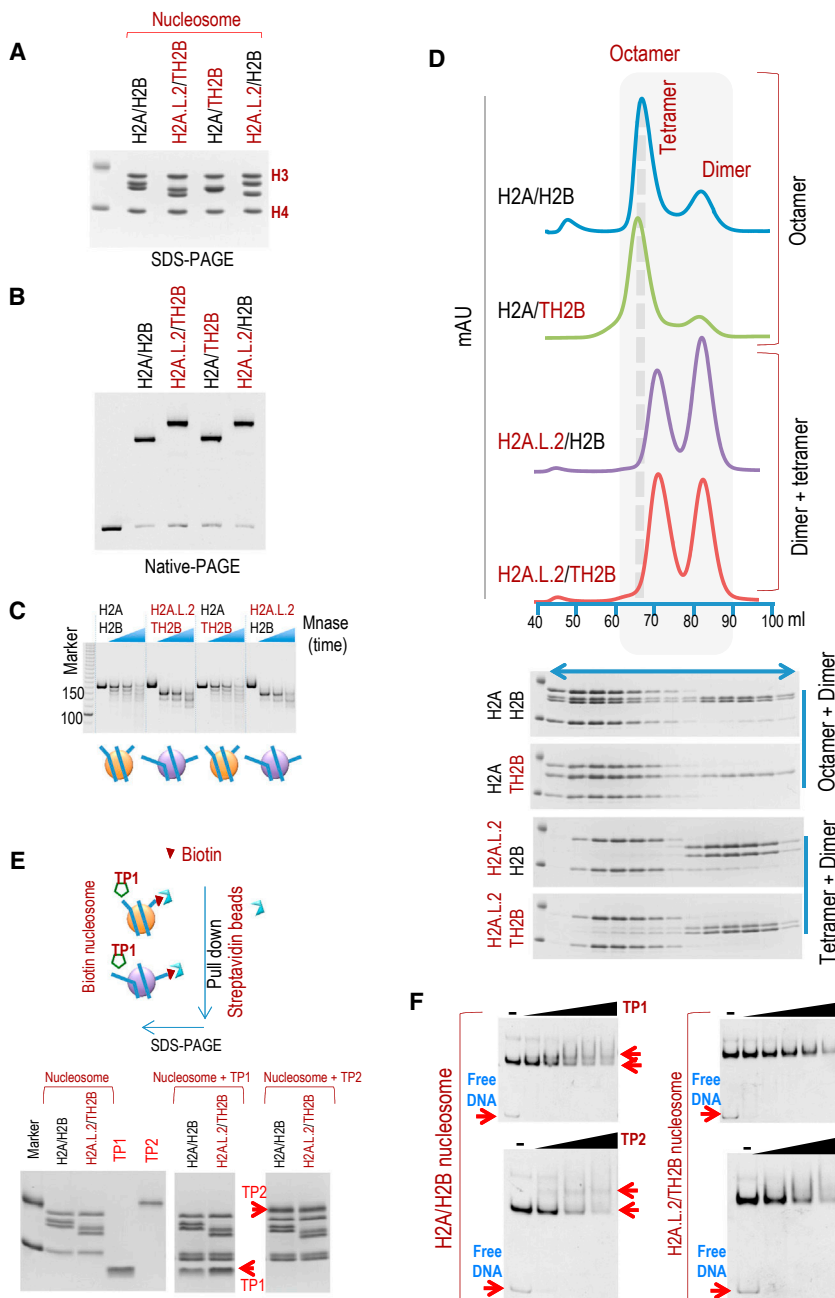


Figure 3. Characterization of Transition Proteins' Activities in the Presence or Absence of H2A.L.2

(A) TP1 and TP2 were immunodetected on testis sections from WT and H2A.L.2-KO spermatogenic cells as indicated. The spermatogenic cell stages are indicated (upper panels). The lower panels show merged images after DNA staining with DAPI (blue) and TP1 and TP2 immunodetection (red) in WT and H2A.L.2-KO condensing spermatids.

(B) Steps 12–16 spermatids were purified from WT and H2A.L.2-KO testes, and the corresponding 0.5 M salt nuclear extracts prepared. The extracts were then used to immunoprecipitate TP2 (IP TP2). An anti-goat Ig was used as a control antibody (IP Ctl). The immunoprecipitated materials were then probed with the indicated antibodies. Please note that the upper panel shows the co-detection of both TP2 and H2A.L.2 as indicated. The arrows show the position of pre-Prm2 and Prm2 and "*" indicates Ig light chains.

The schemes on the right summarize the results of these immunoprecipitations by indicating the proteins of interest found in association with TP2 in the 0.5 M salt extracts. See also Figure S3B for the co-detection of TP1 and TP2 with the acrosome, Figure S3C for the characterization of 0.5 M salt extracts, and Figure S4 for the validation of TP2-Prm2 interaction.



H2A.L.2 Is Required for the Invasion of Nucleosomes by TPs

To better understand the role of H2A.L.2 in mediating the action of TPs on nucleosomes, we expressed and purified core histones, including H2A, H2B, TH2B, and H2A.L.2, and then used them for *in vitro* nucleosome reconstitution (Figures 4A and 4B). These nucleosomes were then digested with MNase. Figure 4C shows that the presence of H2A.L.2 is sufficient to generate nucleosomal DNA fragments that are rapidly digested by MNase. These data are perfectly consistent with the data previously published by various groups, where the H2A.B and H2A.L variants, which lack the characteristic H2A acidic patch and pre-

Figure 4. H2A.L.2 Is Required for the Invasion of Nucleosomes by Transition Proteins

(A and B) The indicated purified nucleosomes were analyzed by 18% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (A) and 6% native PAGE (B). (C) The reconstituted nucleosomes shown in (B) were digested with MNase during 0, 5, 10, and 20 min, and the DNA was purified and visualized after migration.

(D) The histone combinations shown in (A) were used to generate histone octamers, which were then analyzed by gel filtration. The gel filtration profiles of the indicated histone combinations used in the octamer formation assays are indicated. Gel filtration fractions (boxed) were analyzed on SDS-PAGE to visualize the presence of histones (lower panels).

(E) H2A-H2B or H2A.L.2-TH2B containing nucleosomes were reconstituted on biotinylated DNA (“Nucleosome”) and incubated with equimolar amounts of TP1 and TP2 (indicated). The beads were washed and the bound proteins were recovered in SDS-PAGE loading buffer. The bound proteins (“Nucleosome + TP1” and “Nucleosome + TP2”) were analyzed on an 18% SDS-PAGE and visualized by Coomassie brilliant blue staining.

(F) Nucleosomes shown in (B) were incubated with increasing concentrations of purified recombinant TP1 and TP2 and their association with nucleosomes visualized after migration on native PAGE. Figure S5A shows the quantifications of TP1 and TP2 binding corresponding to the experiment shown in (E) from three independent assays.

sent a docking domain shorter than H2A, protect only around 120–130 bp of nucleosomal DNA, since they release nucleosomal DNA at the entry and exit of nucleosomes (Arimura et al., 2013; Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006; Nekrasov et al., 2012; Soboleva et al., 2011; Syed et al., 2009).

Our *in vitro* studies also revealed another characteristic of H2A.L.2-containing nucleosomes, explaining how H2A.L.2 could contribute to nucleosome disassembly. Indeed, in the absence of

DNA, we found that it was impossible to reconstitute histone octamers containing H2A.L.2, while stable octamers could be formed with H2A (Figure 4D).

These data suggest that all the events that weaken histone-DNA interactions, such as histone post-translational modifications (PTMs) at specific positions (Tropberger and Schneider, 2013), and competition with strong DNA-binding proteins, such as Prms, have the potential to induce an immediate dissociation of TH2B-H2A.L.2 from H3-H4.

We took advantage of this *in vitro* system to monitor the functional interface between H2A or H2A.L.2-containing nucleosomes and TP1 and TP2.

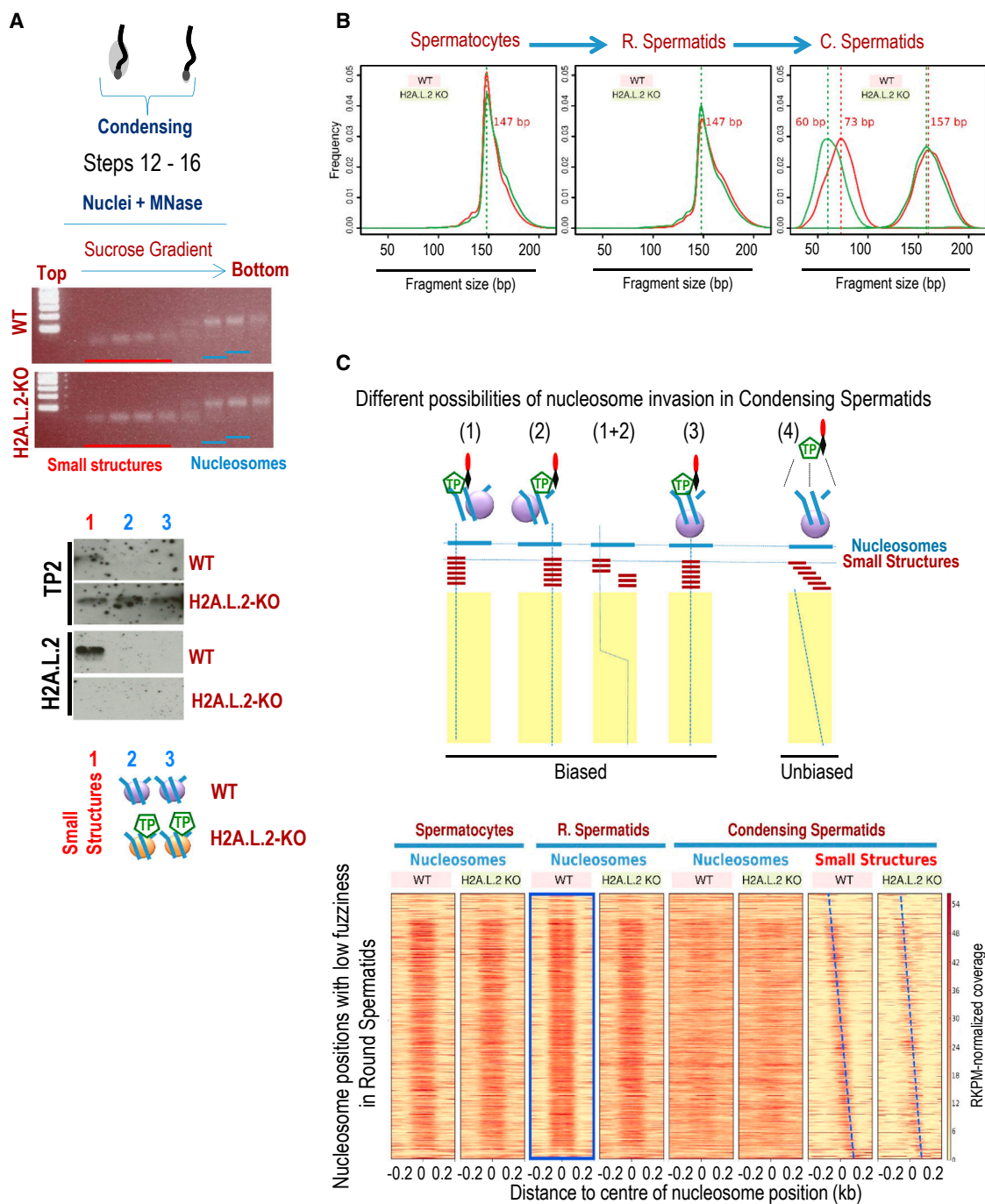


Figure 5. The Absence of H2A.L.2 Affects the Structure of Transitional States In Vivo

(A) Nuclei from condensing spermatids were extensively digested with MNase, and the released structures were loaded on a sucrose gradient to separate the small sub-nucleosomal structures from the nucleosomes. The ethidium bromide-stained gels show different fractions of the gradient collected (upper panels). The indicated fractions were analyzed either after pooling (1) or directly (2 and 3) by immunodetection of TP2 and H2A.L.2. The scheme below represents the nature of complexes in these fractions.

(B) Paired-end sequencing allows the accurate determination of DNA fragment lengths produced by MNase. Standard nucleosome size (147 bp) is found in spermatocytes and round spermatids, both in WT and H2A.L.2-KO samples, whereas the remaining nucleosomes in condensing spermatids produce slightly longer fragments (157 bp). The short MNase fragments observed in the condensing spermatids are smaller in the absence of H2A.L.2 than in WT cells (73 bp versus 60 bp).

(C) Schematic representations depicting various theoretical possibilities for the transformation of nucleosomes of round spermatids into the small structures observed in condensing spermatids. Five different possibilities (among others) were considered here, where the invading TP2/Prms could displace the nucleosomal DNA in biased or unbiased manners (upper panels).

(legend continued on next page)

First, we reconstituted nucleosomes as above but using biotinylated DNA and incubated them with purified TP1 and TP2. Streptavidin beads were used to pull down the corresponding nucleosomes and analyze the presence of associated TP1 and TP2. [Figure 4E](#) shows that H2A.L.2-containing nucleosomes have an increased interaction with TP1 compared to H2A-containing nucleosomes (see also [Figure S5A](#)). Under the same conditions, TP2 shows a better propensity than TP1 to interact with nucleosomes regardless of the presence of H2A.L.2 ([Figure 4E](#); [Figure S5A](#)).

We also analyzed the mode of TP1/TP2 interaction with nucleosomes bearing H2A or H2A.L.2. The reconstituted H2A/H2B and H2A.L.2/TH2B nucleosomes were incubated with increasing amounts of purified TP1 and TP2 and the interaction between TP and nucleosomes was monitored by gel-shift assays ([Figure 4F](#)). These experiments revealed different modes of interaction between TPs and canonical nucleosomes or H2A.L.2-containing nucleosomes. In canonical nucleosomes, TPs follow a binding mode, which is reminiscent of the binding of linker histones to nucleosomes, where the loading of additional TP molecules leads to the appearance of defined complexes visible above the nucleosomes ([Figure 4F](#)). In contrast, TP loading by H2A.L.2-containing nucleosomes leads to the disappearance of nucleosomes in favor of undefined higher molecular weight complexes without the generation of discrete TP-nucleosome species ([Figure 4F](#)). The latter are probably present in different species diluted in a smear above the nucleosome.

We then wanted to know whether the resistance of canonical nucleosomes to TP loading, shown here *in vitro*, could also be observed *in vivo* in the absence of H2A.L.2.

Previously, we had shown that extensive MNase digestion of chromatin from condensing spermatids releases remaining nucleosomes as well as transitional structural states ([Govin et al., 2007](#); [Montellier et al., 2013](#)). The latter contain TPs, H2A.L.2, and TH2B and are the result of the transformation of nucleosomes at the time of histone eviction ([Govin et al., 2007](#)). The same experiment was repeated here to evaluate the role of H2A.L.2. Nuclei from purified condensing spermatids from WT and H2A.L.2-KO mice were incubated with MNase and the resulting released chromatin fragments loaded on a sucrose gradient to separate sub-nucleosomal particles from nucleosomes ([Figure 5A](#)). This experiment demonstrated that the transformation of nucleosomes into small sub-nucleosomal particles also takes place in the absence of H2A.L.2 ([Figure 5A](#), upper panel; [Figure S5B](#)). Proteins from the different fractions were then analyzed by immunoblotting, confirming the presence of H2A.L.2 and TPs only in the subnucleosomal particles as previously reported ([Govin et al., 2007](#)). Interestingly, in the absence

of H2A.L.2, TPs were also associated with nucleosomes, which is in drastic contrast with the WT situation, where TPs could only be detected with the sub-nucleosomal structures ([Figure 5A](#), lower panels; [Figure S5B](#)).

These data strongly support our observations based on *in vitro* nucleosome reconstitution and show that, in the absence of H2A.L.2, TPs have a limited capacity to invade the nucleosomes and hence to efficiently mediate the subsequent transformation.

Altogether, these investigations indicate that the incorporation of H2A.L.2 itself is a critical event that “prepares” nucleosomes for the action of additional factors.

Genome-wide Transformation of Nucleosomes into Transitional States in Condensing Spermatids: The Impact of H2A.L.2

To better characterize the transformation of nucleosomes into sub-nucleosomal particles, we sequenced MNase nucleosomal and sub-nucleosomal fragments from condensing spermatids (shown in [Figure 5A](#) and [Figure S5B](#)). In addition, we sequenced mono-nucleosomal DNA fragments released after extensive MNase digestion of spermatogenic cell populations enriched in meiotic spermatocytes and early post-meiotic round spermatids.

Paired-end sequencing of these fragments allowed us not only to map the position of these fragments on the genome, but also to determine the size distribution of the nucleosomal and sub-nucleosomal fragments in the WT, as well as in H2A.L.2-KO, cells. This analysis showed that, in the absence of H2A.L.2, the nucleosomal fragments present strictly the same size distribution in spermatocytes, round spermatids, and condensing spermatids as in WT cells ([Figure 5B](#)). Interestingly, this size distribution analysis also shows that, although sub-nucleosomal particles are generated in the absence of H2A.L.2, they are smaller than sub-nucleosomal fragments observed in the WT condensing spermatids ([Figure 5B](#)), suggesting that, in the absence of H2A.L.2, an altered DNA-protein organization results in a modified MNase digestion of the associated DNA.

We also took advantage of this sequencing analysis to better characterize the propensity of various genomic regions to change into transitional states. To this end, we compared the global genomic distribution of the DNA fragments present in the transitional structures of condensing spermatids to the genomic fractions covered by nucleosomes at earlier stages and to the whole genome. This analysis revealed a globally similar genomic distribution for the sub-nucleosomal DNA in condensing spermatids compared to nucleosomal regions at earlier stages ([Figure S6](#)), indicating that, in condensing

The lower panels show the Heatmaps of RPKM-normalized coverage around nucleosome positions for the indicated stages and genotypes. The blue frame highlights low fuzziness nucleosome positions in round spermatids defined by the DANPOS peak caller (dynamic analysis of nucleosome position and occupancy by sequencing; see the [STAR Methods](#) section). Only the 4,000 positions with lowest fuzziness in round spermatids are depicted. The rows are ordered according to the WT small structure track, using the 5' to 3' position of the maximum signal in the $-70/+70$ bp region around reference nucleosome center. The centers of small structure fragments can be visually approximated by a straight oblique line, depicted with the blue dotted lines on the heatmaps.

[Figure S5B](#) shows a more detailed analysis of TP2 distribution in the sub-nucleosomal structures in the material already analyzed in (A). A similar independent experiment as in (A) was performed to also visualize the distribution of TP1.

[Figure S6](#) shows the genomic distribution of the regions associated with well-positioned nucleosomes in spermatocytes and round spermatids or with the small structures in condensing spermatids in WT and H2A.L.2-KO mice.

spermatids, the nucleosomes inherited from previous stages are mainly transformed into transitional states.

The fact that we generated a map of nucleosomal fragments and the corresponding small structures in a stage-specific manner also allows us to consider the mode of transformation of nucleosomes into small structures. In other words, it is possible to map the positions of the 73 bp and 60 bp DNA fragments in condensing spermatids with respect to the corresponding parental nucleosomes in round spermatids. To do so, we first identified nucleosomes with low fuzziness in round spermatids, which correspond to the best-positioned nucleosomes (minimal variation of position between cells) (Figure 5C, lower panel, blue frame, "Round Spermatids"). Interestingly, these nucleosomes have a tendency to occupy the same position in spermatocytes (Figure 5C, lower panel, "Spermatocytes"). The majority of these nucleosomes are transformed into small structures in condensing spermatids, since only a small proportion of these positions is present in the nucleosomal fraction of condensing spermatids (Figure 5C, condensing spermatids, nucleosomes).

In order to precisely map the DNAs corresponding to the small structures in condensing spermatids with respect to their parental nucleosomes in round spermatids, we ordered these fragments from 5' to 3' of the parental nucleosome.

Theoretically, the transformation of nucleosomes could occur following different scenarios (depicted in Figure 5C, upper panels). A biased invasion of nucleosomes from either side or from the dyad would result in a biased mapping of the corresponding small structures (Figure 5C, upper panel, biased), whereas an unbiased invasion of nucleosomes would lead to the generation of small structures mapping all along the corresponding parental nucleosomal DNA (Figure 5C, upper panel, unbiased).

Following this relative mapping of the small structures in condensing spermatids, our results suggest an unbiased invasion of the parental nucleosomes (Figure 5C, lower panels, condensing spermatids, small structures, the blue dotted lines highlight the order of the mapped DNA fragments).

Our results are in agreement with a model where Prms would initiate their assembly on DNA in the transforming nucleosomes at any positions in both WT and H2A.L.2-KO condensing spermatids. H2A.L.2 does not seem to modify this mode of nucleosome transformation. However, the observed size difference of MNase-protected DNA in these small structures between the two genotypes demonstrates that the protein organization in these structures is dependent on H2A.L.2. This could be partly explained by the deficiency in mature Prm2 observed in H2A.L.2-KO cells (Figure 3B).

Mechanism of H2A.L.2 Assembly

All the data presented here so far show that H2A.L.2 incorporation is an important event in the transformation of nucleosomes into nucleoproteins. The important question is whether there is a testis-specific system specialized in mediating the incorporation of H2A.L.2, which would hence trigger the nucleosome transformation process.

To address this question, we took advantage of our previous finding that TH2B preferentially dimerizes with H2A.L.2 and that TH2B is present with H2A.L.2 in the transitional structures (Govin et al., 2007), as well as of our mouse model expressing

an endogenous TH2B-tag histone (Montellier et al., 2013). This tag system allowed us to perform a highly reliable and efficient tandem affinity purification (TAP) of soluble TH2B, enabling us to identify its associated chaperone systems.

Soluble TH2B was purified in two independent experiments using first a total germ cell suspension (experiment 1) and second round/elongating spermatid-enriched cell fractions (experiment 2). In both experiments, the extracts were submitted to a TAP-tag protocol involving an anti-Flag immunoprecipitation and elution of the immunoprecipitated materials with the Flag peptide followed by an anti-hemagglutinin (HA) immunoprecipitation (Figure 6A). Mass spectrometry-based proteomic analyses were performed in order to identify and compare the proteins present in the eluates of control and TH2B-tag purifications. All the relevant proteins identified in these two experiments are listed in Table S1.

The outcome of this experiment is that TH2B dimerizes with various H2A variants and hence associates with known H2A variant-specific chaperone systems, suggesting that the H2A part of the TH2B heterodimer is a determinant element in defining the type of chaperone involved.

The analysis of these chaperone systems revealed the presence of the members of the two known H2A.Z chaperone systems, Tip60 (except ANP32E) and SRCAP (Latrick et al., 2016; Obri et al., 2014), as well as of generalist H2A-H2B chaperones, including FACT, Nap1L1, and Nap1L4. Interestingly, we also found MCM2, MCM4, MCM6, and MCM7, previously identified as H3-H4 chaperones in DNA-replicating cells (Groth et al., 2007) (Figure 6A). Since round/elongating spermatids do not replicate their DNA, in this particular context, MCM2-MCM7 may mostly contribute to nucleosome disassembly.

In order to define the specific H2A.L.2 chaperone system and also to test whether the H2A.Z chaperone complexes could also control H2A.L.2 assembly, we prepared soluble extracts from total germ cells and immunoprecipitated H2A.L.2. As expected, H2A.L.2 was found in a complex with TH2B, but neither H2A nor H2B were detected (Figure 6B). We then probed the H2A.L.2 co-immunoprecipitated materials for the presence of RuvBL1 and RuvBL2 present in both Tip60 and SRCAP H2A.Z complexes, as well as for YL1 shown to be the direct chaperone of H2A.Z (Latrick et al., 2016; Obri et al., 2014). Although all these proteins were easily detected in the extract (Figure 6B, Input), none were found in interaction with H2A.L.2. In contrast, when we tested the regular H2A-H2B chaperone, Nap1L4, we found that it co-purifies with H2A.L.2 (Figure 6B).

In a previous work, aiming at the identification of chaperones mediating the many genome-packaging transitions that occur in condensing spermatids, we used a strategy based on an affinity column containing recombinant TP1. Starting with soluble extracts from condensing spermatids, this approach purified, on the one hand, all the acidic proteins binding to TP1 through charge interaction (including chaperones for basic proteins) and, on the other hand, specific TP1 interactants (Govin et al., 2012). This work had identified a group of four chaperones with the highest propensity to act on the elongating spermatid genome, which are Nap1L4, nucleoplasmin 3 (Nmp3), HspA2, and Nasp (Govin et al., 2012). Based on these previous data and in direct connection with the present work, we prepared soluble extracts from total

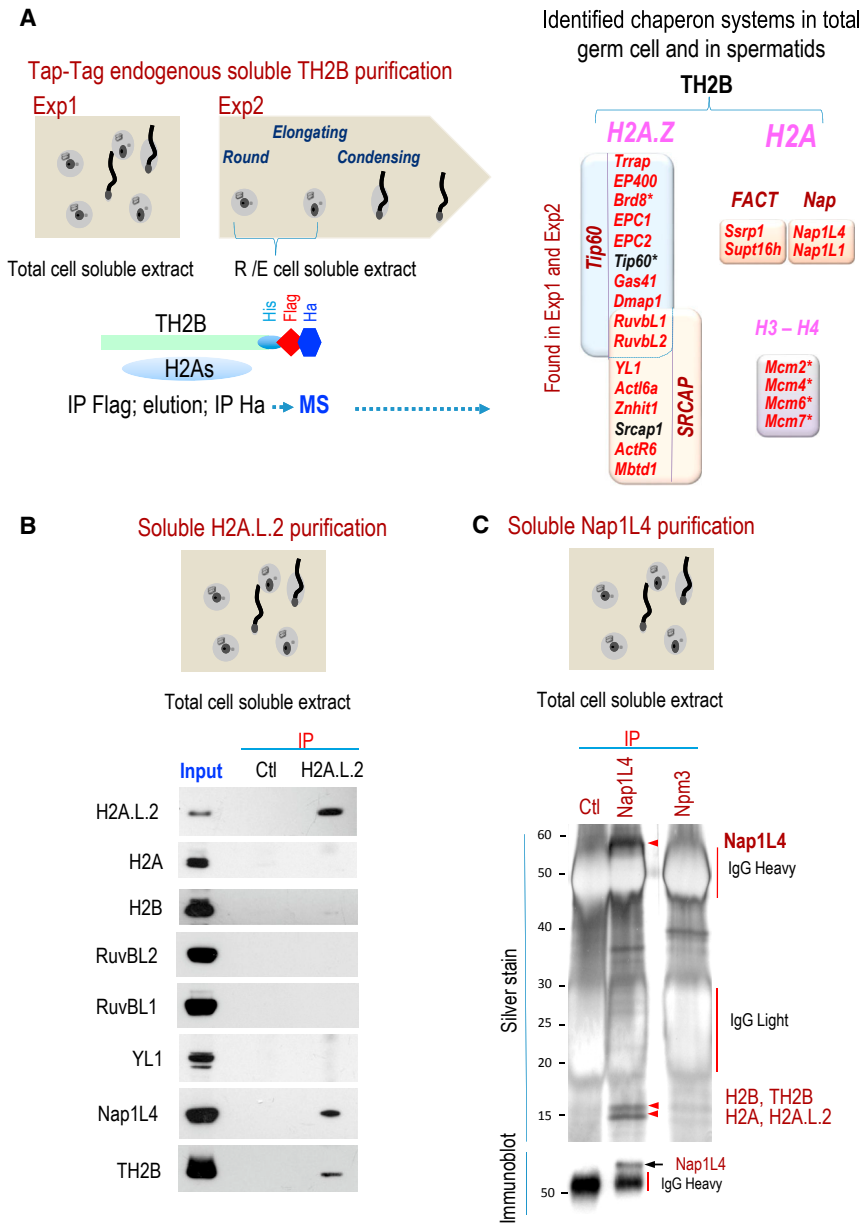


Figure 6. Identification of the Chaperone Systems Involved in the Assembly of H2A.L.2

(A) Testes from WT mice and mice expressing a C-terminally tagged endogenous TH2B were used to prepare total spermatogenic cell soluble extracts or to isolate round/elongating enriched cell fractions and prepare the corresponding soluble extracts. TH2B-tag was then immunoprecipitated following the tandem purification protocol, first with anti-Flag antibody and then with an anti-HA antibody after elution of the first immunoprecipitated materials. Mass spectrometry was then used to identify all the associated proteins. Table S1 presents the list of the chromatin-related identified proteins. Known H2A.Z as well as H2A-H2B chaperones were identified only in the TH2B-tag immunoprecipitates as indicated. Experiment 1 (exp1) was performed on total spermatogenic cells, whereas experiment 2 (exp2) was performed on fractionated round and elongating spermatids. Asterisks (*) indicate the proteins identified only in exp2.

(B) Total spermatogenic cell soluble extracts were prepared and H2A.L.2 immunoprecipitated. Control antibody corresponded to non-specific rabbit Ig. The immunoprecipitated materials were then probed with the indicated antibodies.

(C) The same type of extracts as in (B) were used to immunoprecipitate Nap1L4 and Nucleoplasm 3 (Npm3). The immunoprecipitated materials were visualized on a silver-stained gel, and the indicated doublet bands in the Nap1L4 immunoprecipitation were identified by MS. Figure S7 shows that both Nap1L4 and Npm3 are predominantly expressed in testis and data on the identification of histones co-immunoprecipitated with Nap1L4.

TH2B-H2A.L.2, through the action of Nap1L4, and the presence of Prms and TPs are enough to initiate the process of nucleosome transformation.

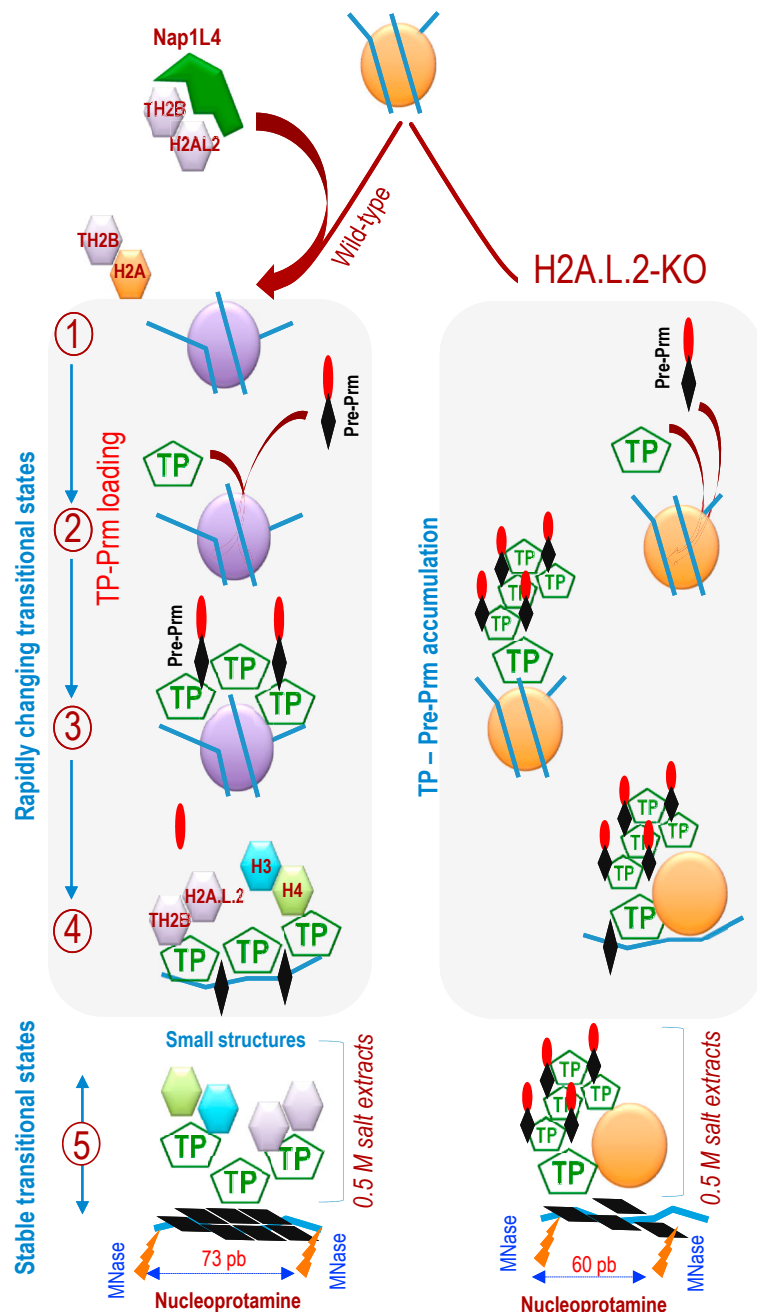
DISCUSSION

Since 2004, the date of the publication of the phenotype of TP1/2 double-KO mice by Meistrich laboratory (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a, 2004b), no noticeable progress in the understanding of the functional interplay between histones, TPs, and Prms had been made. The identification of H2A.L.2 (Govin et al., 2007) and the subsequent functional investigations reported here are now shedding light on the molecular events driving the transformation of nucleosomes into nucleoprotamines and also provide an insight into the function of TPs.

Histone variants known to open the nucleosome have the potential to create an interaction interface required for the assembly of specific structural non-histone proteins on chromatin. The best-known example is the centromeric H3 variant CENP-A, which organizes only 121 bp of DNA when present in a nucleosome (Tachiwana et al., 2011). The resulting open

germ cells and used our anti-Nap1L4 and anti-Npm3 antibodies, both preferentially expressed in testis (Figure S7A), to detect their chaperoned proteins. Interestingly, and in agreement with the data presented above, only anti-Nap1L4 immunoprecipitated a doublet that corresponded to TH2B, H2A.L.2, and H2B-H2A species (Figure 6C; Figure S7). No histone of the H2A or H2B types was found associated with Npm3.

Altogether, these data show that, in contrast to the specific histone variant H2A.Z, whose assembly requires energy consuming factors to remodel chromatin, H2A.L.2 uses a chaperone system, which normally controls H2A-H2B dynamics to trigger all the subsequent chromatin reorganizations. This finding, along with the biochemical characterization of H2A.L.2 (Figure 4), suggests that the simple exchange of TH2B-H2A by



nucleosomes with flexible DNA ends are thought to facilitate the loading of the non-histone kinetochore proteins (Roulland et al., 2016).

The H2A variant H2A.L.2, expressed at the time of histone replacement, creates nucleosomes, which, like CENP-A nucleosomes, present an open structure with flexible DNA ends that are prone to be loaded with non-histone proteins. These non-histone proteins here are TPs, which are co-synthesized with H2A.L.2 and are loaded onto H2A.L.2-containing nucleosomes. Indeed, we show here that H2A.L.2's primary function is to allow TP loading onto chromatin. However, TP loading does not directly

Figure 7. Molecular Model for the Functional Interplay between Histones, TPs, and Prms during the Transformation of Nucleosomes into Nucleoprotamines

In WT condensing spermatids, TPs and H2A.L.2 are co-expressed (Figure 1) and the H2A.L.2-TH2B dimer is loaded onto the nucleosomes by Nap1L4 (Figure 6). The incorporation of H2A.L.2-TH2B into chromatin opens the nucleosomes, releasing the nucleosomal DNA ends and allowing the invasion of nucleosomes by TPs, as suggested by the observation that H2A.L.2 is required for the incorporation of TPs into nucleosomes (Figures 3A, 4, and 5A; Figure S5B). Nucleosome-TPs interact with incoming Prms (Figure 3B; Figure S4) and mediate pre-Prm2 processing (Figures 2D and 3B) (stages 1–3). Prms bind DNA in competition with histone-TP complexes (stage 4). The displaced histones are unable to remain as octamers (supported by the fact that DNA is necessary for the constitution of H2A.L.2-containing octamers; see Figure 4D) (stage 4). Prm-DNA and displaced TP-histone complexes constitute a relatively stable transitional state (stage 5), corresponding to the small subnucleosomal structures, which can be visualized on a sucrose gradient (Figure 5A; Figure S5B) and sequenced (Figures 5B and 5C).

In the absence of H2A.L.2, H2A-containing nucleosomes impair the invasion of TPs (Figures 3, 4, and 5A; Figures S3B and S5B), leading to the accumulation of non-incorporated TPs around chromatin (Figure 3; Figure S3B), which in turn trap incoming Prms (Figure 3B; Figure S4), preventing their assembly and the processing of Prm2 (Figures 2D and 3B). The accumulation of “TP-misassembled Prms” would lead to Prm under-dosage and the generation of modified transitional states (Figure 5B). The fraction of Prms that achieves DNA assembling would be enough to release the “histone-TP” complexes (Figure 3B) but would not be sufficient to sustain a complete genome compaction (Figure 2D).

lead to histone replacement but rather generates an interface for Prms' recruitment and processing. Therefore, we can propose that TPs' function is essentially to buffer and orient the action of Prms in displacing histones. Our data, along with Meistrich laboratory's work, support the idea that Prms are the true mediators of histone displacement and the inducers of the transitional states formation revealed by MNase digestion. Indeed, the detailed analysis of these transitional states shows that the absence of H2A.L.2 and TPs mislocalization do not prevent their generation but rather impact their Prm-dependent organization. This interpretation is experimentally supported by the protection of shorter DNA frag-

ments against MNase digestion, as well as defective genome compaction in mature sperm cells, which could result from a sub-optimal concentration of assembled Prms. Interestingly, a similar scenario seems to occur in the total absence of TPs, where Prm processing and assembly could also be suboptimal (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004a).

In conclusion, this work not only describes, at a molecular level, the functional interconnection between histones, TPs, and Prms during histone-to-protamine replacement (Figure 7), but also highlights the function of TPs and invites biologists to update the classical description of histone/TP/Prm transitions

by the addition of a critical step corresponding to the incorporation of H2A.L.2.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING**
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
 - Generation of H2A.L.2-KO Mice
- **METHOD DETAILS**
 - Spermatogenic Cell Fraction Purification
 - In Vitro Fertilization
 - Protein Profiling by Mass Spectrometry
 - Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses
 - Spermatogenic Cell Chromatin Preparation and Separation of Nucleosomal and Sub-nucleosomal Particles on a Sucrose Gradient
 - Microscopy and In Situ Immunodetection
 - Immunoprecipitations
 - Purification of Recombinant Histones, TPs, and In Vitro Assays
 - Preparation of Histone Complexes
 - Preparation of DNA Fragments for Nucleosome Reconstitution
 - Reconstitution of Nucleosomes
 - Gel Filtration Analysis
 - MNase Treatment Assay
 - TP Binding Assay
 - TP-Nucleosome Interaction by Pull-Down Assay
 - Antibodies' Dilutions
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
 - Bioinformatics
- **DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY**
- **ADDITIONAL RESOURCES**
 - Non-commercial Antibodies

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.025>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.B. performed in situ and biochemical analyses, prepared nucleosomal and subnucleosomal fragments for sequencing, and carried out chromatid fractionation on sucrose gradient and subsequent analyses, as well as IH, IF, and spermatogenic cell fractionations. Y.M., H.T., and T.U. conducted all the in vitro reconstitutions and subsequent functional studies under the supervision of H.K. E.M. performed the phenotypical characterizations of H2A.L.2-KO mice, including in vitro and in vivo fertilization tests with help of T.B., electron microscopy and testis histology analysis, and TP and Prm detection by IH. T.B. helped with spermatogenic cell fractionation and H2A.L.2-KO mice maintenance, genotyping, and phenotypical characterizations. J.G. generated anti-Nap1L4 and anti-NPM3 antibodies and performed Nap1L4 purification. M.d.D. generated H2A.L.2-KO mice with the help of P.H. and F.B. in M.G.'s laboratory under his supervision. Y.C. performed the MS protein analyses. F.F. performed UHPLC-MS analyses of histone extracts. S.C. performed transfec-

tion IP analyses of TP-Prm interactions. Y.M. performed TAP-tag purification of soluble TH2B, with the help of H.S. G.C., D.P., and S.R. performed all the bioinformatics analyses. N.F.-N. prepared the sequencing libraries and run the sequencing. S.R. helped with the manuscript and figure preparation. S.K. designed and coordinated the whole project and wrote the manuscript. All the authors read and commented the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

S.K.'s laboratory is supported by a grant from "Foundation pour la Recherche Medicale (FRM)" "analyse bio-informatique pour la recherche en biologie" program (DBI20141231321), as well as by ANR Episperm3 program (ANR-15-CE12-0005-01), and by INCa libre program (RPT13001CCA). Additional supports were from: Fondation ARC "Canc'air" project (RAC16042CLA), Plan Cancer (CH7-INS15B66) and Plan Cancer (ASC16012CSA), and the "Université Grenoble Alpes" ANR-15-IDEX-02. H.S. was a recipient of a Marie Curie Initial Training Network funded by European Commission (FP7-PEOPLE-2011-ITN, PITN-GA-289880) for 3 years and then supported by "La Ligue Nationale Contre Le Cancer" for a fourth year of PhD. Y.M. is supported by a post-doctoral fellowship from Plan Cancer (CH7-INS15B66). G.C. is a bioinformatics expert benefiting from a FRM fellowship. Mice were bred in the High Technology Animal Facility (PHTA) of Grenoble University with the precious help of Cyrielle Colomb and Andrea Piras. We also gratefully acknowledge the help of Karin Pernet in the preparation of samples and their analysis by electron microscopy. High-throughput sequencing was performed at the TGML Platform, supported by grants from Inserm, GIS IBiSA, Aix-Marseille Université, and ANR-10-INBS-0009-10. The proteomic analyses were partially supported by the French National Research Agency ProFi Grant ANR-10-INBS-08-01. This work was supported in part by JSPS KAKENHI Grant Numbers JP25116002 and JP25250023 to H.K. H.K. was supported by the Waseda Research Institute for Science and Engineering, and was also supported by the programs of Waseda University.

Received: September 26, 2016

Revised: January 3, 2017

Accepted: February 24, 2017

Published: March 30, 2017

REFERENCES

- Arimura, Y., Kimura, H., Oda, T., Sato, K., Osakabe, A., Tachiwana, H., Sato, Y., Kinugasa, Y., Ikura, T., Sugiyama, M., et al. (2013). Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci. Rep.* 3, 3510.
- Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J., and Luger, K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.* 23, 3314–3324.
- Buchou, T., Tan, M., Barral, S., Vitte, A.L., Rousseaux, S., Arechaga, J., and Khochbin, S. (2017). Purification and analysis of male germ cells from adult mouse testis. *Methods Mol. Biol.* 1510, 159–168.
- 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.
- Chua, E.Y., Vasudevan, D., Davey, G.E., Wu, B., and Davey, C.A. (2012). The mechanics behind DNA sequence-dependent properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 40, 6338–6352.
- Contrepois, K., Ezan, E., Mann, C., and Fenaille, F. (2010). Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications. *J. Proteome Res.* 9, 5501–5509.
- De Vries, M., Ramos, L., Housein, Z., and De Boer, P. (2012). Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol. Open* 1, 446–457.

- Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., et al. (2006). Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *EMBO J.* *25*, 4234–4244.
- Dyer, P.N., Edayathumangalam, R.S., White, C.L., Bao, Y., Chakravarthy, S., Muthurajan, U.M., and Luger, K. (2004). Reconstitution of nucleosome core particles from recombinant histones and DNA. *Methods Enzymol.* *375*, 23–44.
- Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J.* *277*, 599–604.
- Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2014). Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J. Mol. Biol.* *426*, 3342–3349.
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., and Caron, C. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* *176*, 283–294.
- Govin, J., Gaucher, J., Ferro, M., Debernardi, A., Garin, J., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2012). Proteomic strategy for the identification of critical actors in reorganization of the post-meiotic male genome. *Mol. Hum. Reprod.* *18*, 1–13.
- Groth, A., Corpet, A., Cook, A.J., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., and Almouzni, G. (2007). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science* *318*, 1928–1931.
- Ichikawa, Y., Kagawa, W., Saito, K., Chikashige, Y., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Kurumizaka, H. (2013). Purification and characterization of the fission yeast telomere clustering factors, Bqt1 and Bqt2. *Protein Expr. Purif.* *88*, 207–213.
- Latrick, C.M., Marek, M., Ouararhni, K., Papin, C., Stoll, I., Ignatyeva, M., Obri, A., Ennifar, E., Dimitrov, S., Romier, C., and Hamiche, A. (2016). Molecular basis and specificity of H2A.Z-H2B recognition and deposition by the histone chaperone YL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 309–316.
- Lewis, J.D., Song, Y., de Jong, M.E., Bagha, S.M., and Ausió, J. (2003). A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* *111*, 473–482.
- Lowary, P.T., and Widom, J. (1998). New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* *276*, 19–42.
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* *111*, 483–488.
- 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.
- Nekrasov, M., Amrichova, J., Parker, B.J., Soboleva, T.A., Jack, C., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2012). Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1076–1083.
- Obri, A., Ouararhni, K., Papin, C., Diebold, M.L., Padmanabhan, K., Marek, M., Stoll, I., Roy, L., Reilly, P.T., Mak, T.W., et al. (2014). ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* *505*, 648–653.
- 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.
- Rousseaux, S., Boussouar, F., Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Curtet, S., Vitte, A.L., and Khochbin, S. (2011). Molecular models for post-meiotic male genome reprogramming. *Syst Biol Reprod Med* *57*, 50–53.
- Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L.M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., et al. (2014). Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *14*, 217–227.
- 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.
- Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2011). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 25–30.
- Syed, S.H., Boulard, M., Shukla, M.S., Gautier, T., Travers, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2009). The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* *37*, 4684–4695.
- Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 10454–10459.
- 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.
- Tanaka, Y., Tawaramoto-Sasanuma, M., Kawaguchi, S., Ohta, T., Yoda, K., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2004). Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* *33*, 3–11.
- Tropberger, P., and Schneider, R. (2013). Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 657–661.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004a). Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* *38*, 200–213.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S., and Meistrich, M.L. (2004b). Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol. Reprod.* *71*, 1016–1025.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit polyclonal anti-TH2B	Abcam	Cat#ab61245; RRID: AB_941948
Mouse monoclonal anti-Protamine P1	Briar Patch Biosciences	Cat#HUP1N
Mouse monoclonal anti-Protamine P2	Briar Patch Biosciences	Cat#HUP2B
Rabbit polyclonal anti-TP1	gift by S. Kistler	N/A
Goat polyclonal anti-TP2 (K18)	Santa Cruz	Cat#SC-21106; RRID: AB_2206859
Rabbit polyclonal anti-H2A	Millipore	Cat#07-146; RRID: AB_310394
Rabbit polyclonal anti-H2B	Millipore	Cat#07-371; RRID: AB_310561
Rabbit polyclonal anti-H3 ChIP grade	Abcam	Cat#ab1791; RRID: AB_302613
Rabbit polyclonal anti-VPS72 (YL1)	Proteintech	Cat#15143-1-AP; RRID: AB_2215534
Rabbit polyclonal anti-KAT5 (TIP 60)	Proteintech	Cat#10827-1-AP; RRID: AB_2128431
Rabbit polyclonal anti-RUVBL1	BETHYL	Cat#A304-716A; RRID: AB_2620911
Rabbit polyclonal anti-RUVBL2	BETHYL	Cat#A302-536A; RRID: AB_1999034
Mouse monoclonal anti-GFP	COVANCE	Cat#MMS-118R
Rabbit polyclonal anti-Nap1L4	This paper	N/A
Rabbit polyclonal anti-H2A.L.2	Govin et al., 2007	N/A
Rabbit polyclonal anti-Npm3	This paper	N/A
Pre-immune goat serum	This paper	N/A
Lectin PNA Alexa Fluor 647 conjugate	Life Technologies	Cat#L32460
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega	V5111
Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific	BP172
Iodoacetamide	Sigma-Aldrich	I1149
Ammonium bicarbonate	Sigma-Aldrich	A6141
Acetonitrile	Sigma-Aldrich	34851-M
Formic acid	EMD Millipore Chemical	1.11670.0250
Nuclease S7	Sigma-Aldrich	Cat#10107921001
Dynabeads Protein G	Life Technologies	Cat# 10004D
Complete Protease inhibitor EDTA-free	Sigma-Aldrich	Cat# 4693159001
Deposited Data		
Raw mass spectrometry proteomics data: accession PRIDE: PXD005863	ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository	http://www.proteomexchange.org/
MNase-Seq accession ID GEO: GSE93251	This paper	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE93251
Mendeley Data	This paper	https://data.mendeley.com/datasets/n6g254frpt/draft?a=ca92ef9b-c327-4c9e-8542-ad5dbaa74244
Experimental Models: Cell Lines		
COS-7 kidney Fibroblast	ATCC	ATCC-CRL-1651
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: B6.129/SvPas-h2a.l.2 neo/neo	This paper	N/A
Mouse: B6.129/SvPas-th2bDeltaNeo	Montellier et al., 2013	N/A
Oligonucleotides		
Primer: 5' biotinylated 601–193 bp Forward: ATCGGACCCTATCGCG AGCCAGGCCTGAGA	This paper	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Primer: 601–193 bp Reverse: ATCTAT GAATTCGCGACACAAGGCCTGGA	This paper	N/A
Recombinant DNA		
Hs Histone H2A	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
Mm Histone H2B	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
Hs Histone H3.1	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
Hs Histone H4	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
Mm Histone H2A.L.2	This paper	N/A
Mm Histone TH2B	This paper	N/A
Mm TP1	This paper	N/A
Mm TP2	This paper	N/A
pGEM-601L(A)-145bp DNA	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
pGEM-601L(T)-145bp DNA	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
pGEM-601-193bpDNA	Hitoshi Kurumizaka Lab	N/A
pEGFP-C3	Clontech	Cat#6082-1
pEGFP-C3-Prm2(1–132)	This paper	N/A
pEGFP-C3-Prm2(133–324)	This paper	N/A
pEGFP-C3-PrePrm2	This paper	N/A
PcDNA3.1/His C	Thermo fisher	Cat#V3852
PcDNA3.1/His C-Flag-TP2	This paper	N/A
Software and Algorithms		
Bowtie2 v.2.2.9	N/A	http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml
Samtools v.1.3.1	N/A	http://samtools.sourceforge.net/
DeepTools v.2.2.4	N/A	https://github.com/fidellram/deepTools
CEAS v.1.0.2	N/A	http://liulab.dfci.harvard.edu/CEAS/
DANPOS v.2.2.2	N/A	https://sites.google.com/site/danposdoc/
R v.3.3.1	R Development Core Team, 2008	https://cran.r-project.org/
Snakemake v.3.9.0	N/A	https://snakemake.readthedocs.io/en/latest/
Fastx-toolkit v.0.0.13	N/A	http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html
Xcalibur 2.1	Thermo Scientific	OPTON-20487
Mascot Distiller	Matrix Science	v.2.5.1
Mascot Server	Matrix Science	v.2.5.1
Proline	Open source	http://proline.profiroteomics.fr/
Other		
Liquid chromatography, Dionex Ultimate 3000	Thermo Scientific	WPS-3000T, LPG-3400M, DGP-3600M, FLM-3100 NANO
Pre-column PepMap C18	Thermo Scientific	160454
Colum PepMap C18	Thermo Scientific	164569
Mass spectrometer	Thermo Scientific	LTQ-Orbitrap Velos Pro

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr.

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**Generation of H2A.L.2-KO Mice**

The *h2a.l.2^{Neo}* allele was constructed as follows. A 10-kb DNA fragment (5-kb upstream and 5-kb downstream of the stop codon of the *h2a.l.2* gene) was retrieved from a BAC into a PL253 retrieving plasmid after induction of recombination in SW102

electro-competent cells. A TAP tag (6His-Flag-Ha) was inserted in frame with the last exon to produce a H2A.L.2-tag fusion protein. In addition, a neomycin cassette placed at the 3' end of the targeting construct and flanked by two LoxP sites allowed for positive selection. A *Bam*HI restriction site was inserted in the construct to facilitate the identification of the mutant alleles. For gene targeting, 20 μ g of *Not*I-linearized *h2a.l.2^{Neo}* targeting vector (PL253) DNA was electroporated (250 V with a capacitance of 500 mF) into 20×10^6 AT1 embryonic stem cells (ESC) grown on mitomycin-C-inactivated mouse embryonic fibroblasts. Colonies were positively selected in ESC medium containing 15% Foetal Bovine Serum and LIF in DMEM with G418. Several hundreds of neomycin-resistant clones were picked and analyzed by Southern blotting using *Bam*HI digests with a 5' external probe to check for homologous targeting. The ES cells were then used to generate the corresponding mouse model (Montellier et al., 2013).

METHOD DETAILS

Spermatogenic Cell Fraction Purification

A detailed and step-by-step protocol for the purification of spermatogenic cell fractions enriched in different cell types is now published (Buchou et al., 2016). Briefly, male mice were euthanized and testes were recovered. After the removal of albuginae, seminiferous tubules were incubated in a 1 mg/ml collagenase solution for 15 min at 35°C. After centrifugation, collagenase-treated cells were suspended in 0.5% BSA-DMEM/F12 medium. The aggregates were dissociated by rapid pipetting for 10 min and filtered through a 100 μ m filter. The total germ cell suspension was loaded on the top of a 2%–4% BSA gradient. The cells were let to sediment for 70 min. Cell fractions were collected and processed for examination with a phase contrast microscope. Fractions with the same cell type (respectively Spermatocytes, Round Spermatids, Elongating and Condensing Spermatids) were pooled for further analyses.

In Vitro Fertilization

Spermatozoa obtained by manual trituration of caudae epididymides from adult male mice were allowed to swim for 10 min in M2 medium. Spermatozoa were capacitated for 30 min in 2% fatty acid-free BSA-M16 medium at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Oocytes were collected from mature females synchronized with 7.5 units of pregnant mare serum gonadotrophin and 7.5 units of human chorionic gonadotrophin before collection. Oocytes were incubated with 2×10^5 spermatozoa per ml for 4 hr in M16 medium (37°C, 5% CO₂). Unbound spermatozoa were then washed away. Twenty-six hours after fertilization, the different stages were scored (unfertilized oocytes, and 2-cell embryos as an indication of successful fertilization).

Protein Profiling by Mass Spectrometry

Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS) was used to profile histones after mild performic oxidation (Contrepois et al., 2010). Briefly, histones were oxidized by incubating 15 μ L of protein solution (~ 1.0 μ g/ μ L) with 5 μ L of a mixture of 12% (v/v) formic acid and 12% H₂O₂ (v/v) for 4 hr at 20°C (final concentration: 3% formic acid + 3% H₂O₂). Oxidized histones were then separated on a C18 Hypersil GOLD column (2.1 mm x 150 mm, 175 Å, 1.9 μ m; Thermo Scientific, San Jose, CA) at a flow rate of 300 μ L/min using a linear gradient of 0 to 80% solvent B in 13.5 min (with solvent A: H₂O containing 0.1% formic acid and solvent B: acetonitrile containing 0.1% formic acid). MS acquisition was performed on a LTQ-Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Scientific) operating in the positive ion mode (acquisition from m/z 500 to 2000) using a resolving power set at 30,000 (at m/z 400).

Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses

Preparation and In-Gel Digestion of Proteins

The proteins from immunoprecipitation eluates were stacked on the top of a 4%–12% NuPAGE gel (Invitrogen) and stained with R-250 Coomassie blue. Gel bands were manually excised and cut into pieces before being washed six times with 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min, followed by six washes in 25 mM NH₄HCO₃ containing 50% (v/v) acetonitrile. Gel pieces were then dehydrated with 100% acetonitrile and incubated with 10 mM DTT in 25 mM NH₄HCO₃ for 45 min at 53°C and with 55 mM iodoacetamide in 25 mM NH₄HCO₃ for 35 min in the dark. Alkylation was stopped by the addition of 10 mM DTT in 25 mM NH₄HCO₃ (incubation for 10 min). Gel pieces were then washed again by incubation in 25 mM NH₄HCO₃ followed by dehydration with 100% acetonitrile. Modified trypsin (Promega, sequencing grade) diluted in 25 mM NH₄HCO₃ was added to the dehydrated gel pieces before overnight incubation at 37°C. Peptides were extracted from the gel pieces in three sequential steps (each 15 min) respectively using 30 μ l of 50% acetonitrile, 30 μ l of 5% formic acid, and finally 30 μ l of 100% acetonitrile. The pooled supernatants were dried under vacuum.

Nano-LC-MS/MS Analyses

The dried extracted peptides were suspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analyzed by online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific). For this, peptides were sampled on a 300 μ m x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 μ m x 250 mm PepMap C18 column (Thermo Scientific). The nanoLC method consisted of a 120 min gradient at a flow rate of 300 nL/min, ranging from 5% to 37% acetonitrile in 0.1% formic acid for 114 min, followed by 72% acetonitrile in 0.1% formic acid for the last 6 min. Spray voltage was set at 1.4 kV and heated capillary was adjusted to 270°C. Survey full-scan MS spectra (m/z = 400–1600) were acquired in the Orbitrap with a resolution of 60,000 after accumulation of 10^6 ions (maximum filling time 500 ms). The twenty most intense ions from the preview survey scan delivered by the Orbitrap were fragmented

by collision-induced dissociation (collision energy 35%) in the LTQ after accumulation of 104 ions (maximum filling time 100 ms). MS and MS/MS data were acquired using the software Xcalibur (Thermo Scientific).

Data Analyses

RAW files were processed using Mascot Distiller (Matrix Science), version 2.5.1. Peptides and proteins were identified through concomitant searches against Uniprot (*Mus musculus* taxonomy, June 2016 version) and classical contaminants database (249 sequences, homemade), and the corresponding reversed databases using Mascot (Matrix Science, version 2.5.1). ESI-TRAP was chosen as the instrument, trypsin/P as the enzyme and two missed cleavages were allowed. Precursor and fragment mass error tolerances were set at 10 ppm and 0.6 Da respectively. The following peptide modifications were allowed during the search: carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter, variable) and oxidation (M, variable). The Proline software (<http://proline.profipteomics.fr>) was used to filter the results (conservation of rank 1 peptides, peptide identification FDR < 1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, minimum peptide score of 25, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group) before performing a compilation, grouping and comparison of the protein groups from the different samples. Proteins from the contaminants database and additional keratins were discarded from the final list of identified proteins. Proteins were considered as potential partners of the baits if they were identified only in the positive co-IPs with a minimum of 3 specific spectral counts or enriched at least 5 times in positive co-IPs compared to control ones on the basis of specific spectral counts.

Spermatogenic Cell Chromatin Preparation and Separation of Nucleosomal and Sub-nucleosomal Particles on a Sucrose Gradient

Steps 12–16 Condensing Spermatids Preparation

After removal of albuginea, 2 testes were mechanically disrupted using a “motor-driven potter-homogenizer” (3000 rpm/10 strokes) in 5 mL HM1 buffer (1.5 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 0.32 M sucrose, protease inhibitor Complete EDTA free). The volume was completed to 10 mL with HM2 buffer (1.5 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 0.32 M sucrose, protease inhibitor Complete EDTA free, 0.1% Triton). After centrifugation (500 g, 10 min, 4°C), the pellet was dissolved in 3 mL HM2 buffer. The suspension was sonicated (250J) and centrifugated (500 g, 10 min, 4°C) twice. The pellet was washed first with 10 mL of HM2 buffer and then with 10 mL of HM3 buffer (1.5 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 0.88 M sucrose, protease inhibitor Complete EDTA free, 0.1% Triton) and finally with 1 mL of HM1 buffer.

MNase Digestion of Chromatin from Step 12–16 Condensing Spermatids

Spermatids (obtained as above, using six testes) were lysed (15 min, in ice) in 112.5 μL buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% DOC, 1 mM DTT, and protease inhibitor Complete EDTA Free). After centrifugation (20,000 g, 4°C, 10 min), the cells were resuspended in 112.5 μL of the initial buffer and then submitted to sonication (80 J). Intact nuclei were pelleted by additional centrifugation (20,000 g, 4°C, 10 min) and discarded. The supernatants from these two centrifugations were pooled and used for MNase digestion. 112.5 μL of MNase buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 10 mM KCl, and 1 mM CaCl₂) and 11.5 U of micrococcal nuclease S7 were added to the pooled supernatant, which was then incubated for 2 min at 37°C. The digestion was stopped by adding 5 mM EDTA (final concentration).

Chromatin fractions were separated on a 10%–30% linear sucrose gradient (in 1 mM phosphate buffer, pH 7.4, 80 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, and antiprotease cocktail) by ultracentrifugation (28,000 g, 4°C, 16 h). DNA analyses were performed on 10 μL of the MNase digested fractions by a proteinase K treatment followed by electrophoresis on a 2% agarose gel. The proteins of the collected fractions were analyzed by immunoblots.

Microscopy and In Situ Immunodetection

Immunofluorescence on Germ Cells

Cut frozen testes (in liquid nitrogen) were gently pressed onto glass slides and air-dried. The slides were then incubated in 90% ethanol for 15 min, and air-dried again. In order to permeabilize the cells, the slides were placed in 0.5% saponine, 0.2% Triton X-100, and 1 × PBS at room temperature for 15 min. The preparations were then incubated in 5% dried milk, 0.2% Tween 20, and 1 × PBS at room temperature for 30 min. The primary antibodies were diluted in 1% dried milk, 0.2% Tween 20, and 1 × PBS (see STAR Methods Reference Sheet for dilutions). The slides were incubated overnight in the primary antibody(ies) in a humidified chamber at 4°C and then washed three times for 5 min in the antibodies dilution buffer. The secondary antibodies were diluted at 1:500 in the same buffer and incubated in a humidified chamber for 30 min at 37°C, and then washed as for the primary antibodies. The DNA was counterstained by DAPI, and the slides were mounted in Dako fluorescent mounting medium.

Immunohistochemistry

The testes were formalin-fixed overnight, dehydrated and paraffin-embedded. Six to ten μm serial paraffin sections of fixed mouse testes were deparaffinised in toluene, incubated for 30 min in 0.3% H₂O₂ and hydrated through graded series of ethanol 100%, 90%, 70% (2 min each). The sections were then incubated 20 min in sodium citrate 10 mM pH 6 at 99.5°C. The slides were then either counterstained with eosin hematoxylin or subjected to immunohistochemistry activity. The non-specific binding of the antibodies was blocked with 5% dried milk, 1 × PBS for 30 min at room temperature. The sections were incubated overnight in a humidified chamber with the appropriate primary antibody diluted in 0.5% dried milk, 1 × PBS (dilutions are indicated below). After washes

in 0.5% dried milk, 1 × PBS during 5 min at RT, a secondary biotinylated antibody was applied for 30 min at RT in a humidified chamber. The sections were then incubated for another 30 min in extravidin conjugated to peroxidase and then washed in 0.5% dried milk, 1 × PBS.

The final detection step was performed by incubating the slides in DAB (3,3'-diaminobenzidine) at RT. The slides were then washed in water and the acrosomes were stained in red by incubation during 5 min in periodic acid and 15 min in Schiff reagent at RT. The sections were subsequently dehydrated in ethanol 100% and mounted with coverslips using Eukitt. The sections were then observed with a transmission light microscope (Axioskop MC80, Zeiss).

Electron Microscopy

A solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4 was used to fix spermatids (24 hr) at RT. After an extensive wash, the spermatids were embedded in 10% gelatin diluted in 0.1 M cacodylate at 37°C and let for solidification on ice. The corresponding embedded block was cut into small pieces which were fixed again during 1 hr at 4°C with 1% Osmium tetroxyde and 0.1 M cacodylate pH 7.2. The cells were further stained with 1% uranile acetate pH 4 in water during 1 hr at 4°C, followed by an extensive wash in water. Cells were then dehydrated by incubation in a series of baths with increasing ethanol concentrations (30%–60%–90%–100%–100%–100%). The blocks were impregnated in a mix of 1/1 epon/alcohol 100% during 1 hr followed by several baths of epon (Flukka, freshly prepared) during three hours. Finally, the preparations were embedded again in a resin that polymerized during 72h at 60°C in a capsule. An ultramicrotome (Leica) was used to obtain ultrathin sections. The samples were then stained with 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate. An electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX) was used to observe the samples with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus). The ITEM software (Olympus) was used to perform the Morphometric analysis.

Immunoprecipitations

TP2-Immunoprecipitation

Purified step 12-16 condensing spermatids obtained from two WT and two H2A.L2-KO mice testes were lysed (10 min, on ice) in 1000 µL LSDB500 buffer (HEPES 50 mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, KCl 500 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche). After centrifugation (20000 g, 4°C, 10 min), the supernatant was diluted with 1000 µL LSDB0 (HEPES 50 mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche) and used for immunoprecipitation with anti-TP2 polyclonal antibody (Santa Cruz) or an irrelevant antibody (pre-immune goat serum) overnight at 4°C. 25 µL of dynabeads protein G (Invitrogen) were added to the mix and incubated during 30min at 4°C. The beads were washed 3 times with 500 µL of LSDB250 buffer (HEPES 50mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, KCl 250 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche). The bound proteins were migrated on a 4%–12% Bis-Tris SDS-PAGE (NuPAGE Precast gel, Invitrogen), transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond C_β, GE). The immunoprecipitated proteins were analyzed by immunodetection.

Immunoprecipitation of Nap1L4 and Npm3

Soluble extracts from fresh mouse testis were obtained in HEPES 50 mM pH 7.9, Glycerol 20%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 1 mM, TSA 300 nM, NaF 5 mM, beta glycerophosphate 25 mM, EDTA-free Complete Anti protease cocktail (Roche). Four mg of extract at the concentration of 10 mg/mL were incubated overnight under rotation with 15 µg of purified antibody (NAP1L4 or Npm3) or an isotypic control antibody (anti rabbit IgG). Antibodies were captured with Protein G coupled to magnetic beads (Dynabeads, Life Technologies) following the manufacturer's instructions. The beads were washed three times in the same buffer and the proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer. They were then analyzed by SDS-PAGE and stained using the SilverQuest kit (Life Technologies). The bands of interest were excised and analyzed by mass spectrometry.

Tandem Affinity Purification of TH2B

Male germ cells and round spermatids enriched fraction from WT and *Th2b-tag* mice were prepared as described above. Male germ cells or fractionated round spermatids were suspended in IP buffer [20 mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 0.1% NP-40, 1 mM DTT, and 1 × Complete protease inhibitor (Roche)] and incubated at 4°C for 1 hr. The supernatants were recovered by centrifugation at 21000 g for 10 min, followed by filtration through a 0.45 µm membrane filter. The protein extracts were mixed with Anti-FLAG M2 agarose beads (Sigma-Aldrich) and incubated with rotation at 4°C for 4 hr. The beads were then washed five times with IP buffer, and the proteins bound to the beads were eluted twice by incubation with 0.3 mg/ml of 3 × FLAG peptide (Sigma-Aldrich) at 4°C for 30 min. The elution fractions were further incubated with Dynabeads cross-linked anti-HA antibody at 4°C overnight. The beads were washed three times with the IP buffer and the proteins were recovered in Laemmli sample buffer. Anti-HA antibody was cross-linked to Dynabeads protein G (Thermo Fisher Scientific) by incubation with BS3 cross-linker (Bis[sulfosuccinimidyl] suberate: Sigma-Aldrich) 5 mM in 250 µL conjugation buffer, containing 20 mM sodium phosphate (pH 7.4) and 0.15 M NaCl. After incubation at room temperature for 30 min, 12.5 µL of 1M Tris-HCl (pH7.5) were added to the reaction mixture and further incubated at room temperature for 15 min to quench the cross-linking reaction.

Purification of Recombinant Histones, TPs, and In Vitro Assays

Mouse histones H2A, H2A.L2, H2B, TH2B, H3.1 and H4 were produced as N-terminally His-tagged proteins in *Escherichia coli* cells, and purified (Tachiwana et al., 2010; Tanaka et al., 2004). The amino acid sequences of mouse H2A, H3.1 and H4 are identical to that of human H2A, H3.1 and H4, respectively. The cells expressing the histones were resuspended in buffer A [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5% glycerol and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] and sonicated on ice. After centrifugation at 27,700 g for 20 min, the His-tagged histones were recovered from the pellet with buffer A containing 7 M guanidine hydrochloride and mixed with

Ni-NTA agarose beads (QIAGEN) at 4°C during 1h. The beads were then washed with buffer B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 6 M urea, 5% glycerol and 5 mM imidazole] under denaturing condition in an Econo-column (Bio-Rad Laboratories). The proteins were eluted by a linear gradient of imidazole from 5 to 500 mM, and the pooled peak fractions were dialyzed against buffer C [5 mM Tris-HCl (pH7.5), 2 mM 2-mercaptoethanol]. After removal of the His-tag by thrombin protease treatment (Wako), the histones were further applied to a MonoS column (GE Healthcare Bioscience) under denaturing conditions. The column was washed with buffer D [20 mM sodium acetate (pH5.2), 0.2 M NaCl, 6 M urea, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1 mM EDTA], and the histones bound to the beads were then eluted by a linear gradient of NaCl from 0.2 to 0.8 M. The purified histones were dialyzed against water and lyophilized.

The DNA fragments encoding mouse TP1 were inserted into the pET21a-NHSP2 vector (Ichikawa et al., 2013). His-SUMO-tagged TP1 was produced in the *Escherichia coli* BL21(DE3) codon(+)RIL cells (Agilent Technologies). The cells were resuspended in buffer A containing 5 mM imidazole and disrupted by sonication. After centrifugation at 27,700 g for 20 min, the supernatant was gently mixed with Ni-NTA agarose beads at 4°C for 1h. The beads were then packed into an Econo-column, and washed with buffer E [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% glycerol and 5 mM imidazole], containing 1 M NaCl. The beads were further washed with buffer E containing 0.1 M NaCl, and the proteins were eluted by a linear gradient of imidazole from 5 to 500 mM. After collecting the peak fractions, the His-SUMO tag was removed by the addition of PreScission protease. TP1 was further purified by chromatography on a MonoS column. The column was washed with buffer F [10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA] containing 0.6 M NaCl, and TP1 was eluted by a linear gradient of NaCl from 0.6 to 1.5 M. The purified TP1 was dialyzed against buffer F containing 0.1 M NaCl and flash frozen.

The DNA fragments encoding mouse TP2 was ligated into the pET15b vector and His-tagged TP2 was expressed in the *Escherichia coli* BL21(DE3) codon(+)RIL cells. The cells were collected and sonicated in buffer G [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 5% glycerol and 1 mM PMSF]. After centrifugation at 27,700 g for 20 min, His-tagged TP2 was recovered from the pellet with buffer H [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 5% glycerol and 7 M guanidine hydrochloride], and mixed with Ni-NTA agarose beads by rotation at 4°C for 1h. The beads were packed into an Econo-column, and washed with buffer I under denaturing conditions [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole and 6 M urea]. The proteins were eluted by a linear gradient of imidazole from 5 to 500 mM and the pooled peak fractions were dialyzed against buffer J [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM 2-mercaptoethanol and 10 μ M ZnCl₂]. The His-tag was then cleaved by a treatment with thrombin protease, and TP2 was further purified by MonoS column chromatography. The column was washed with buffer J containing 0.6 M NaCl, and TP2 was eluted by a linear gradient of NaCl from 0.6 to 1.5 M. Purified TP2 was dialyzed against buffer K [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT and 10 μ M ZnCl₂] and flash frozen.

Preparation of Histone Complexes

The H2A-H2B, H2A.L.2-TH2B, H2A-TH2B, H2A.L.2-H2B and H3.1-H4 complexes were reconstituted (Arimura et al., 2013). Briefly, purified histones were gently mixed at a 1:1 molar ratio in the denaturing buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.5), 7 M guanidine-HCl and 20 mM 2-mercaptoethanol] by rotation at 4°C for 90 min. The samples were then dialyzed against the reconstitution buffer [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA and 5 mM 2-mercaptoethanol]. The resulting histone complexes were then purified by Superdex200 (GE Healthcare Biosciences) gel filtration chromatography performed in the reconstitution buffer.

Preparation of DNA Fragments for Nucleosome Reconstitution

The 145-base-pair 601L DNA fragment (Chua et al., 2012), a palindromic derivative of the left half of the Widom 601 sequence (Lowary and Widom, 1998), was prepared (Dyer et al., 2004). Sixteen copies of the 601L(A) and 601L(T) DNA fragments, containing one-half of 601L sequence with 3-base overhang at one 5' end [601L(A): 5'-ATT-3', 601L(T): 5'-AAT-3'], were inserted into pGEM-T Easy Vector (Promega). The pGEM-601L(A)-145bp and pGEM-601L(T)-145bp plasmids were amplified in *Escherichia coli* cells, and the 601L(A) and 601L(T) DNA fragments were excised by digestion with EcoRV. The ends of DNA fragments were then dephosphorylated by incubation with calf intestine alkaline phosphatase (CIAP). After dephosphorylation, 3-base overhang was produced by digestion with *Hinf* I. The 145-base-pair 601L DNA fragment was generated by ligation of the 601L(A) and 601L(T) DNA fragments with T4 DNA ligase.

The biotinylated 193-base-pair DNA containing the Widom 601 sequence was amplified by polymerase chain reaction, using the pGEM-601-193bp plasmid as a template and the primers listed in the Key Resource Table.

Reconstitution of Nucleosomes

H2A-H2B, H2A.L.2-TH2B, H2A-TH2B or H2A.L.2-H2B and H3.1-H4 were mixed with the 145-base-pair 601L or 193-base-pair DNA fragment at a 3.6:3.6:1 molar ratio, in a solution containing 2 M KCl. The concentration of KCl was gradually decreased to 0.25 M using a peristaltic pump. To eliminate the non-specific histone binding to DNA, the samples were incubated at 55°C for 2 hr. After the incubation, the nucleosomes were purified by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using a Prep Cell apparatus (Bio-Rad). In this step, the nucleosomes were eluted with elution buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM DTT].

Gel Filtration Analysis

Purified H2A or H2A.L.2, H2B or TH2B, H3 and H4 were mixed at a 1:1:1:1 stoichiometry in denaturing buffer [20 mM Tris-HCl (pH7.5), 7 M guanidine-HCl and 20 mM 2-mercaptoethanol], and gently rotated at 4°C for 90 min. The samples were then dialyzed against reconstitution buffer [10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA and 5 mM 2-mercaptoethanol] and analyzed by

Superdex200 (GE Healthcare Biosciences) gel filtration chromatography. The elution profiles of each sample were monitored by UV absorption at 280 nm, and the peak fractions were analyzed by 18% SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue staining.

MNase Treatment Assay

The H2A-H2B, H2A.L.2-TH2B, H2A-TH2B or H2A.L.2-H2B nucleosomes (0.4 mg DNA/ml) were incubated with 1.5 units of MNase (Takara) at 25°C, in 10 μ l of reaction buffer, containing 38 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM CaCl₂, 2.2 mM DTT, 10 mM NaCl, 2.5 ng/ μ l BSA and 10% glycerol. The reactions were stopped by the addition of 10 μ l of stop solution [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM EDTA, 0.25% SDS and 0.5 mg/ml Proteinase K] at the indicated times. After a 15 min incubation at 25°C, the DNA fragments were separated by 8% non-denaturing PAGE in 0.5 \times TBE buffer (45 mM Tris base, 45 mM boric acid and 1 mM EDTA), and the bands were visualized by ethidium bromide staining.

TP Binding Assay

The H2A-H2B or H2A.L.2-TH2B nucleosomes (0.4 mg DNA/ml) were mixed with TP1 in 10 μ l of reaction buffer, containing 18 mM Tris-HCl (pH 7.5), 130 mM NaCl, 1.5 mM DTT, 0.3 mM EDTA and 0.1 mg/ml BSA. After an incubation at 37°C for 10min, the samples were separated by 6% non-denaturing PAGE in 0.2 \times TBE buffer, and the bands were visualized by ethidium bromide staining. TP2 was also incubated with the H2A-H2B or H2A.L.2-TH2B nucleosomes in 10 μ l of reaction buffer, containing 18 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1.8 mM DTT, 13 μ M ZnCl₂ and 0.1 mg/ml BSA, and the samples were subjected to 6% native PAGE as described above. The final concentrations of TP1 and TP2 were 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, and 2 μ M.

TP-Nucleosome Interaction by Pull-Down Assay

H2A-H2B or H2A.L.2-TH2B nucleosomes with biotinylated DNA (1 μ g) were pre-incubated with Dynabeads M-280 Streptavidin (100 μ g; Invitrogen) in a total volume of 20 μ l nucleosome binding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 1 mM DTT] for 1 hr at room temperature. The beads were washed with nucleosome binding buffer to remove unbound nucleosomes from the beads. Nucleosome bound beads were incubated with 0.96 μ g of TP1 or 0.52 μ g of TP2 for 1 hr at room temperature in a total volume of 30 μ l protein binding buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 0.2% Tween-20, 10 μ g/ml BSA, 1 mM DTT]. The beads were washed with protein binding buffer three times, and the bound proteins were eluted by boiling the beads in SDS sample buffer. The 50% input and the TP1- or TP2- bound proteins were analyzed by 18% SDS-PAGE and visualized by Coomassie brilliant blue staining. The band intensities of the TP1 and TP2 were quantitated with LAS-4000 image analyzer (GE Healthcare), using the MultiGauge ver. 3.2 software (Fujifilm).

Antibodies' Dilutions

Anti TH2B: 1/5000; Protamine P1: 1/1000; Protamine P2: 1/4000; TP1: 1/2500; TP2: 1/2500; H2A: 1/1000; H2B: 1/2500; H3: 1/5000; VPS72 (YL1): 1/1000; KAT5 (TIP 60): 1/1000; RUVBL1: 1/2000; RUVBL2: 1/2000; GFP: 1/5000. Nap1L4: 1/2000, H2A.L.2: 1/2000; Npm3: 1/1000; Lectin PNA: 1/50.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Bioinformatics

Paired-end sequencing 2*75bp was performed using Illumina NextSeq 500. Base calling was performed using RTA version 2. Total read counts from five sequencing runs ranged from 207 to 753 million reads per sample. MNase-Seq fragments were aligned to the mm9 genome assembly using Bowtie version 2.2.9 with default arguments.

For fragment size distributions, reads were trimmed to 2*30bp using Fastx-toolkit version 0.0.13 trimmer function to ensure no sequencing artifact that may occur for fragments shorter than 75bp. Fragment sizes were taken from the 9th column of SAM files (TLEN) using Samtools version 1.3.1 and plotted as distributions using R version 3.3.1.

Read coverage was computed using deepTools bamCoverage version 2.2.4, considering only reads with mapping quality higher than 30, using one nucleotide bin size and normalizing using RPKM. Nucleosome positions were called using DANPOS version 2.2.2. The 4000 nucleosome positions with lowest fuzziness in round spermatid WT were used as reference positions to produce heatmaps using deepTools plotHeatmap. The positions were ordered using R by maximum value of the signal from 5' to 3' in the small structure WT condition.

The analysis of the distribution of all nucleosome positions within genomic regions was performed with CEAS version 1.0.2 and the plot layout was adjusted using custom R code.

The whole analysis was performed inside a custom analysis workflow using Snakemake version 3.9.0.

DATA AND SOFTWARE AVAILABILITY

The raw data (FastQ files) and processed data (Excel spreadsheets with called nucleosome positions and bigwig) are deposited in the Gene Expression Omnibus database under ID code GEO: GSE93251.

Proteomic data have been deposited with ProteomeXchange Consortium via the PRIDE Project accession number PRIDE: PXD005863.

Data have been deposited to Mendeley Data here: <https://data.mendeley.com/datasets/n6g254frpt/draft?a=ca92ef9b-c327-4c9e-8542-ad5dbaa74244>.

ADDITIONAL RESOURCES

Non-commercial Antibodies

NAP1L4 and Npm3 were expressed as GST tagged proteins in *E. coli* (BL21) and purified using standard procedures. Antibodies were raised in rabbits (Covalab, Villeurbanne, France) by three successive injections of 200 μ g recombinant proteins. The sera were then purified against recombinant proteins and the specificities of the antibodies were validated by detection of the corresponding proteins expressed in bacteria and in COS-7 cells, and by immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis.

Supplemental Information

Histone Variant H2A.L.2 Guides

Transition Protein-Dependent Protamine Assembly

in Male Germ Cells

Sophie Barral, Yuichi Morozumi, Hiroki Tanaka, Emilie Montellier, Jérôme Govin, Maud de Dieuleveult, Guillaume Charbonnier, Yohann Couté, Denis Puthier, Thierry Buchou, Fayçal Boussouar, Takashi Urahama, François Fenaille, Sandrine Curtet, Patrick Héry, Nicolas Fernandez-Nunez, Hitoshi Shiota, Matthieu Gérard, Sophie Rousseaux, Hitoshi Kurumizaka, and Saadi Khochbin

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental data include 7 supplemental figures and corresponding legends, and one table and its legend.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Figures and legends

[Figure S1](#) to [Figure S7](#)

Supplemental Table and legend

[Table S1](#)

Supplemental Figures

Figure S1 (related to Fig. 2)

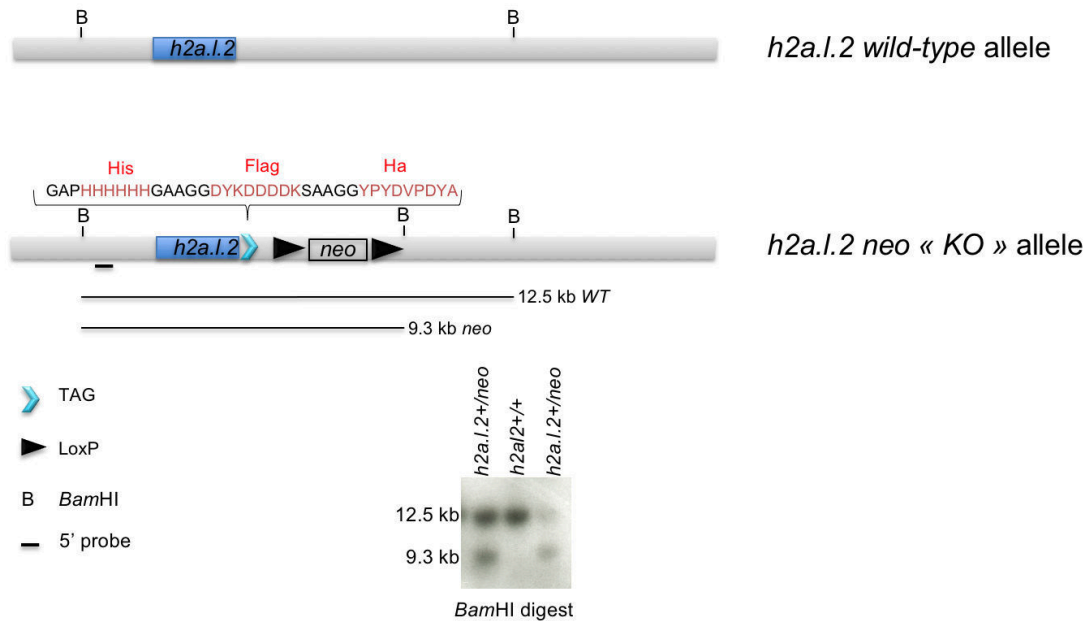


Figure S1 (related to Fig. 2): Targeting strategies to generate the *h2a.l.2*-*neo* mouse model.

A “6His-Flag-Ha” tag was inserted by recombineering in frame with *h2a.l.2* coding sequence replacing the STOP codon of the gene. For positive selection of ES cell clones, a LoxP-flanked *neo* cassette was introduced 3' of the tag. The presence of the *neo* cassette interferes with *h2a.l.2* gene expression leading to the absence of H2A.L.2 in the spermatogenic cells of *h2a.l.2*^{neo/neo} mice. A *Bam*HI site was inserted to facilitate the identification of the mutant allele by southern blot using 5' external probe.

In order to highlight the lack of protein, mice or cells with the *h2a.l.2*^{neo/neo} genotype are referred to as “H2A.L.2-KO” throughout the text.

Figure S2 (related to Fig. 2)

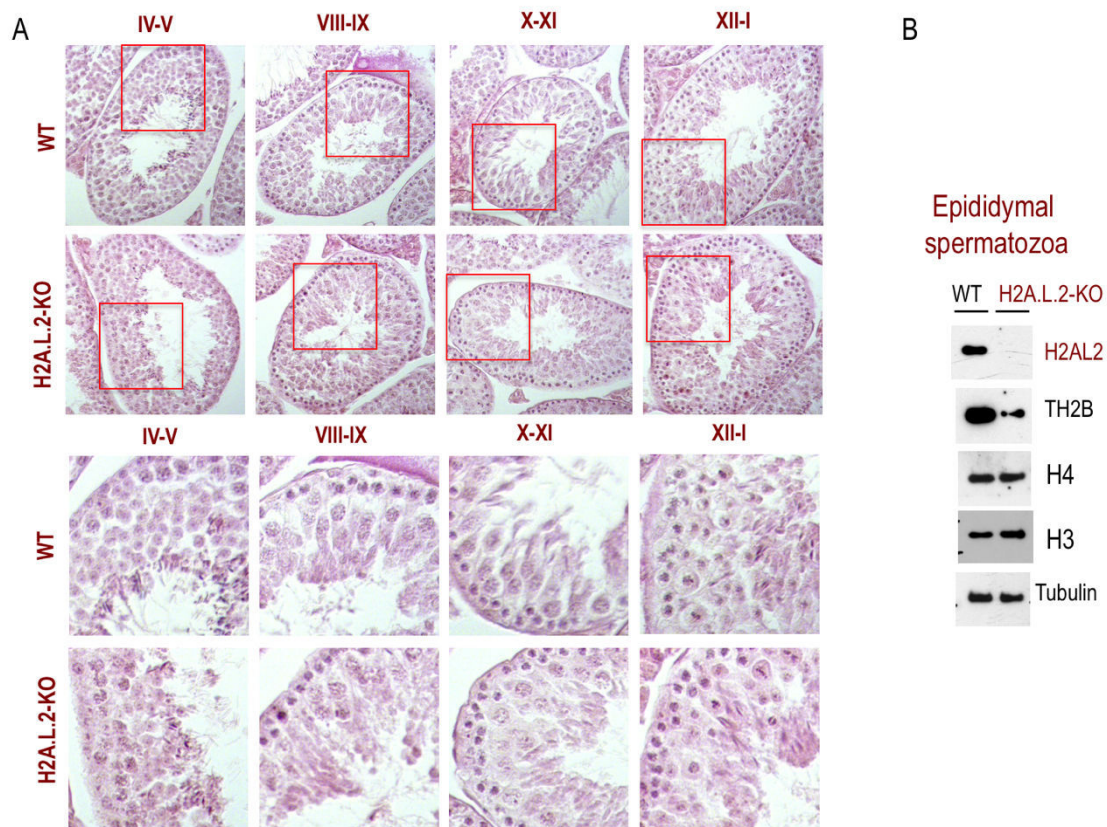


Figure S2 (related to Fig. 2): Normal testis histology in the absence of H2A.L.2 and histone retention in epididymal spermatozoa

(A) Histological preparations from wild-type and H2A.L.2-KO mice are shown. The insets indicate zones, which are shown at a higher magnification in the lower panels. Spermatogenic cell differentiation stages are indicated. (B) Epididymal spermatozoa from wild-type or H2A.L.2-KO mice were prepared and the presence of the indicated proteins was analysed by western blot.

Figure S3 (related to Fig. 3)

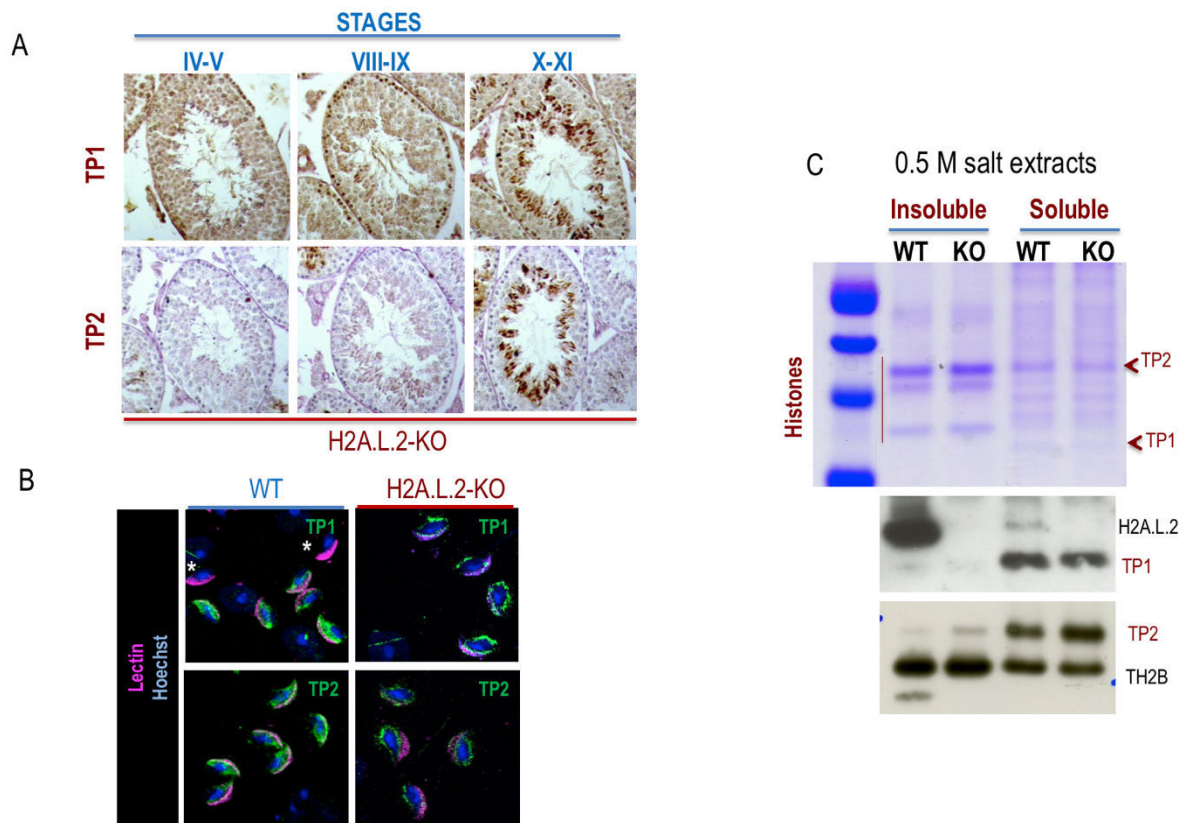


Figure S3 (related to Fig. 3): TP1 and TP2 protein expression in the absence of H2A.L.2

(A) Embedded paraffin testis sections from wild-type or H2A.L.2-KO mice were stained with the indicated antibodies. Spermatogenic cell differentiation stages are indicated. (B) DNA (stained with DAPI), TP1 and TP2 (immunodetected by the corresponding antibodies, green) and acrosome (detected by lectin, red) were visualized in wild-type and H2A.L.2-KO condensing spermatids by biphoton confocal microscopy. The merged images are shown. * indicates post-meiotic cells after TP removal/replacement. (C) Condensing spermatids were purified and nuclear proteins were extracted by the 0.5 M salt buffer. Soluble and insoluble proteins were then visualized on a SDS-PAGE (Coomassie). The presence of TP1, TP2, TH2B and H2A.L.2 was detected with the corresponding antibodies.

Figure S4 (related to Fig. 3)

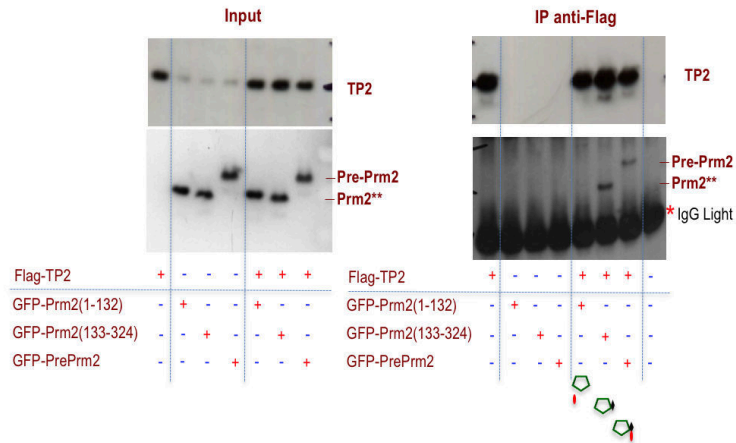
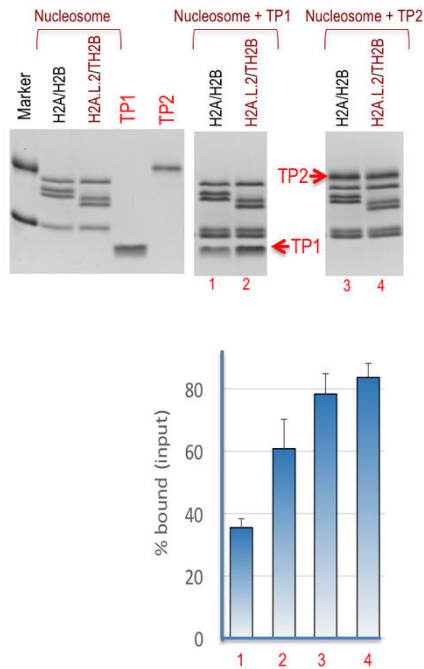


Figure S4 (related to Fig. 3): TP2 interacts with Prm2

COS7 cells were transfected with vectors expressing the indicated proteins in the order presented. After transfection, extracts were prepared and the expression of transfected proteins was visualized (input panel). The extracts were then used to immunoprecipitate TP2 (anti-Flag) and the immunoprecipitated materials were probed by an anti-Flag (to detect TP2) and anti-GFP (to detect Prm proteins) antibodies. Note that in total extracts (input) the anti-Flag antibody slightly cross-reacts with a cellular protein at the size of Flag-TP2. * indicates Ig light chain. Prm2** indicates GFP-Prm2(133-324) fragment.

Figure S5 (related to Fig. 4 and Fig. 5)

A



B

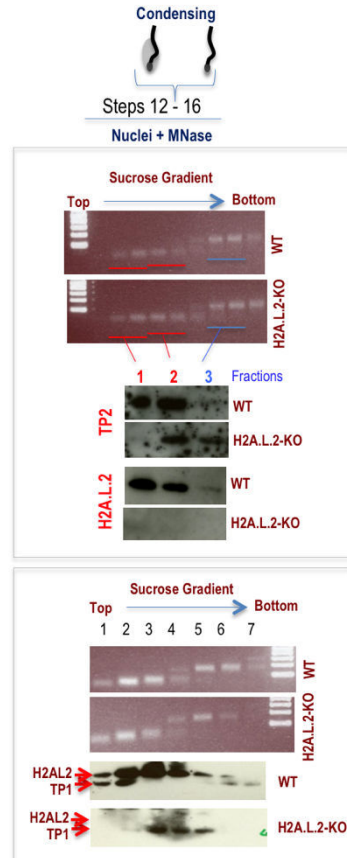


Figure S5 (related to Fig. 4 and Fig. 5): H2A.L.2 controls nucleosomes susceptibility for TPs invasion/incorporation

(A) SDS-PAGE shown in Figure 4E is shown here again for the sake of clarity to indicate the corresponding quantitative measurements of TP1 and TP2 binding. The intensity of TP1 and TP2 bound to nucleosomes was measured, normalized with respect to the input and expressed as a percentage of input bound. The band intensities were quantitated with LAS-4000 image analyzer (GE Healthcare), using the MultiGauge ver. 3.2 software (Fujifilm). The error bars indicate standard deviations from three independent experiments. (B) The indicated fractions from the gradient, also shown in Fig. 5A, were used to detect H2A.L.2 and TP2 after immunoblotting with the indicated antibodies (upper panel). The lower panel shows a similar independent experiment performed to detect H2A.L.2 and TP1 as shown in the indicated pooled fractions.

Figure S6 (related to Fig. 5)

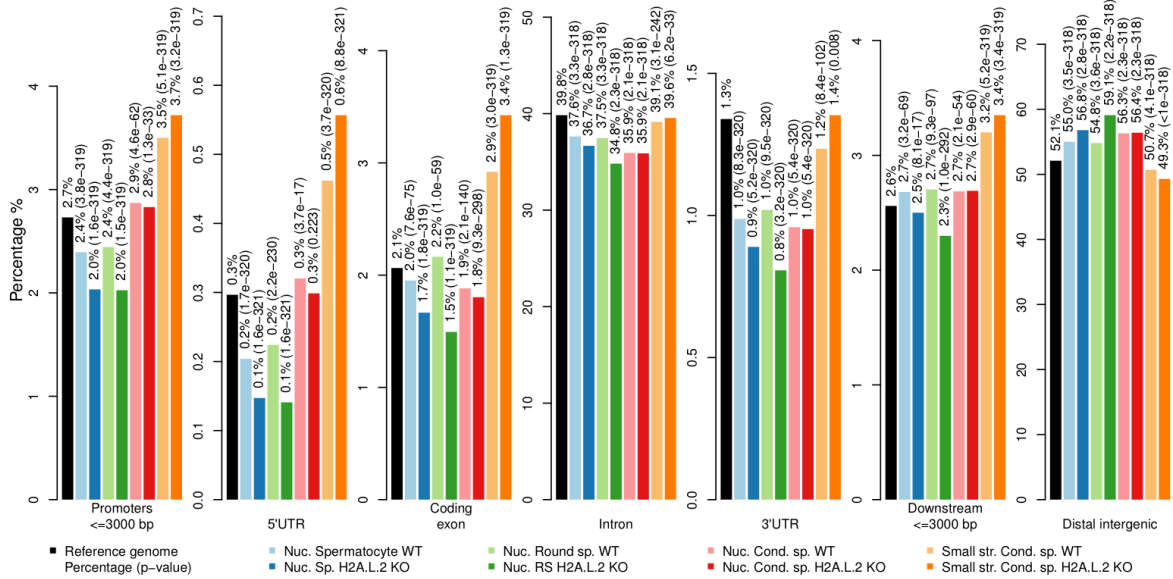


Figure S6 (related to Fig. 5B): Genome-wide transformation of nucleosomes into transitional states in condensing spermatids

The percentage of positions occupied by nucleosomes (in spermatocytes, round spermatids and condensing spermatids, in both genotypes) or small structures (from condensing spermatids) falling into the main genomic features, is shown for each sample as well as for the reference murine genome.

Figure S7 (related to Fig. 6)

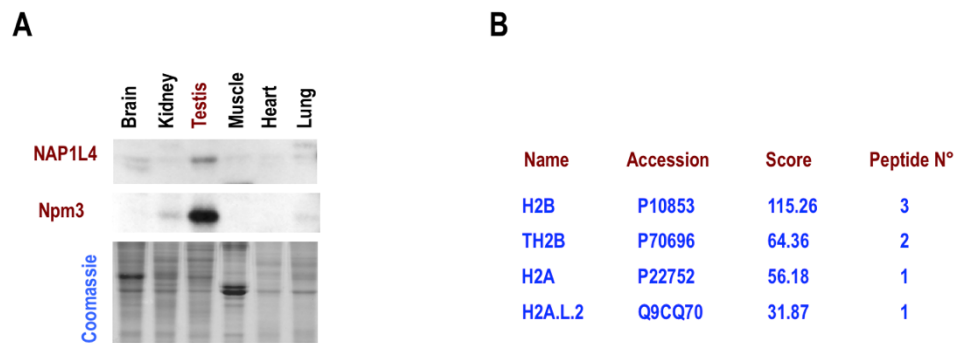


Figure S7 (related to Fig. 6): Visualization of Nap1L4 and Npm3 protein expression in different mouse tissues and identification of histones associated with Nap1L4

(A) Extracts prepared from the indicated tissues (Coomassie panel) were used to detect the indicated proteins. (B) The doublet indicated in Fig. 6C, was cut out of the SDS-PAGE and analysed by mass spectrometry.

Supplemental Table S1

Table S1: List of proteins identified following tap-tag purification of TH2B.					SSC TH2B /	SSC TH2B /	Ctrl (Exp1)		TH2B (Exp1)		Ctrl (Exp2)		TH2B (Exp2)			
Groups	Entry name	Uniprot AC	Protein name	Gene name	SSC Ctrl (Exp1)	SSC Ctrl (Exp2)	Pep	SC	SSC	Pep	SC	SSC	Pep	SC		
TH2B	H2B1A	P70696	Histone H2B type 1-A	Hist1h2ba	TH2B only	TH2B only				7	12	8				
	Tip60	KAT5	Q8CHK4	Histone acetyltransferase KAT5	Kat5	N/A	TH2B only							1	1	
		DMAP1	Q9J144	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	Dmap1	TH2B only	TH2B only			15	22	22		19	28	
		YEATS4	Q9CR11	YEATS domain-containing protein 4	Yeats4	TH2B only	TH2B only			9	12	12		13	16	
		EP400	Q8CHI8	E1A-binding protein p400	Ep400	TH2B only	TH2B only			7	7	7		10	10	
		E9PWT1	E9PWT1	Transformation/transcription domain-associated protein	Trrap	TH2B only	TH2B only			8	8	8		7	7	
		EPC1	Q8C9X6	Enhancer of polycomb homolog 1	Epc1	TH2B only	TH2B only			2	2	2		3	3	
		EPC2	Q8C0J4	Enhancer of polycomb homolog 2	Epc2	TH2B only	TH2B only			1	1	1		1	1	
		BRD8	Q8R3B7	Bromodomain-containing protein 8	Brd8	N/A	TH2B only								1	1
		RUVB1	P60122	RuvB-like 1	Ruvb1	TH2B only	TH2B only			28	52	52		28	49	
RUVB2	Q9VTM5	RuvB-like 2	Ruvb2	TH2B only	TH2B only			39	79	79		41	91			
SRCAP	A0A087WNL7	A0A087WNL7	Protein Srcap	Srcap	TH2B only	TH2B only			21	28	28		54	73		
	ACL6A	Q822N8	Actin-like protein 6A	Actl6a	TH2B only	TH2B only			13	25	25		15	25		
	VPS72	Q62481	Vacuolar protein sorting-associated protein 72 homolog	Vps72	TH2B only	TH2B only			5	8	8		7	11		
	A0A0R4J009	A0A0R4J009	Actin-related protein 6	Actr6	TH2B only	TH2B only			6	7	7		9	10		
	ZNFH1	ZNF331	Zinc finger HIT domain-containing protein 1	Znhit1	TH2B only	TH2B only			1	2	2		4	6		
	MBTD1	Q6P5G3	MBT domain-containing protein 1	Mbt1d1	TH2B only	N/A										
	H2A/H2B chaperones	SP16H	Q920B9	FACT complex subunit SPT16	Supt16h	TH2B only	TH2B only			31	39	39		43	54	
SSRP1		Q08943	FACT complex subunit SSRP1	Ssrp1	TH2B only	TH2B only			12	21	21		26	40		
NP1L1		P28656	Nucleosome assembly protein 1-like 1	Nap1l1	TH2B only	TH2B only			3	3	3		8	13		
NP1L4		Q78Z7A	Nucleosome assembly protein 1-like 4	Nap1l4	TH2B only	TH2B only			2	3	3		6	7		
Mcm complex	MCM2	P97310	DNA replication licensing factor MCM2	Mcm2	N/A	TH2B only							8	9		
	MCM4	P49717	DNA replication licensing factor MCM4	Mcm4	N/A	TH2B only							2	2		
	MCM6	P97311	DNA replication licensing factor MCM6	Mcm6	N/A	TH2B only							3	3		
	MCM7	Q61881	DNA replication licensing factor MCM7	Mcm7	N/A	TH2B only							5	5		
	J3QP08	J3QP08	Histone H2A	Gm14501	TH2B only	TH2B only			3	3	3		3	5		
Histones	S4R1E0	S4R1E0	Histone H2A	Gm14920	N/A	TH2B only							1	1		
	H2AV	Q3THW5	Histone H2A.V	H2av	TH2B only	TH2B only	1	1	0	3	10	1	5	21		
	H2AX	P27661	Histone H2AX	H2ax	TH2B only	TH2B only	1	1	0	6	16	3	4	22		
	H2A2A	Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	Hist2h2aa1	N/A	TH2B only	1	1	0	4	13	0	5	24		
	H2A1F	Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	Hist1h2af	TH2B only	TH2B only	1	1	0	5	14	1	5	25		
	H2AY	Q9CZQ8	Core histone macro-H2A.1	H2ay	N/A	TH2B only							4	5		
	H2A.L.2	Q9CQ70	Histone H2A-Bbd type 1	H2alb1	TH2B only	TH2B only			1	2	2		3	4		
	H2B1B	Q64475	Histone H2B type 1-B	Hist2h2bb	TH2B only	TH2B only			5	7	3		2	5		
	H31	P68433	Histone H3.1	Hist1h3a	TH2B only	TH2B only			3	3	3		2	2		
	H4	P62806	Histone H4	Hist1h4a	TH2B only	TH2B only			3	4	4		7	12		
	H11	P43275	Histone H1.1	Hist1h1a	N/A	TH2B only							2	2		
	H12	P15864	Histone H1.2	Hist1h1c	N/A	TH2B only							2	2		
	H1T	Q07133	Histone H1t	Hist1h1t	N/A	TH2B only			1	1	0	1	1	0	3	
	I7HFT9	I7HFT9	Histone H1t	Hist1h1t	N/A	TH2B only			1	1	0	1	1	0	3	
	HILS1	Q9QYL0	Spermatid-specific linker histone H1-like protein	Hils1	TH2B only	2.0			1	1	1	1	1	2	2	
	Chromatin modifiers	HDAC2	P70288	Histone deacetylase 2	Hdac2	TH2B only	TH2B only			7	8	4		8	11	
		HDAC1	O09106	Histone deacetylase 1	Hdac1	TH2B only	TH2B only			8	8	4		8	9	
D3Y555		D3Y555	Histone deacetylase complex subunit SAP18	Sap18	N/A	TH2B only							1	1		
ANM5		Q8CIG8	Protein arginine N-methyltransferase 5	Prrm5	0.8	3.0	12	14	14	9	11	11	1	1	3	
CDYL		Q9WTK2	Chromodomain Y-like protein	Cdyl	TH2B only	TH2B only				1	1	1		1	1	
CHTOP		Q9CY57	Chromatin target of PRMT1 protein	Chtop	1.3	1.2	6	9	9	9	12	12	7	9	9	

Table S1: List of proteins identified following tap-tag purification of TH2B. Exp1 shows protein identified when TH2B was purified from whole male germ cell extracts and Exp2, when TH2B purification was carried out on round/elongating spermatid enriched fractions. Pep: number of identified peptides; SC: Spectral Counts; SSC: Specific Spectral Counts. The green areas indicate proteins identified only in TH2B-tag immunoprecipitates, with a minimum of 3 SSC or enriched at least 5 times in the anti-TH2B-tag immunoprecipitates compared to the control (Ctrl) immunoprecipitates. In the control immunoprecipitation, exactly the same immunoprecipitation-elution procedure was performed on extracts from wild type mice testes. See also Fig. 6A. Identified proteins unrelated to chromatin structure and function were removed from the list.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I- Parallèle fonctionnel entre Nut et Brdt

L'utilisation de souris dans laquelle le gène codant pour la protéine Nut est invalidé (*Nut-KO*), nous a permis de déterminer le rôle impliquant Nut dans l'hyperacétylation de l'histone H4 ainsi que de confirmer l'importance de cette hyperacétylation dans le processus de remplacement des histones par les protamines. En effet, en l'absence de Nut, nous avons observé une diminution de l'acétylation de H4 ainsi qu'un défaut au niveau du remplacement des histones. Ce phénotype observé avec la lignée murine *Nut-KO* est très similaire à celui de la lignée *Brdtdelta BD1/deltaBD1* dans laquelle le gène codant pour Brdt est délété de son premier bromodomaine BD1 (Gaucher et al., 2012; Shang et al., 2007). Ces deux modèles montrent que les protéines de transition et les protamines bien que produites sont dans l'incapacité de remplacer les histones. L'activité de Nut permet l'hyperacétylation spécifique des résidus K5 et K8 et des études antérieures ont montré que le premier bromodomaine de Brdt interagit simultanément avec ces 2 résidus acétylés (Moriniere et al., 2009). Ceci explique comment le facteur Nut et la protéine Brdt sont fonctionnellement liés. Ainsi, dans les spermatides en cours d'élongation provenant des souris *Nut-KO*, dans lesquelles une diminution de l'acétylation de H4K5 et H4K8 est observée, la liaison du bromodomaine BD1 de Brdt ne peut pas s'effectuer correctement et le processus de remplacement des histones est par conséquent affecté. Nut et Brdt semblent donc être impliqués dans le même mécanisme moléculaire contrôlant le remplacement des histones par les protamines.

II - Impact différentiel de Nut vis-à-vis de l'acétylation de H4 et de H3

D'après nos résultats *in vivo*, le facteur Nut semble indispensable pour l'acétylation de H4 alors que son absence affecte très peu l'acétylation de l'histone H3. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que *in vivo*, l'acétylation de H3 détectée dans les spermatides proviendrait d'étapes plus précoces alors que l'acétylation de H4 aurait lieu dans les cellules post-méiotiques au moment de la synthèse de Nut et nécessiterait une modification des propriétés de l'enzyme p300. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont justement montré que CBP et p300 sont également exprimées lors de stades précoces, en plus de leur expression lors des stades post-méiotique (Boussouar et al., 2014). Ainsi CBP et p300 catalyseraient préférentiellement l'acétylation de H3 sur les résidus lysine 18 et 27 dans les stades précoces de la spermatogénèse, alors qu'elles catalyseraient l'acétylation de H4 uniquement en présence du facteur Nut au cours des stades post-méiotiques (Figure 31).

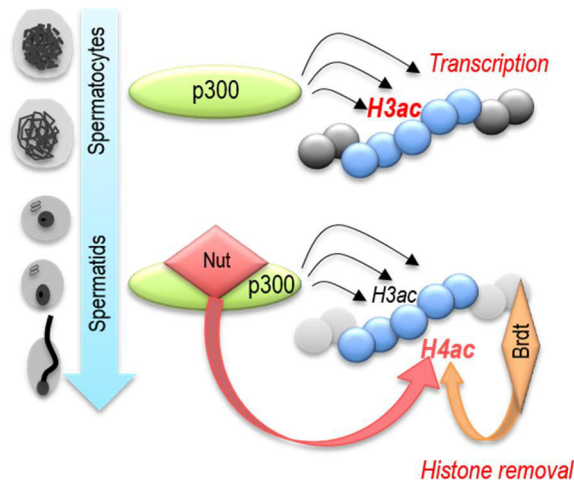


Figure 31 : Modèle illustrant l'impact différentiel de Nut dans l'acétylation de H3 et de H4.

III- Comparaison fonctionnelle du mécanisme régulateur de Nut au cours de processus physiologique et pathologique

Nos travaux démontrent que dans les cellules germinales post-méiotiques, les HATs p300/CBP maintiennent le niveau basal d'acétylation de H3. Par contre, p300/CBP génèrent une hyperacétylation de l'histone H4 précisément au niveau des résidus K5 et K8 et ce grâce à l'interaction avec le régulateur Nut. Nos analyses protéomiques ont identifié p300 et CBP comme étant les seules histones acétyltransferases interagissant avec Nut. De manière intéressante, des résultats similaires ont été observés après l'analyse par spectrométrie de masse d'une immunopurification de BRD4-NUT dans les cellules cancéreuses NMC, montrant également p300 et CBP comme uniques HATs associées au complexe BRD4-NUT (Alekseyenko et al., 2017). Dans ces cellules, une translocation chromosomique induit une coopération forcée, contrôlée par NUT, entre p300/CBP et BRD4. Ces interactions forment des foyers d'histones hyperacétylés au niveau de la chromatine. Le mode d'action de Nut au cours de la spermatogénèse est donc détourné lorsqu'il est exprimé hors-contexte dans les cellules cancéreuses (Figure 32).

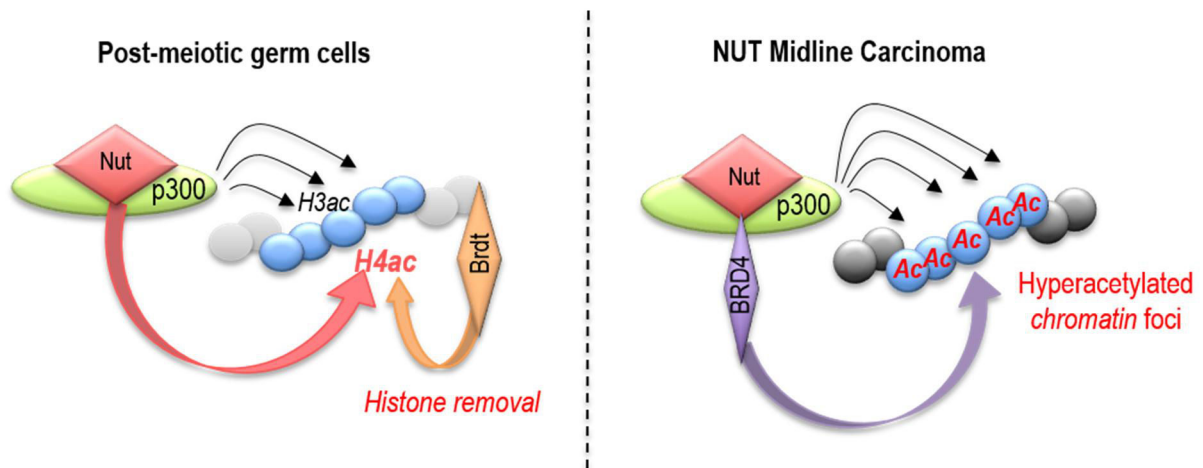


Figure 32 : Modèle illustrant l'implication de Nut et des HATs p300/CBP dans des conditions physiologiques (cellules germinales post-méiotiques) et pathologiques (carcinome de la ligne médiane).

En perspective de ce travail, une bonne connaissance des aspects structuraux de Nut avec p300/CBP permettrait de définir des inhibiteurs ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses du NMC.

IV - Déstabilisation de la structure du nucléosome par incorporation de variants d'histone

Plusieurs variants d'histone sont aujourd'hui connus pour déstabiliser la structure du nucléosome. Leur incorporation permet « l'ouverture » du nucléosome créant ainsi une plateforme nécessaire pour l'invasion du nucléosome par des protéines autres que les histones.

CENP-A, un variant de l'histone H3 présent au niveau des régions centromériques, en est un très bon exemple. En effet, la présence de CENP-A au sein du nucléosome modifie la longueur de la fibre d'ADN enroulée autour de celui-ci. Celle-ci correspond à 121 paires de bases au lieu des 147 paires habituellement. Il a été démontré que la structure du nucléosome contenant CENP-A est modifiée avec un détachement de 13 paires de bases des extrémités d'ADN à la surface du nucléosome (Tachiwana et al., 2011). On parle alors d'une structure ouverte avec des extrémités d'ADN flexibles qui facilite ainsi le dépôt des protéines du kinétochore et qui assure une correcte ségrégation des chromosomes au cours de la mitose (Roulland et al., 2016).

Des travaux ont montré que l'incorporation de variants d'histone de type H2A.B ou H2A.L au sein du nucléosome déstabilise la structure de celui-ci et induit une structure nucléosomale ouverte similaire à celle des nucléosomes contenant CENP-A avec des extrémités d'ADN flexibles (Arimura et al., 2013; Bao et al., 2004; Doyen et al., 2006; Molaro et al., 2018; Nekrasov et al., 2012; Soboleva et al., 2011; Syed et al., 2009). Nous retrouvons cette structure ouverte lors de l'incorporation de H2A.L.2 dans les nucléosomes au moment du remplacement des histones. Au cours de ma thèse, nous avons montré que ce changement de structure permet l'invasion du nucléosome par les protéines de transition. Ainsi, La fonction primaire de H2A.L.2 serait de permettre le dépôt des TP sur la chromatine grâce à l'ouverture de la structure du nucléosome (Figure 33).

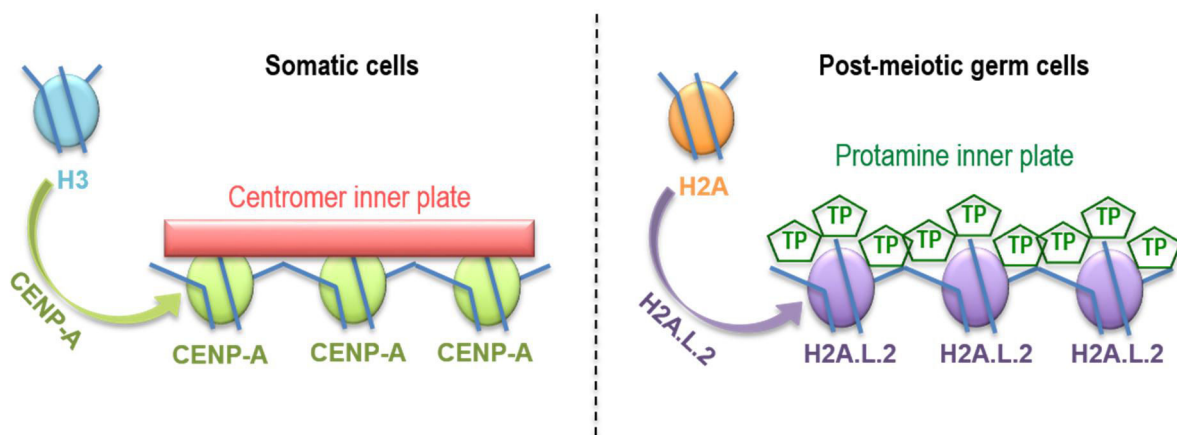


Figure 33 : Ouverture de la structure nucléosomale par l'incorporation des variants d'histone CENP-A et H2A.L.2.

V- Caractérisation des structures subnucléosomales

Les variants d'histone H2A.L.2 et TH2B sont tous deux présents dans les structures de transition formées au moment de l'enlèvement des histones avant la formation des nucléoprotamines. Ces structures transitoires subnucléosomales ont été mises en évidence dans les spermatides allongées/condensées après une digestion poussée à la nucléase micrococciale (Govin et al., 2007). Au cours de ma thèse, les séquences de l'ADN qui composent ces petites structures ont été analysées. Cette analyse a permis de cartographier la position des fragments d'ADN sur l'ensemble du génome mais aussi de déterminer la distribution des tailles de ces fragments. Grâce à cette étude, nous avons donc pu identifier une taille de fragment d'ADN de 73 paires de base associé à ces structures. Nous avons

également décrypté que le mode de transformation du nucléosome en petites structures est totalement aléatoire sur l'ensemble du génome, avec une invasion non biaisée des nucléosomes parentaux par les TPs.

Une meilleure caractérisation de ces structures subnucléosomales permettrait d'enrichir notre modèle moléculaire en identifiant de nouveaux acteurs impliqués dans le processus de remplacement des histones. Nous avons donc entrepris des analyses après purification de ces structures par spectrométrie de masse. Parmi les nombreuses protéines identifiées au sein de ces structures subnucléosomales, nous nous sommes focalisés sur les protéines les plus abondantes et présentes de manière constante dans ces structures, pouvant potentiellement avoir un rôle dans le remplacement des histones par les protamines. Des résultats préliminaires nous permettent de nous engager dans la création d'une nouvelle lignée murine invalidée pour un gène correspondant à ce type de protéine.

VI- Programmation de l'épigénome mâle

L'ensemble des travaux réalisés au sein du laboratoire a contribué à une meilleure compréhension de l'organisation post-méiotique de l'épigénome mâle. En effet, les études portant sur les fonctions des variants d'histones H2AL.2 et TH2B, des nombreuses modifications post-traductionnelles ainsi que d'autres acteurs épigénétiques tels que le facteur Nut et la protéine à double bromodomaine Brdt ont permis d'accroître nos connaissances sur la réorganisation de la chromatine au cours des étapes post-méiotiques de la spermatogénèse.

Ainsi le remodelage de la chromatine s'effectue grâce à la combinaison de plusieurs mécanismes qui se succèdent dans un ordre bien précis. L'incorporation de variants d'histones et l'addition de MPTs par l'intermédiaire de facteurs épigénétiques déstabilisent la structure des nucléosomes et les rendent plus permissifs au démantèlement. L'addition massive des MPTs constitue une plateforme pour le recrutement des lecteurs de la chromatine impliqués dans le processus d'enlèvement des histones.

Au fur et à mesure des découvertes, les mécanismes ne cessent de se complexifier et engendrent de nouvelles questions.

Comment certaines régions du génome échappent au remplacement des histones et restent sous forme nucléosomale au sein du spermatozoïde?

Où vont les histones après avoir été dissociées de l'ADN nucléosomal? Comment sont-elles dégradées? Existe-t-il des chaperonnes spécifiques de la lignée germinale?

VII- Informations épigénétiques au cours du développement embryonnaire précoce

Au cours de la spermatogénèse, le remplacement des histones par les protamines n'est pas total. Il subsiste une proportion non négligeable d'histones dans le spermatozoïde, ces histones sont retenus spécifiquement sur les régions promotrices de gènes (Yoshida et al., 2018). Les régions du génome qui persistent sous la forme nucléosomale pourraient apporter ainsi des informations épigénétiques qui seraient donc transmises par le spermatozoïde et nécessaires au développement embryonnaire précoce. Après la fécondation, un nouveau remodelage chromatinien du pronoyau mâle, où les protamines sont remplacées par les histones, permet d'acquérir une structure chromatinienne somatique.

Dans le pronoyau mâle, les histones remplaçant les protamines sont acétylés et hypométhylés contrairement au pronoyau femelle qui contient des histones méthylées (Wu et al., 2008).

Récemment, il a été montré un rôle essentiel des petits ARN non-codants dit de transfert (ARNt) dans le développement embryonnaire précoce chez la souris. Ces ARNs sont synthétisés au sein de l'épididyme et transportés dans les spermatozoïdes par des exosomes. A l'entrée de l'épididyme (*caput*), les spermatozoïdes sont chargés en piARN alors qu'à la sortie (*cauda*), on retrouve essentiellement les ARNt (Conine et al., 2018; Mashoodh and Ferguson-Smith, 2018; Sharma et al., 2018).

D'autre part, les pronoyaux mâles et femelles sont asymétriques vis-à-vis de l'incorporation de variants d'histones. C'est le cas du variant H3.3 qui est présent uniquement dans le pronoyau mâle (Torres-Padilla et al., 2006; van der Heijden et al., 2005).

TH2B est également incorporé à la chromatine au cours de l'ovogénèse et ce variant est rapidement retrouvé dans le pronoyau mâle au cours du développement embryonnaire précoce (Shinagawa et al., 2014). Une étude a également montré un rôle du variant CENP-A dans le développement embryonnaire précoce chez la drosophile (Raychaudhuri et al., 2012). En ce qui concerne H2A.L.2, nous savons qu'il est présent dans les spermatozoïdes et qu'il est transmis à l'embryon. Ainsi, ce variant pourrait aussi être impliqué dans le développement embryonnaire précoce. Nous envisageons donc, en perspective de ce travail, de réaliser des expériences d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI : Intra Cytoplasmic Sperm Injection) en collaboration avec le laboratoire de Christophe Arnoult. Ainsi l'injection de tête de spermatozoïdes provenant des souris *H2A.L.2-KO* dans des ovocytes, nous permettra d'observer l'impact de ce variant sur le développement embryonnaire précoce.

Ces études montrent que le spermatozoïde transmet non seulement des informations génétiques mais porte également ses propres informations épigénétiques nécessaires pour le

développement embryonnaire précoce. Reste à comprendre comment ces informations vont être reconnues et interprétées.

CONCLUSION GENERALE

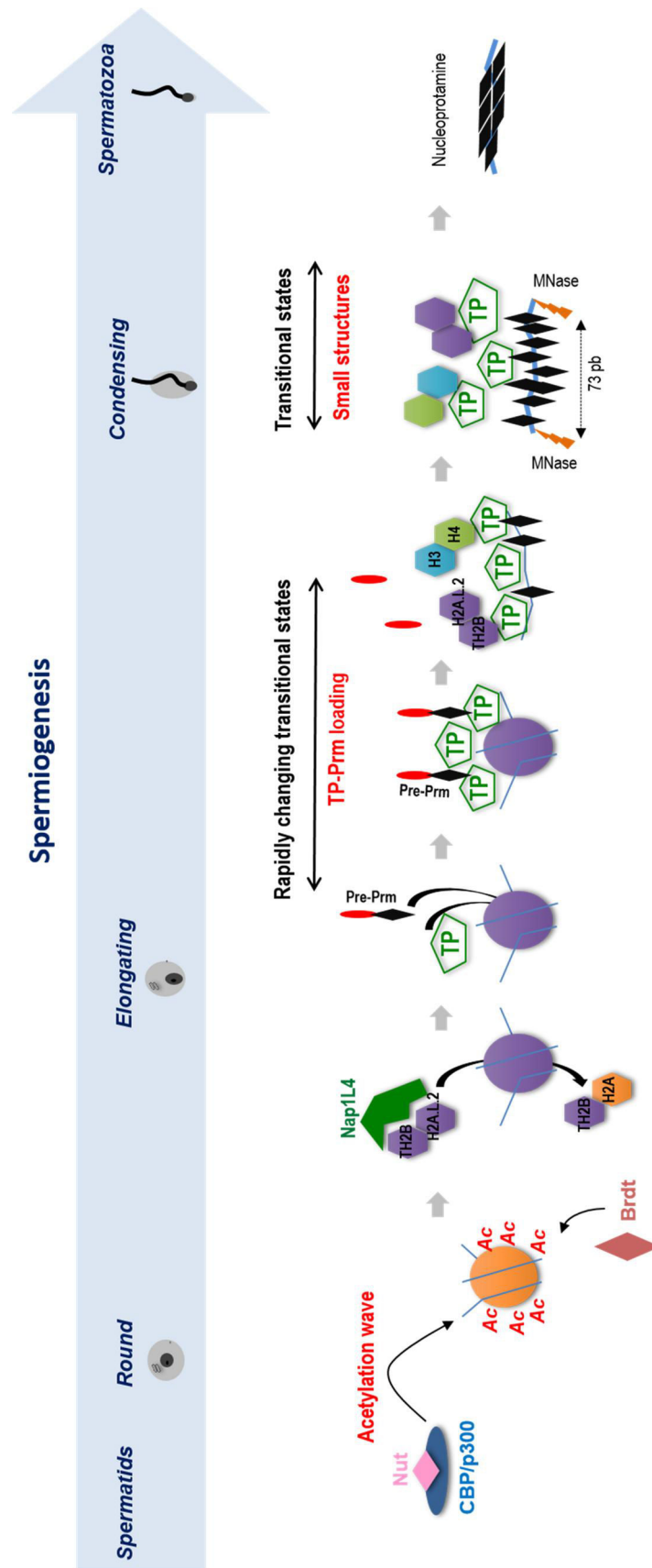


Figure 34 : Modèle moléculaire du remplacement des histones par les protamines incluant deux nouveaux acteurs épigénétiques : le facteur Nut et le variant H2A.L.2.

L'ensemble des données présentées dans mes deux articles a montré que la présence du facteur Nut et l'incorporation du variant d'histone H2A.L.2 sont deux événements majeurs pour le bon déroulement du remplacement des histones par les protamines lors des étapes post-méiotiques du développement des cellules germinales mâles. Ces travaux ont permis d'établir le premier modèle moléculaire permettant de comprendre la programmation épigénétique post-méiotique (Figure 34).

Dans les cellules germinales mâles haploïdes, la fonction majeure de Nut est de moduler l'activité acétyltransférase de p300 et CBP. Ces HATs ne sont pas seulement responsables de l'acétylation de H3 dans les spermatogonies et les spermatocytes, elles induisent également une hyperacétylation spécifique de H4K5 et H4K8 dépendante de Nut dans les cellules post-méiotiques. Cette hyperacétylation des histones est la première étape dans la réorganisation de la chromatine et initie le remplacement des histones grâce à l'interaction du premier bromodomaine de Brdt avec les résidus K5 et K8 acétylés de H4.

Une approche protéomique a permis d'identifier les variants d'histone TH2B et H2A.L.2 ainsi que la protéine de transition TP2 comme partenaire de Nut. Cette découverte permet de faire le lien entre l'hyperacétylation de H4, la liaison de Brdt et l'échange du dimère TH2B-H2A par le dimère TH2B-H2A.L.2, une série d'événements essentiels qui génère une déstabilisation des nucléosomes et initie le remplacement des histones.

Dans les spermatides en cours d'élongation, H2A.L.2 dimérise avec le variant TH2B. Ce dimère va être pris en charge par la chaperonne NAP1L4 qui va permettre l'échange du dimère TH2B-H2A avec le dimère TH2B-H2A.L.2 au sein du nucléosome. L'incorporation de ce dimère déstabilise la structure du nucléosome et rend les extrémités d'ADN flexibles. Cette structure « ouverte » permet l'invasion des nucléosomes par les protéines de transition. Une des fonctions primaires de H2A.L.2 est donc de permettre le dépôt des TPs au niveau de la chromatine. Cependant, les TPs ne permettent pas le remplacement des histones, elles génèrent une interface pour le recrutement et la maturation des pré-protamines. La fonction des TPs est essentiellement de contrôler et d'orienter l'action des protamines lors du déplacement des histones. Les complexes TP-Prm entrent en compétition avec les complexes TP-histones vis-à-vis de leur liaison à l'ADN. Les histones ainsi déplacées ne sont plus octamériques. Les protamines sont donc les vrais médiateurs du déplacement des histones et donc induisent la formation d'états transitoires correspondant aux petites structures subnucléosomales.

Cette recherche fondamentale permet une meilleure compréhension au niveau de l'organisation post-méiotique de l'épigénome mâle au cours de la spermatogénèse mais ces concepts épigénétiques décrits ici sont d'utilité plus large et ouvrent aussi la voie à une meilleure compréhension des possibles causes d'infertilité masculine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adham, I.M., Nayernia, K., Burkhardt-Gottges, E., Topaloglu, O., Dixkens, C., Holstein, A.F., and Engel, W. (2001). Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Molecular human reproduction* 7, 513-520.

Aka, J.A., Kim, G.W., and Yang, X.J. (2011). K-acetylation and its enzymes: overview and new developments. *Handbook of experimental pharmacology* 206, 1-12.

Akhmanova, A.S., Bindels, P.C., Xu, J., Miedema, K., Kremer, H., and Hennig, W. (1995). Structure and expression of histone H3.3 genes in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila hydei*. *Genome* 38, 586-600.

Albig, W., Ebentheuer, J., Klobeck, G., Kunz, J., and Doenecke, D. (1996). A solitary human H3 histone gene on chromosome 1. *Human genetics* 97, 486-491.

Alekseev, O.M., Widgren, E.E., Richardson, R.T., and O'Rand, M.G. (2005). Association of NASP with HSP90 in mouse spermatogenic cells: stimulation of ATPase activity and transport of linker histones into nuclei. *The Journal of biological chemistry* 280, 2904-2911.

Alekseyenko, A.A., Walsh, E.M., Zee, B.M., Pakozdi, T., Hsi, P., Lemieux, M.E., Dal Cin, P., Ince, T.A., Kharchenko, P.V., Kuroda, M.I., *et al.* (2017). Ectopic protein interactions within BRD4-chromatin complexes drive oncogenic megadomain formation in NUT midline carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E4184-e4192.

Altmann, R. (1889). Ueber Nucleinsäuren. *Arch f Anatomie u Physiol* 1, 524-536.

Andrews, F.H., Shinsky, S.A., Shanle, E.K., Bridgers, J.B., Gest, A., Tsun, I.K., Krajewski, K., Shi, X., Strahl, B.D., and Kutateladze, T.G. (2016). The Taf14 YEATS domain is a reader of histone crotonylation. *Nature chemical biology* 12, 396-398.

Angelov, D., Verdel, A., An, W., Bondarenko, V., Hans, F., Doyen, C.M., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., *et al.* (2004). SWI/SNF remodeling and p300-dependent transcription of histone variant H2ABbd nucleosomal arrays. *The EMBO journal* 23, 3815-3824.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10148-10152.

Arimura, Y., Kimura, H., Oda, T., Sato, K., Osakabe, A., Tachiwana, H., Sato, Y., Kinugasa, Y., Ikura, T., Sugiyama, M., *et al.* (2013). Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Scientific reports* 3, 3510.

Arthold, S., Kurowski, A., and Wutz, A. (2011). Mechanistic insights into chromosome-wide silencing in X inactivation. *Human genetics* 130, 295-305.

Aul, R.B., and Oko, R.J. (2002). The major subacrosomal occupant of bull spermatozoa is a novel histone H2B variant associated with the forming acrosome during spermiogenesis. *Developmental biology* 242, 376-387.

Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus tupe IIII. *The Journal of experimental medicine* 79, 137-158.

Baarends, W.M., Roest, H.P., and Grootegoed, J.A. (1999). The ubiquitin system in gametogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 151, 5-16.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology* 8, 227.

Balhorn, R., Brewer, L., and Corzett, M. (2000). DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Molecular reproduction and development* 56, 230-234.

Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C., and Wyrobek, A.J. (1984). DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Experimental cell research* 150, 298-308.

Bao, X., Wang, Y., Li, X., Li, X.M., Liu, Z., Yang, T., Wong, C.F., Zhang, J., Hao, Q., and Li, X.D. (2014). Identification of 'erasers' for lysine crotonylated histone marks using a chemical proteomics approach. *eLife* 3.

Bao, Y., Konesky, K., Park, Y.J., Rosu, S., Dyer, P.N., Rangasamy, D., Tremethick, D.J., Laybourn, P.J., and Luger, K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *The EMBO journal* 23, 3314-3324.

Barlow, C., Liyanage, M., Moens, P.B., Tarsounas, M., Nagashima, K., Brown, K., Rottinghaus, S., Jackson, S.P., Tagle, D., Ried, T., *et al.* (1998). Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptoneura of prophase I. *Development (Cambridge, England)* *125*, 4007-4017.

Baskaran, R., and Rao, M.R. (1990). Interaction of spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1. *The Journal of biological chemistry* *265*, 21039-21047.

Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., Cutter, A.R., Papai, G., Reymer, A., Syed, S.H., Lone, I.N., Tonchev, O., Crucifix, C., *et al.* (2017). Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Molecular cell* *66*, 729.

Bellani, M.A., Romanienko, P.J., Cairatti, D.A., and Camerini-Otero, R.D. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of Atm^{-/-} spermatocytes. *Journal of cell science* *118*, 3233-3245.

Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., *et al.* (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* *120*, 169-181.

Bharath, M.M., Chandra, N.R., and Rao, M.R. (2003). Molecular modeling of the chromatosome particle. *Nucleic acids research* *31*, 4264-4274.

Biggiogera, M., Muller, S., Courtens, J.L., Fakan, S., and Romanini, M.G. (1992). Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *Microscopy research and technique* *20*, 259-267.

Billon, P., and Cote, J. (2013). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochimica et biophysica acta* *1819*, 290-302.

Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* *16*, 6-21.

Biterge, B., and Schneider, R. (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell and tissue research* *356*, 457-466.

Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). The role of Drosophila CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nature cell biology* *3*, 730-739.

Bonisch, C., and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic acids research* *40*, 10719-10741.

Boulard, M., Gautier, T., Mbele, G.O., Gerson, V., Hamiche, A., Angelov, D., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2006). The NH2 tail of the novel histone variant H2BFWT exhibits properties distinct from conventional H2B with respect to the assembly of mitotic chromosomes. *Molecular and cellular biology* *26*, 1518-1526.

Boussouar, F., Goudarzi, A., Buchou, T., Shiota, H., Barral, S., Debernardi, A., Guardiola, P., Brindle, P., Martinez, G., Arnoult, C., *et al.* (2014). A specific CBP/p300-dependent gene expression programme drives the metabolic remodelling in late stages of spermatogenesis. *Andrology* *2*, 351-359.

Branson, R.E., Grimes, S.R., Jr., Yonuschot, G., and Irvin, J.L. (1975). The histones of rat testis. *Archives of biochemistry and biophysics* *168*, 403-412.

Brewer, L., Corzett, M., and Balhorn, R. (2002). Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry* *277*, 38895-38900.

Brewer, L., Corzett, M., Lau, E.Y., and Balhorn, R. (2003). Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *The Journal of biological chemistry* *278*, 42403-42408.

Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schubeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology* *17*, 679-687.

Burgess, R.J., and Zhang, Z. (2013). Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease. *Nature structural & molecular biology* *20*, 14-22.

Burgio, G., Onorati, M.C., and Corona, D.F. (2010). Chromatin remodeling regulation by small molecules and metabolites. *Biochimica et biophysica acta* *1799*, 671-680.

Burlingame, R.W., Love, W.E., Wang, B.C., Hamlin, R., Nguyen, H.X., and Moudrianakis, E.N. (1985). Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science (New York, N.Y.)* *228*, 546-553.

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 (New York, N.Y.)* **298**, 1039-1043.

Caron, C., Govin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2005). How to pack the genome for a safe trip. *Progress in molecular and subcellular biology* **38**, 65-89.

Caron, C., Pivot-Pajot, C., van Grunsven, L.A., Col, E., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO reports* **4**, 877-882.

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 (New York, N.Y.)* **296**, 922-927.

Chadwick, B.P., Valley, C.M., and Willard, H.F. (2001). Histone variant macroH2A contains two distinct macrochromatin domains capable of directing macroH2A to the inactive X chromosome. *Nucleic acids research* **29**, 2699-2705.

Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., and Bruick, R.K. (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 444-447.

Chauviere, M., Martinage, A., Debarle, M., Sautiere, P., and Chevallier, P. (1992). Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *European journal of biochemistry* **204**, 759-765.

Chen, C.L., Yan, X., Gao, Y.N., and Liao, Q.P. (2005). [Expression of DNA methyltransferase 1, 3A and 3B mRNA in the epithelial ovarian carcinoma]. *Zhonghua fu chan ke za zhi* **40**, 770-774.

Chen, Y., Sprung, R., Tang, Y., Ball, H., Sangras, B., Kim, S.C., Falck, J.R., Peng, J., Gu, W., and Zhao, Y. (2007). Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 812-819.

Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature genetics* **28**, 82-86.

Churikov, D., Siino, J., Svetlova, M., Zhang, K., Gineitis, A., Morton Bradbury, E., and Zalensky, A. (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* **84**, 745-756.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual review of biochemistry* **78**, 273-304.

Conine, C.C., Sun, F., Song, L., Rivera-Perez, J.A., and Rando, O.J. (2018). Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice. *Developmental cell* **46**, 470-480.e473.

Cook, A.J., Gurard-Levin, Z.A., Vassias, I., and Almouzni, G. (2011). A specific function for the histone chaperone NASP to fine-tune a reservoir of soluble H3-H4 in the histone supply chain. *Molecular cell* **44**, 918-927.

Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**, 599-601.

Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (2001). MACROH2A2, a new member of the MARCOH2A core histone family. *The Journal of biological chemistry* **276**, 21776-21784.

Dai, L., Peng, C., Montellier, E., Lu, Z., Chen, Y., Ishii, H., Debernardi, A., Buchou, T., Rousseaux, S., Jin, F., *et al.* (2014). Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nature chemical biology* **10**, 365-370.

Dantzer, F., Mark, M., Quenet, D., Scherthan, H., Huber, A., Liebe, B., Monaco, L., Chicheportiche, A., Sassone-Corsi, P., de Murcia, G., *et al.* (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14854-14859.

Das, C., Tyler, J.K., and Churchill, M.E. (2010). The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance. *Trends in biochemical sciences* **35**, 476-489.

de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., *et al.* (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Developmental cell* **7**, 663-676.

Di Lorenzo, A., and Bedford, M.T. (2011). Histone arginine methylation. *FEBS letters* *585*, 2024-2031.

Doenecke, D., Drabent, B., Bode, C., Bramlage, B., Franke, K., Gavenis, K., Kosciessa, U., and Witt, O. (1997). Histone gene expression and chromatin structure during spermatogenesis. *Advances in experimental medicine and biology* *424*, 37-48.

Doyen, C.M., Montel, F., Gautier, T., Menoni, H., Claudet, C., Delacour-Larose, M., Angelov, D., Hamiche, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., *et al.* (2006). Dissection of the unusual structural and functional properties of the variant H2A.Bbd nucleosome. *The EMBO journal* *25*, 4234-4244.

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. *Cytogenetic and genome research* *103*, 307-313.

Drabent, B., Saftig, P., Bode, C., and Doenecke, D. (2000). Spermatogenesis proceeds normally in mice without linker histone H1t. *Histochemistry and cell biology* *113*, 433-442.

Drane, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & development* *24*, 1253-1265.

Dulac, C. (2010). Brain function and chromatin plasticity. *Nature* *465*, 728-735.

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.

Dutnall, R.N., and Ramakrishnan, V. (1997). Twists and turns of the nucleosome: tails without ends. *Structure (London, England : 1993)* *5*, 1255-1259.

Eckstein, F. (2005). Small non-coding RNAs as magic bullets. *Trends in biochemical sciences* *30*, 445-452.

Eirin-Lopez, J., and Ausio, J. (2007). H2A.Z-Mediated Genome-Wide Chromatin Specialization. *Current genomics* *8*, 59-66.

El Kennani, S., Adrait, A., Shaytan, A.K., Khochbin, S., Bruley, C., Panchenko, A.R., Landsman, D., Pflieger, D., and Govin, J. (2017). MS_HistoneDB, a manually curated resource for proteomic analysis of human and mouse histones. *Epigenetics & chromatin* *10*, 2.

Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schubeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology* *20*, 868-875.

Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C.L., and Skoultchi, A.I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* *123*, 1199-1212.

Fang, J., Chen, T., Chadwick, B., Li, E., and Zhang, Y. (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *The Journal of biological chemistry* *279*, 52812-52815.

Fantz, D.A., Hatfield, W.R., Horvath, G., Kistler, M.K., and Kistler, W.S. (2001). Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biology of reproduction* *64*, 425-431.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* *421*, 448-453.

Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2004). In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *Journal of andrology* *25*, 811-818.

Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C.D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology* *15*, 172-183.

Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*.

Flynn, E.M., Huang, O.W., Poy, F., Oppikofer, M., Bellon, S.F., Tang, Y., and Cochran, A.G. (2015). A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and Crotonyllysine Histone Peptide Modifications. *Structure (London, England : 1993)* *23*, 1801-1814.

Foltz, D.R., Jansen, L.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., 3rd, 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.

Fournier, A., Sasai, N., Nakao, M., and Defossez, P.A. (2012). The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Briefings in functional genomics* *11*, 251-264.

Franklin, R.E., and Gosling, R.G. (1953). Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* *172*, 156-157.

Fromental-Ramain, C., Ramain, P., and Hamiche, A. (2017). The Drosophila DAXX-Like Protein (DLP) Cooperates with ASF1 for H3.3 Deposition and Heterochromatin Formation. *Molecular and cellular biology* *37*.

Gamble, M.J., and Kraus, W.L. (2010). Multiple facets of the unique histone variant macroH2A: from genomics to cell biology. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* *9*, 2568-2574.

Gardiner-Garden, M., Ballesteros, M., Gordon, M., and Tam, P.P. (1998). Histone- and protamine-DNA association: conservation of different patterns within the beta-globin domain in human sperm. *Molecular and cellular biology* *18*, 3350-3356.

Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E.M., and Schmid, C.W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science (New York, N.Y.)* *236*, 962-964.

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

Gaucher, J., Reynoird, N., Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2010). From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *The FEBS journal* *277*, 599-604.

Gautier, T., Abbott, D.W., Molla, A., Verdel, A., Ausio, J., and Dimitrov, S. (2004). Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO reports* *5*, 715-720.

Germond, J.E., Bellard, M., Oudet, P., and Chambon, P. (1976). Stability of nucleosomes in native and reconstituted chromatins. *Nucleic acids research* *3*, 3173-3192.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews. Genetics* *10*, 94-108.

Godde, J.S., and Ura, K. (2008). Cracking the enigmatic linker histone code. *Journal of biochemistry* *143*, 287-293.

Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual review of biochemistry* *74*, 481-514.

Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science (New York, N.Y.)* *311*, 395-398.

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. *The Journal of biological chemistry* *281*, 37888-37892.

Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., *et al.* (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *The Journal of cell biology* *176*, 283-294.

Gowher, H., and Jeltsch, A. (2018). Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. *Biochemical Society transactions* *46*, 1191-1202.

Gowher, H., Stockdale, C.J., Goyal, R., Ferreira, H., Owen-Hughes, T., and Jeltsch, A. (2005). De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases. *Biochemistry* *44*, 9899-9904.

Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006). The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing [corrected] facultative heterochromatin [corrected] following meiosis. *Molecular and cellular biology* *26*, 5394-5405.

Gregoretti, I.V., Lee, Y.M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology* *338*, 17-31.

Grewal, S.I., and Elgin, S.C. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* *447*, 399-406.

Grigoryev, S.A., Arya, G., Correll, S., Woodcock, C.L., and Schlick, T. (2009). Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 13317-13322.

Grimes, S.R., Wilkerson, D.C., Noss, K.R., and Wolfe, S.A. (2003). Transcriptional control of the testis-specific histone H1t gene. *Gene* *304*, 13-21.

Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* *389*, 349-352.

Guillemette, B., and Gaudreau, L. (2006). Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* *84*, 528-535.

Hada, M., Masuda, K., Yamaguchi, K., Shirahige, K., and Okada, Y. (2017). Identification of a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis. *Scientific reports* *7*, 46228.

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.

Han, J., Zhou, H., Li, Z., Xu, R.M., and Zhang, Z. (2007). Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by RTT109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity. *The Journal of biological chemistry* *282*, 28587-28596.

Hassan, A.H., Prochasson, P., Neely, K.E., Galasinski, S.C., Chandy, M., Carrozza, M.J., and Workman, J.L. (2002). Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes. *Cell* *111*, 369-379.

Hayashi, K., Yoshida, K., and Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* *438*, 374-378.

Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sele, B., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2000). Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *European journal of cell biology* *79*, 950-960.

Hergeth, S.P., and Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO reports* *16*, 1439-1453.

Hershey, A.D., and Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology* *36*, 39-56.

Hewish, D.R., and Burgoyne, L.A. (1973). Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochemical and biophysical research communications* *52*, 504-510.

Holbert, M.A., and Marmorstein, R. (2005). Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. *Current opinion in structural biology* *15*, 673-680.

Hoyer-Fender, S., Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (2000). Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Experimental cell research* *258*, 254-260.

Huang, H., Sabari, B.R., Garcia, B.A., Allis, C.D., and Zhao, Y. (2014). SnapShot: histone modifications. *Cell* *159*, 458-458.e451.

Husain, A., and Jeffries, M.A. (2017). Epigenetics and Bone Remodeling. *Current osteoporosis reports* *15*, 450-458.

Ishibashi, T., Li, A., Eirin-Lopez, J.M., Zhao, M., Missiaen, K., Abbott, D.W., Meistrich, M., Hendzel, M.J., and Ausio, J. (2010). H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic acids research* *38*, 1780-1789.

Iuso, D., Czernik, M., Toschi, P., Fidanza, A., Zacchini, F., Feil, R., Curtet, S., Buchou, T., Shiota, H., Khochbin, S., *et al.* (2015). Exogenous Expression of Human Protamine 1 (hPrm1) Remodels Fibroblast Nuclei into Spermatid-like Structures. *Cell reports* *13*, 1765-1771.

Izzo, A., Kamieniarz-Gdula, K., Ramirez, F., Noureen, N., Kind, J., Manke, T., van Steensel, B., and Schneider, R. (2013). The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. *Cell reports* *3*, 2142-2154.

Izzo, A., Kamieniarz, K., and Schneider, R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biological chemistry* *389*, 333-343.

Jang, C.W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D., and Magnuson, T. (2015). Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. *Genes & development* *29*, 1377-1392.

Jason, L.J., Moore, S.C., Lewis, J.D., Lindsey, G., and Ausio, J. (2002). Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *24*, 166-174.

Jayaramaiah Raja, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2005). Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus. *Molecular and cellular biology* *25*, 6165-6177.

Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T.P., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., Nellen, W., Schaefer, M., and Helm, M. (2017). Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA biology* *14*, 1108-1123.

Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes & development* *21*, 1519-1529.

Johnson, M.L., Wang, R., and Sperry, A.O. (2018). Novel localization of Aurora A kinase in mouse testis suggests multiple roles in spermatogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* *503*, 51-55.

Kareta, M.S., Botello, Z.M., Ennis, J.J., Chou, C., and Chedin, F. (2006). Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *The Journal of biological chemistry* *281*, 25893-25902.

Kebede, A.F., Nieborak, A., Shahidian, L.Z., Le Gras, S., Richter, F., Gomez, D.A., Baltissen, M.P., Meszaros, G., Magliarelli, H.F., Taudt, A., *et al.* (2017). Histone propionylation is a mark of active chromatin. *Nature structural & molecular biology* *24*, 1048-1056.

Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J.A., Bienz, M., and Muller, J. (1998). dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science (New York, N.Y.)* *282*, 1897-1900.

Khadake, J.R., and Rao, M.R. (1995). DNA- and chromatin-condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec; H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry* *34*, 15792-15801.

Khochbin, S. (2001). Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* *271*, 1-12.

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* *116*, 259-272.

Kimmins, S., Crosio, C., Kotaja, N., Hirayama, J., Monaco, L., Hoog, C., van Duin, M., Gossen, J.A., and Sassone-Corsi, P. (2007). Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* *21*, 726-739.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* *31*, 89-97.

Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* *502*, 472-479.

Kossel, A. (1884). Uber einen peptonartigen bestandteil des zellkerns. *Z Physiol Che* *4*.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.

Krause, C.D., Yang, Z.H., Kim, Y.S., Lee, J.H., Cook, J.R., and Pestka, S. (2007). Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacology & therapeutics* *113*, 50-87.

Krogan, N.J., Keogh, M.C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O.W., Ding, H., Haw, R.A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular cell* *12*, 1565-1576.

Kwon, Y.K., and Hecht, N.B. (1993). Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Molecular and cellular biology* *13*, 6547-6557.

Laberge, R.M., and Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biology of reproduction* *73*, 289-296.

Lawrence, M., Daujat, S., and Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in genetics : TIG* 32, 42-56.

Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G.B., and Boissonneault, G. (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biology of reproduction* 78, 324-332.

Levchenko, V., Jackson, B., and Jackson, V. (2005). Histone release during transcription: displacement of the two H2A-H2B dimers in the nucleosome is dependent on different levels of transcription-induced positive stress. *Biochemistry* 44, 5357-5372.

Levene, P. (1919). The structure of yeast nucleic acid. *The Journal of biological chemistry* 40, 415– 424.

Li, A., Eirin-Lopez, J.M., and Ausio, J. (2005a). H2AX: tailoring histone H2A for chromatin-dependent genomic integrity. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 83, 505-515.

Li, A., Maffey, A.H., Abbott, W.D., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, A.O., and Ausio, J. (2005b). Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* 44, 2529-2535.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.

Li, Y., Sabari, B.R., Panchenko, T., Wen, H., Zhao, D., Guan, H., Wan, L., Huang, H., Tang, Z., Zhao, Y., *et al.* (2016). Molecular Coupling of Histone Crotonylation and Active Transcription by AF9 YEATS Domain. *Molecular cell* 62, 181-193.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science (New York, N.Y.)* 293, 2453-2455.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Luk, E., Vu, N.D., Patteson, K., Mizuguchi, G., Wu, W.H., Ranjan, A., Backus, J., Sen, S., Lewis, M., Bai, Y., *et al.* (2007). Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ. *Molecular cell* 25, 357-368.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nature cell biology* 13, 1161-1169.

Lusser, A., and Kadonaga, J.T. (2004). Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nature methods* 1, 19-26.

Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature reviews. Genetics* 19, 81-92.

Maison, C., and Almouzni, G. (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 296-304.

Mali, P., Kaipia, A., Kangasniemi, M., Toppari, J., Sandberg, M., Hecht, N.B., and Parvinen, M. (1989). Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reproduction, fertility, and development* 1, 369-382.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nature structural biology* 10, 882-891.

Manohar, M., Mooney, A.M., North, J.A., Nakkula, R.J., Picking, J.W., Edon, A., Fishel, R., Poirier, M.G., and Ottesen, J.J. (2009). Acetylation of histone H3 at the nucleosome dyad alters DNA-histone binding. *The Journal of biological chemistry* 284, 23312-23321.

Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2808-2813.

Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 838-849.

Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* 80, 487-498.

Mashoodh, R., and Ferguson-Smith, A.C. (2018). Dad's diet - smRNA methylation signatures in sperm pass on disease risk. *Nature reviews. Endocrinology* 14, 446-447.

McGraw, S., Morin, G., Vigneault, C., Leclerc, P., and Sirard, M.A. (2007). Investigation of MYST4 histone acetyltransferase and its involvement in mammalian gametogenesis. *BMC developmental biology* *7*, 123.

Meetei, A.R., Ullas, K.S., Vasupradha, V., and Rao, M.R. (2002). Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry* *41*, 185-195.

Meistrich, M.L., Bucci, L.R., Trostle-Weige, P.K., and Brock, W.A. (1985). Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes. *Developmental biology* *112*, 230-240.

Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* *111*, 483-488.

Meistrich, M.L., Trostle-Weige, P.K., Lin, R., Bhatnagar, Y.M., and Allis, C.D. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular reproduction and development* *31*, 170-181.

Mendel, G. (1866). Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn Bd. IV für das Jahr Abhandlungen*, 3-47.

Messner, S., and Hottiger, M.O. (2011). Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in cell biology* *21*, 534-542.

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. *Biology of reproduction* *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. *Biology of reproduction* *84*, 900-909.

Miescher, F. (1871). Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* *4*, 441-460.

Molaro, A., Young, J.M., and Malik, H.S. (2018). Evolutionary origins and diversification of testis-specific short histone H2A variants in mammals. *Genome research* *28*, 460-473.

Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Hery, P., Curtet, S., *et al.* (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes & development* *27*, 1680-1692.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics* *14 Spec No 1*, R47-58.

Morgan, T.H. (1911). RANDOM SEGREGATION VERSUS COUPLING IN MENDELIAN INHERITANCE. *Science (New York, N.Y.)* *34*, 384.

Moriniere, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Curtet, S., Vitte, A.L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., *et al.* (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* *461*, 664-668.

Mosammaparast, N., Ewart, C.S., and Pemberton, L.F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *The EMBO journal* *21*, 6527-6538.

Musselman, C.A., Lalonde, M.E., Cote, J., and Kutateladze, T.G. (2012). Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology* *19*, 1218-1227.

Nair, M., Nagamori, I., Sun, P., Mishra, D.P., Rheaume, C., Li, B., Sassone-Corsi, P., and Dai, X. (2008). Nuclear regulator Pygo2 controls spermiogenesis and histone H3 acetylation. *Developmental biology* *320*, 446-455.

Narlikar, G.J., Sundaramoorthy, R., and Owen-Hughes, T. (2013). Mechanisms and functions of ATP-dependent chromatin-remodeling enzymes. *Cell* *154*, 490-503.

Nekrasov, M., Amrichova, J., Parker, B.J., Soboleva, T.A., Jack, C., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2012). Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. *Nature structural & molecular biology* *19*, 1076-1083.

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 (Austin, Tex.)* *4*, 431-438.

Nesterova, T.B., Mermoud, J.E., Hilton, K., Pehrson, J., Surani, M.A., McLaren, A., and Brockdorff, N. (2002). Xist expression and macroH2A1.2 localisation in mouse primordial and pluripotent embryonic germ cells. *Differentiation; research in biological diversity* 69, 216-225.

Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E., *et al.* (2001). Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412, 561-565.

Okada, Y., Scott, G., Ray, M.K., Mishina, Y., and Zhang, Y. (2007). Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 450, 119-123.

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.

Olins, A.L., and Olins, D.E. (1974). Spheroid chromatin units (v bodies). *Science (New York, N.Y.)* 183, 330-332.

Olins, D.E., and Olins, A.L. (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 809-814.

Oudet, P., Gross-Bellard, M., and Chambon, P. (1975). Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 4, 281-300.

Pachov, G.V., Gabdouliline, R.R., and Wade, R.C. (2011). On the structure and dynamics of the complex of the nucleosome and the linker histone. *Nucleic acids research* 39, 5255-5263.

Padavattan, S., Shinagawa, T., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Ishii, S., and Kumarevel, T. (2015). Structural and functional analyses of nucleosome complexes with mouse histone variants TH2a and TH2b, involved in reprogramming. *Biochemical and biophysical research communications* 464, 929-935.

Padavattan, S., Thiruselvam, V., Shinagawa, T., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Ishii, S., and Kumarevel, T. (2017). Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. *Biophysical chemistry* 221, 41-48.

Palmer, D.K., O'Day, K., and Margolis, R.L. (1990). The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* 100, 32-36.

Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D.X., Peng, C., Tan, M., Dai, L., Xie, Z., Zhang, Y., Zwaans, B.M., Skinner, M.E., *et al.* (2013). SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Molecular cell* 50, 919-930.

Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science (New York, N.Y.)* 257, 1398-1400.

Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., *et al.* (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323-337.

Pittoggi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrossi, F., Giordano, R., Magnano, A.R., Lorenzini, R., Lavia, P., and Spadafora, C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *Journal of cell science* 112 (Pt 20), 3537-3548.

Platz, R.D., Meistrich, M.L., and Grimes, S.R., Jr. (1977). Low-molecular-weight basic proteins in spermatids. *Methods in cell biology* 16, 297-316.

Poot, R.A., Bozhenok, L., van den Berg, D.L., Steffensen, S., Ferreira, F., Grimaldi, M., Gilbert, N., Ferreira, J., and Varga-Weisz, P.D. (2004). The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nature cell biology* 6, 1236-1244.

Pradeepa, M.M., Nikhil, G., Hari Kishore, A., Bharath, G.N., Kundu, T.K., and Rao, M.R. (2009). Acetylation of transition protein 2 (TP2) by KAT3B (p300) alters its DNA condensation property and interaction with putative histone chaperone NPM3. *The Journal of biological chemistry* 284, 29956-29967.

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. *Developmental cell* 19, 625-638.

Qian, C., and Zhou, M.M. (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63, 2755-2763.

Ramesh, S., Bharath, M.M., Chandra, N.R., and Rao, M.R. (2006). A K52Q substitution in the globular domain of histone H1t modulates its nucleosome binding properties. *FEBS letters* 580, 5999-6006.

Rao, B.J., Brahmachari, S.K., and Rao, M.R. (1983). Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *The Journal of biological chemistry* 258, 13478-13485.

Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1839, 155-168.

Rathke, C., Barckmann, B., Burkhard, S., Jayaramaiah-Raja, S., Roote, J., and Renkawitz-Pohl, R. (2010). Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *European journal of cell biology* 89, 326-338.

Raychaudhuri, N., Dubrulle, R., Orsi, G.A., Bagheri, H.C., Loppin, B., and Lehner, C.F. (2012). Transgenerational propagation and quantitative maintenance of paternal centromeres depends on Cid/Cenp-A presence in *Drosophila* sperm. *PLoS biology* 10, e1001434.

Reynoird, N., Schwartz, B.E., Delvecchio, M., Sadoul, K., Meyers, D., Mukherjee, C., Caron, C., Kimura, H., Rousseaux, S., Cole, P.A., *et al.* (2010). Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. *The EMBO journal* 29, 2943-2952.

Richardson, R.T., Batova, I.N., Widgren, E.E., Zheng, L.X., Whitfield, M., Marzluff, W.F., and O'Rand, M.G. (2000). Characterization of the histone H1-binding protein, NASP, as a cell cycle-regulated somatic protein. *The Journal of biological chemistry* 275, 30378-30386.

Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145-150.

Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 311, 532-537.

Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Current opinion in structural biology* 16, 336-343.

Rossetto, D., Avvakumov, N., and Cote, J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7, 1098-1108.

Roulland, Y., Ouarrhni, 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. *Molecular cell* 63, 674-685.

Rountree, M.R., Bachman, K.E., and Baylin, S.B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature genetics* 25, 269-277.

Russell, S.J., and LaMarre, J. (2018). Transposons and the PIWI pathway: genome defense in gametes and embryos. *Reproduction (Cambridge, England)* 156, R111-r124.

Sabari, B.R., Tang, Z., Huang, H., Yong-Gonzalez, V., Molina, H., Kong, H.E., Dai, L., Shimada, M., Cross, J.R., Zhao, Y., *et al.* (2015). Intracellular crotonyl-CoA stimulates transcription through p300-catalyzed histone crotonylation. *Molecular cell* 58, 203-215.

Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G.W. (2010). Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 19915-19920.

Sansom, O.J., Maddison, K., and Clarke, A.R. (2007). Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 4, 305-315.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.

Sasai, N., and Defossez, P.A. (2009). Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *The International journal of developmental biology* 53, 323-334.

Sawicka, A., and Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* 94, 2193-2201.

Saxe, J.P., and Lin, H. (2011). Small noncoding RNAs in the germline. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a002717.

Schagdarsurenjin, U., Paradowska, A., and Steger, K. (2012). Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nature reviews. Urology* 9, 609-619.

Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. (2007). The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development (Cambridge, England)* *134*, 3507-3515.

Sharma, U., Sun, F., Conine, C.C., Reichholf, B., Kukreja, S., Herzog, V.A., Ameres, S.L., and Rando, O.J. (2018). Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm. *Developmental cell* *46*, 481-494.e486.

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 (Cambridge, England)* *142*, 1287-1292.

Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L.M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., *et al.* (2014). Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* *14*, 217-227.

Shires, A., Carpenter, M.P., and Chalkley, R. (1975). New histones found in mature mammalian testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *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. *Biology of reproduction* *71*, 1220-1229.

Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R., and Peterson, C.L. (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science (New York, N.Y.)* *311*, 844-847.

Shomron, N., and Levy, C. (2009). MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. *Journal of biomedicine & biotechnology* *2009*, 594678.

Sin, H.S., Barski, A., Zhang, F., Kartashov, A.V., Nussenzweig, A., Chen, J., Andreassen, P.R., and Namekawa, S.H. (2012). RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes & development* *26*, 2737-2748.

Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2011). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nature structural & molecular biology* *19*, 25-30.

Soboleva, T.A., Parker, B.J., Nekrasov, M., Hart-Smith, G., Tay, Y.J., Tng, W.Q., Wilkins, M., Ryan, D., and Tremethick, D.J. (2017). A new link between transcriptional initiation and pre-mRNA splicing: The RNA binding histone variant H2A.B. *PLoS genetics* *13*, e1006633.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P.A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* *64*, 2390-2396.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.

Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., and Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *The Journal of biological chemistry* *279*, 27816-27823.

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. *Nature structural biology* *7*, 1121-1124.

Sutton, W.S. (1902). On the morphology of the chromosome group in *Brachystola magna*. *Biological Bulletin* *4*, 24-39.

Syed, S.H., Boulard, M., Shukla, M.S., Gautier, T., Travers, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2009). The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome. *Nucleic acids research* *37*, 4684-4695.

Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell research* *21*, 421-434.

Szulwach, K.E., and Jin, P. (2014). Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *36*, 107-117.

Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010). Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific

histone variant, human H3T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 10454-10459.

Tachiwana, H., 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.

Tachiwana, H., Osakabe, A., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2008). Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic acids research* *36*, 2208-2218.

Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* *116*, 51-61.

Tajima, S., Suetake, I., Takeshita, K., Nakagawa, A., and Kimura, H. (2016). Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. *Advances in experimental medicine and biology* *945*, 63-86.

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.

Tan, M., Peng, C., Anderson, K.A., Chhoy, P., Xie, Z., Dai, L., Park, J., Chen, Y., Huang, H., Zhang, Y., *et al.* (2014). Lysine glutarylation is a protein posttranslational modification regulated by SIRT5. *Cell metabolism* *19*, 605-617.

Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., *et al.* (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Molecular and cellular biology* *25*, 7107-7119.

Taverna, S.D., Coyne, R.S., and Allis, C.D. (2002). Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell* *110*, 701-711.

Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology* *14*, 1025-1040.

Torres-Padilla, M.E., Bannister, A.J., Hurd, P.J., Kouzarides, T., and Zernicka-Goetz, M. (2006). Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in the mouse oocyte and preimplantation embryos. *The International journal of developmental biology* *50*, 455-461.

Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Osley, M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *438*, 379-383.

Turner, B.M. (2005). Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nature structural & molecular biology* *12*, 110-112.

Turner, J.M., Burgoyne, P.S., and Singh, P.B. (2001). M31 and macroH2A1.2 colocalise at the pseudoautosomal region during mouse meiosis. *Journal of cell science* *114*, 3367-3375.

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 reports* *18*, 593-600.

Urahama, T., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., and Kurumizaka, H. (2014). Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* *70*, 444-449.

van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Posfai, E., Giele, M., Pelczar, P., Ramos, L., Wansink, D.G., van der Vlag, J., Peters, A.H., and de Boer, P. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nature genetics* *39*, 251-258.

van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Ramos, L., Giele, M., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2006). Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental biology* *298*, 458-469.

van der Heijden, G.W., Dieker, J.W., Derijck, A.A., Muller, S., Berden, J.H., Braat, D.D., van der Vlag, J., and de Boer, P. (2005). Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of development* *122*, 1008-1022.

Verdaasdonk, J.S., and Bloom, K. (2011). Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nature reviews. Molecular cell biology* *12*, 320-332.

Voss, A.K., and Thomas, T. (2018). Histone Lysine and Genomic Targets of Histone Acetyltransferases in Mammals. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *40*, e1800078.

Walport, L.J., Hopkinson, R.J., and Schofield, C.J. (2012). Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases. *Current opinion in chemical biology* *16*, 525-534.

Watson, J.D., and Crick, F.H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* *171*, 737-738.

Wilkins, M.H., Stokes, A.R., and Wilson, H.R. (1953). Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* *171*, 738-740.

Williams, K., Christensen, J., and Helin, K. (2011). DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? *EMBO reports* *13*, 28-35.

Witt, O., Albig, W., and Doenecke, D. (1996). Testis-specific expression of a novel human H3 histone gene. *Experimental cell research* *229*, 301-306.

Wu, F., Caron, C., De Robertis, C., Khochbin, S., and Rousseaux, S. (2008). Testis-specific histone variants H2AL1/2 rapidly disappear from paternal heterochromatin after fertilization. *The Journal of reproduction and development* *54*, 413-417.

Wu, J.Y., Ribar, T.J., Cummings, D.E., Burton, K.A., McKnight, G.S., and Means, A.R. (2000). Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nature genetics* *25*, 448-452.

Wu, X.Q., and Hecht, N.B. (2000). Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biology of reproduction* *62*, 720-725.

Wykes, S.M., and Krawetz, S.A. (2003). Conservation of the PRM1 --> PRM2 --> TNP2 domain. *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping* *14*, 359-367.

Xie, Z., Zhang, D., Chung, D., Tang, Z., Huang, H., Dai, L., Qi, S., Li, J., Colak, G., Chen, Y., *et al.* (2016). Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lysine beta-Hydroxybutyrylation. *Molecular cell* *62*, 194-206.

Yelick, P.C., Kwon, Y.H., Flynn, J.F., Borzorgzadeh, A., Kleene, K.C., and Hecht, N.B. (1989). Mouse transition protein 1 is translationally regulated during the postmeiotic stages of spermatogenesis. *Molecular reproduction and development* *1*, 193-200.

Yoshida, K., Muratani, M., Araki, H., Miura, F., Suzuki, T., Dohmae, N., Katou, Y., Shirahige, K., Ito, T., and Ishii, S. (2018). Mapping of histone-binding sites in histone replacement-completed spermatozoa. *Nature communications* *9*, 3885.

Yu, Y.E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C.R., Deng, J.M., Russell, L.D., Weil, M.M., Behringer, R.R., and Meistrich, M.L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 4683-4688.

Yuan, J., Adamski, R., and Chen, J. (2010). Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS letters* *584*, 3717-3724.

Zalensky, A.O., Breneman, J.W., Zalenskaya, I.A., Brinkley, B.R., and Bradbury, E.M. (1993). Organization of centromeres in the decondensed nuclei of mature human sperm. *Chromosoma* *102*, 509-518.

Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P., and Bradbury, E.M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (HTSH2B). Molecular cloning and characterization. *The Journal of biological chemistry* *277*, 43474-43480.

Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* *20*, 259-266.

Zhang, K., Chen, Y., Zhang, Z., and Zhao, Y. (2009). Identification and verification of lysine propionylation and butyrylation in yeast core histones using PTMap software. *Journal of proteome research* 8, 900-906.

Zhang, Q., Zeng, L., Zhao, C., Ju, Y., Konuma, T., and Zhou, M.M. (2016). Structural Insights into Histone Crotonyl-Lysine Recognition by the AF9 YEATS Domain. *Structure (London, England : 1993)* 24, 1606-1612.

Zhang, Z., Tan, M., Xie, Z., Dai, L., Chen, Y., and Zhao, Y. (2011). Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. *Nature chemical biology* 7, 58-63.

Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004). Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 38, 200-213.

Zhao, M., Shirley, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H., Weil, M.M., *et al.* (2001). Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and cellular biology* 21, 7243-7255.

ANNEXES

Le mystère de la disparition des histones au cours de la spermatogenèse

Sophie Barral, Yuichi Morozumi, Naghmeh Hoghoughi, Sophie Rousseaux, Saadi Khochbin

CNRS UMR 5309 ; Inserm, U1209 ; université Grenoble Alpes ; Institute for Advanced Biosciences, Grenoble, F-38700 France. saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr

L'empaquetage du génome mâle, un processus qui reste mystérieux

Le spermatozoïde est la seule cellule capable de survivre en dehors de l'organisme producteur. Il s'agit d'une cellule hautement spécialisée qui se prépare à quitter l'organe génital mâle et à survivre dans les voies génitales femelles, lieu de la fécondation. La mission du spermatozoïde est de transporter une copie du génome mâle jusqu'à l'ovocyte pour le livrer lors de la fusion gamétique. Le processus qui aboutit à la production des spermatozoïdes est connu sous le nom de spermatogenèse. La différenciation des cellules germinales mâles progénitrices comprend deux étapes principales. La première implique la méiose au cours de laquelle le génome est initialement brassé puis divisé, aboutissant à la production de quatre cellules nommées spermatides, portant chacune une seule copie du génome. Au cours de la deuxième étape, ou spermiogénèse, les gamètes mâles se préparent pour leur futur voyage à l'extérieur de l'organisme de production vers le lieu de fécondation. Lors de cette étape post-méiotique, les gamètes mâles sont le siège d'une véritable métamorphose à l'issue de laquelle ces cellules seront dotées d'un flagelle, indispensable pour la mobilité des futurs spermatozoïdes. Concomitamment, ils subissent une réorganisation spectaculaire et unique de leur génome. Le fait marquant de cette différenciation post-méiotique

est la disparition des nucléosomes¹, unités universelles d'organisation et d'empaquetage des génomes chez les eucaryotes.

La disparition des histones, les constituants des nucléosomes, au cours de la spermiogénèse et leur remplacement par des petites protéines basiques non-histones, les protéines de transition et les protamines ont été précédemment décrits [1]. Cette transformation globale de l'organisation du génome dans les cellules germinales mâles a comme objectif la compaction extrême de celui-ci avant le voyage du spermatozoïde afin d'assurer sa protection lors de cette période à risque pour son intégrité.

De nombreux travaux ont désormais montré que toute perturbation affectant le remplacement des histones aboutissait à une compaction défectueuse du génome dans le spermatozoïde et à une infertilité masculine. Le remplacement des histones est donc une étape critique pour la procréation et la perpétuation de l'espèce. Néanmoins, une question fondamentale reste ouverte : nous ne savons pas comment les histones sont dissociées de l'ADN et disparaissent, ni comment cette dissociation des histones est couplée à l'assemblage des protéines non-histones et à l'empaquetage du génome. En d'autres termes, l'ADN se structure autour des protamines et non plus des histones, mais nous ne compre-

nons pas comment les nucléosomes sont remplacés par les nucléoprotamines.

La vision classique et largement documentée est que les histones sont initialement remplacées par des protéines dites « de transition » elles-mêmes substituées, à leur tour, par les protamines.

Malgré l'importance de ces questions, nous ne disposons d'aucune information quant à la compréhension des mécanismes qui régissent ces bouleversements dans l'organisation du génome. Or la connaissance des mécanismes sous-jacents est susceptible d'influencer non seulement la biologie de la chromatine et l'épigénétique, mais aussi de nous éclairer sur les éléments déterminants d'une fertilité masculine optimale.

Le remplacement des histones : par qui et comment ?

Malgré l'identification et la caractérisation des protéines non-histones qui remplacent les histones au cours de la spermiogénèse, la relation fonctionnelle entre histones, protéines de transition et protamines est longtemps restée obscure. L'observation de l'apparition successive des protéines de transition puis des protamines avait initialement suggéré une action séquentielle de celles-ci dans la réorganisation du génome. Lors d'une première étape, les histones étaient remplacées par les protéines de transition et dans une deuxième phase, les protamines chassaient les protéines de transition et dirigeaient la compaction finale du génome [2,3]. Cependant, des observations ont semé le doute sur

¹ Le nucléosome est composé d'un fragment d'ADN (environ 147 paires de bases) enroulé autour d'un octamère d'histones.

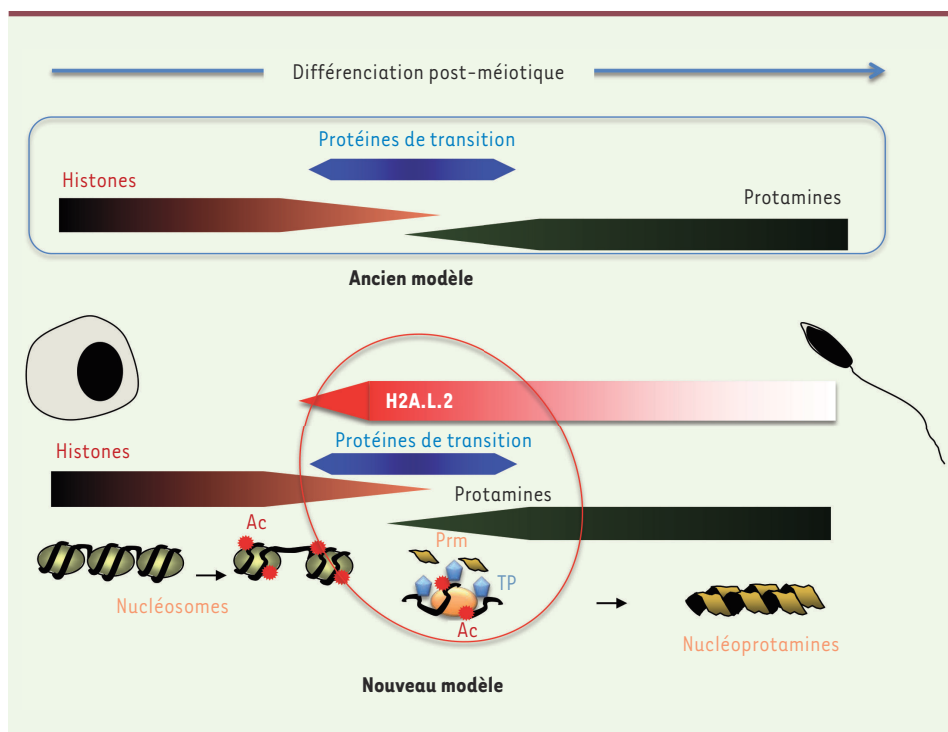


Figure 1. Nouveau modèle résumant les étapes impliquées dans le remplacement des histones au cours de la spermatogenèse. Le schéma général du remplacement des histones largement répandu proposait l'action, par étapes successives et distinctes, des protéines de transition (TP) remplaçant les histones, puis des protamines (Prm) se substituant aux protéines de transition (modèle ancien, partie supérieure). Nos travaux [8] mettent en évidence une étape supplémentaire qui correspond à la synthèse concomitante du variant d'histone H2A.L.2 et des protéines de transition. Leur action simultanée facilite l'incorporation des protamines. Ce nouveau modèle est présenté dans la partie inférieure de la figure. Ac : acétylation.

cette hypothèse du remplacement des histones en deux étapes successives, l'ordre d'apparition des protéines remplaçant les histones ne semblant pas aussi clair qu'initialement pensé [3]. En effet, les protéines de transition, les protamines et les histones peuvent être simultanément détectées dans la même cellule [4]. D'autres expériences, notamment la génération de souris déficientes (*double Knock Out*) pour les deux gènes codant les protéines de transition, ont rendu la situation encore plus confuse. Ces travaux ont montré qu'en l'absence totale des protéines de transition, le remplacement des histones se produisait [4-6]. Cette dernière observation pose donc la question essentielle du rôle des protéines de transition dans le processus de remplacement des histones. Quel est leur rôle ? Les expériences de double extinction des gènes les codant ont montré que ces protéines sont nécessaires pour une compaction efficace du génome par les protamines ainsi que pour la maturation de la protamine 2 (Prm2). La protamine 2 est synthétisée sous la forme d'une pré-protéine qui subit un clivage pro-

téolytique dans sa partie N-terminale lors de son assemblage. L'accumulation du précurseur pré-Prm2 en l'absence des protéines de transition indique un rôle pour ces protéines dans le contrôle de l'assemblage des protamines. Cependant, aucune donnée publiée ne laissait entrevoir quelle pouvait être la relation fonctionnelle entre les protéines de transition et les protamines.

L'invasion du nucléosome : une histone jouant le rôle de « cheval de Troie »

La découverte en 2007 [7], d'une série de variants d'histones de type H2B et H2A exprimés spécifiquement dans les cellules spermatogéniques a permis de reconsidérer le remplacement des histones sous un nouveau jour. En effet, parmi ces histones, un variant de H2A nommé H2A.L.2 est exprimé tardivement, pratiquement en même temps que les protéines de transition, et de surcroît dans les mêmes cellules que celles-ci [8]. Ces observations ont désigné H2A.L.2 comme un facteur particulièrement intéressant, car il s'agit d'une histone synthétisée au moment même du remplacement général des histones.

Cette situation inattendue suggérait que cette histone pouvait jouer un rôle dans la transformation des nucléosomes et plus précisément, qu'elle pouvait être un nouvel acteur dans le jeu d'interactions entre les protéines de transition et les protamines. L'observation de la spermatogenèse des souris invalidées pour le gène codant H2A.L.2 a considérablement renforcé cette hypothèse. Ces souris ont en effet exactement le même phénotype que celles doublement déficientes pour les gènes codant les protéines de transition, à savoir une perturbation de la maturation de la protéine pré-Prm2, une compaction défectueuse du génome dans les spermatozoïdes et une infertilité des mâles. Ces observations suggèrent qu'en l'absence de l'histone H2A.L.2, malgré une synthèse normale, les protéines de transition restent non-fonctionnelles. Ainsi, l'absence du variant H2A.L.2 serait donc fonctionnellement équivalente à la carence en protéines de transition. Autrement dit, l'histone H2A.L.2 serait nécessaire aux protéines de transition pour assurer leur fonction. Une série d'expériences visant à vérifier cette hypothèse a mis en évidence le

mécanisme par lequel l'histone H2A.L.2 facilite l'action des protéines de transition : l'incorporation de l'histone H2A.L.2 ouvre le nucléosome, ce qui permet aux protéines de transition d'être chargées sur la chromatine et d'interagir avec les protamines tout en assurant la maturation du précurseur pré-Prm2. En l'absence de H2A.L.2, les protéines de transition ne peuvent pas entrer efficacement en interaction avec la chromatine et s'agrègent donc en piégeant une fraction des protamines qui ne peuvent pas être maturées ni assemblées. La conséquence de cette situation est un sous-dosage de protamines au niveau de l'ADN et une compaction défectueuse du génome [8]. L'histone H2A.L.2 se comporte donc comme un cheval de Troie : une fois incorporée au sein du nucléosome, ce variant d'histone ouvre la structure et permet l'invasion du nucléosome par des protéines non-histones.

Conclusion

L'étude fonctionnelle de l'histone H2A.L.2 a permis de mieux comprendre le phénomène mystérieux de la disparition à grande échelle des histones, qui survient au cours de la phase post-méiotique de la spermatogenèse. La stratégie utilisée par la nature est de favoriser un changement structural du nucléosome et une déstabilisation de celui-ci à l'échelle du génome par la

synthèse d'un variant d'histone de type H2A produit en même temps que les protéines spécialisées qui remplacent les histones. Nous savons néanmoins que cette étape à elle seule n'est pas suffisante pour assurer cette transformation du nucléosome. Le remplacement se produit dans un contexte où le nucléosome doit préalablement être hyper-acétylé [9,10], (→) un événement qui pourrait agir en favorisant l'échange des molécules H2A déjà présentes dans le nucléosome avec le variant H2A.L.2 néo-synthétisé, par un accroissement de la dynamique chromatinienne.

En conclusion, ces nouvelles données incitent à reconsidérer le scénario classique impliquant l'action successive des protéines de transition puis des protamines. En effet, l'incorporation de l'histone H2A.L.2 accélère la transformation des nucléosomes en induisant l'action presque simultanée des protéines de transition et des protamines. Ainsi, l'incorporation du variant d'histone H2A.L.2 initie la transformation des nucléosomes et correspond à une nouvelle étape, antérieure au remplacement des histones (Figure 1). ♦

The mystery of histone disappearance during spermatogenesis

(→) Voir la Nouvelle de S. Rousseaux et al., m/s n° 2, février 2010, page 130

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Gaucher J, Reynold N, Montellier E, et al. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 2010 ; 277 : 599-604.
2. Lewis JD, Abbott DW, Ausio J. A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 2003 ; 81 : 131-40.
3. Meistrich ML, Mahapatra B, Shirley CR, et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003 ; 111 : 483-8.
4. Zhao M, Shirley CR, Mounsey S, et al. Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1- and Tnp2 mutations. *Biol Reprod* 2004 ; 71 : 1016-25.
5. Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, et al. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* 2004 ; 71 : 1220-9.
6. Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, et al. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 2004 ; 38 : 200-13.
7. Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, et al. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007 ; 176 : 283-94.
8. Barral S, Morozumi Y, Tanaka H, et al. Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells. *Mol Cell* 2017 ; 66 : 89-101.
9. Goudarzi A, Shiota H, Rousseaux S, et al. Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J Mol Biol* 2014 ; 426 : 3342-9.
10. Rousseaux S, Petosa C, Müller CW, et al. Du nouveau dans la compréhension de la reprogrammation postméiotique du génome mâle. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 130-2

Bon de commande

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand, 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2010

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

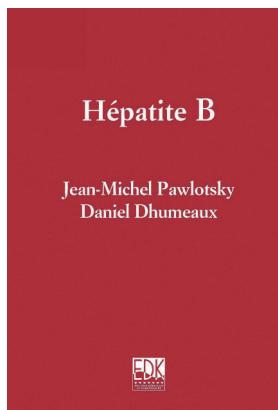
Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |



ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages

JB Special Review—Chromatin Structure and Function: Biological Implications in Epigenetics

Histone variants: essential actors in male genome programming

Received September 6, 2017; accepted October 13, 2017; published online November 20, 2017

**Naghmeh Houghghi, Sophie Barral,
Alexandra Vargas, Sophie Rousseaux and
Saadi Khochbin***

CNRS UMR 5309, Inserm, U1209, Université Grenoble Alpes,
Institut Albert Bonniot, Grenoble F-38700, France

*Saadi Khochbin, Chromatin and Cell Signaling, Institute for
Advanced Bioscience, Domaine de la Merci, La Tronche 38706,
France. Tel: +33 4 76 54 95 83, Fax: 33 4 76 54 95 95, email:
saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr

Prior to its transmission to the offspring, the male genome has to be tightly compacted. A genome-scale histone eviction and the subsequent repackaging of DNA by protamines (Prms) direct this essential genome condensation step. The requirement for male germ cells to undergo such a dramatic and unique genome reorganization explains why these cells express the largest number of histone variants, including many testis-specific ones. Indeed, an open chromatin, nucleosome instability and a facilitated process of histone disassembly are direct consequences of the presence of these histone variants in the chromatin of male germ cells. These histone-induced changes in chromatin first control a stage-specific gene expression program and then directly mediate the histone-to-Prm transition process. This review aims at summarizing and discussing a series of recent functional studies of male germ cell histone variants with a focus on their impact on the process of histone eviction and male genome compaction.

Keywords: H2A.L.2; H3.3; protamines; TH2B; transition proteins.

Spermatogenesis is a differentiation process which produces mature spermatozoa, which will deliver the male genome to the oocytes in the female organism. Spermatogenic cells are continuously produced by an asymmetrical division of progenitor cells, named spermatogonia. These cells on the one hand maintain the stem cell population and on the other hand generate meiotic cells, or spermatocytes, which themselves undergo two successive meiotic divisions. The second meiotic division produces haploid cells known as spermatids. The early post-meiotic spermatids are called round spermatids. These cells activate a specific gene expression program that will direct their transformation into spermatozoa, through a series of reorganizations of their various cellular constituents. These reorganizations mostly take place in the subsequent stages of post-meiotic differentiation, in cells known as elongating and

condensing spermatids. Large-scale histone post-translational modifications (PTMs), essentially histone acetylation, signal and regulate the initiation of the process of histone-to-protamine (Prm) replacement in elongating spermatids (1–3).

Although still largely unexplored, this genome-wide replacement of histones by Prms is the most dramatic of the known processes involved in chromatin remodelling, genome reorganization and reprogramming (4). In addition to Prms, early investigations also identified other basic non-histone proteins that appear at the time of histone replacement but, in contrast to Prms, totally disappear afterwards (5). These proteins have been named transition proteins (TPs). The early studies of sperm and testis histones in various species also revealed the existence of histones that are only expressed in male germ cells (6). Indeed testis-specific histones were among the first histone variants identified. Additionally, spermatogenic cells not only express a large number of various testis-specific histones, but are also characterized by the presence of some histone variants, which almost entirely replace their canonical counterparts (Fig. 1). Therefore, prior to histone replacement, spermatogenic cell chromatin accumulates unique germline histones in replacement of their canonical counterparts. Histone variants, including the testis-specific ones, will eventually be replaced by Prms.

An open question is whether and how this large number of histone variants, individually and collectively, are involved in directing the spermatogenic gene expression program and in preparing chromatin for the final histone-to-Prm transition. Additionally, it is critical to decipher the individual contribution of each of the specific or generalist histone variants to these unique events. Another related question is the interplay between histones, TPs and Prms in the process of histone eviction. Most of these questions have remained obscure until recently. It is only during the last few years, a long time after the discovery of the first testis-specific histone variants that several pilot studies have started to shed light on the role of histone variants in the stepwise programming of the male genome, in the eviction of histones and in the final genome compaction.

Here, we summarize these recent advances in our knowledge of the role of histone variants, specifically testis-specific histone variants, in spermatogenesis, with a specific focus on the process of genome-wide histone eviction and Prm assembly.

TH2B

One of the first histone variants discovered belongs to the H2B family and was named TH2B (TSH2B, according to the new nomenclature). Indeed, the protein was

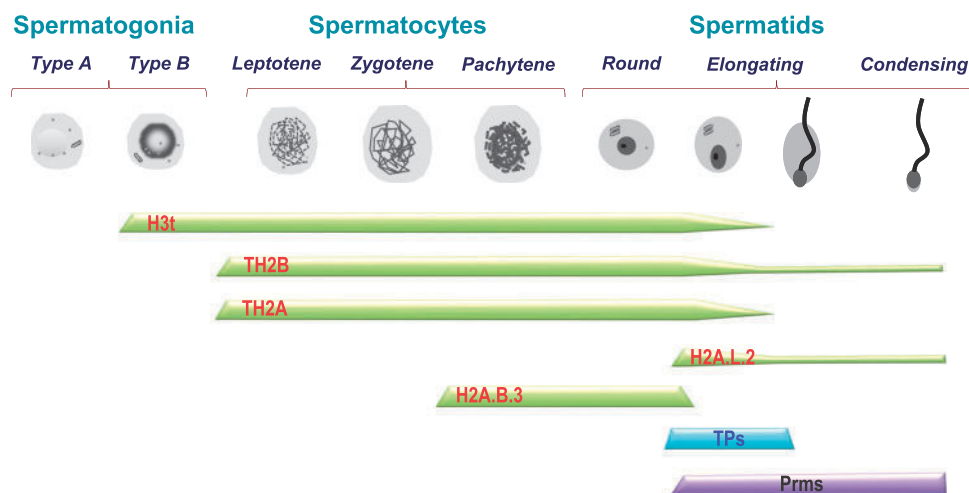


Fig. 1 Differentiation-dependent expression of testis-specific histone variants during spermatogenesis. Detailed studies of the indicated histone variants established the precise timing of their expression during the spermatogenic cells differentiation. A fraction of TH2B and H2A.L.2 escape the general histone-to-Prm transition and remains in the mature sperm nuclei.

reported in 1975 (7) as a H2B histone expressed in the testes of several mammalian species.

The first insight into a potential specific function of this H2B variant came from a structural study showing that a histone octamer containing TH2B presents an increased instability compared to a canonical octamer (8). Additional studies showed that TH2B is also present during late spermatogenesis and at the time of histone removal, and that it remains in the transitional structures that are generated during the transformation of nucleosomes into nucleoprotamines (9).

The first functional studies of TH2B in its physiological setting, during spermatogenic cell differentiation, were published only 38 years after its identification, following the generation of different mouse models (10). These studies show that, from the onset of meiosis, TH2B massively replaces H2B, and that most of the genome becomes covered by TH2B-containing nucleosomes. However, surprisingly, in the total absence of TH2B, spermatogenesis seems to occur completely normally, and there is no effect on male fertility.

The investigation of spermatogenesis in TH2B-less mice revealed that, in fact, in the absence of TH2B, a compensatory mechanism leads to the accumulation of H2B, thereby physically compensating the lack of TH2B by an increased production of H2B and allowing the formation of nucleosomes at the genome scale.

This observation raised the question of the functional utility of TH2B during spermatogenesis. Indeed, if H2B can efficiently replace TH2B, then what could be the specific role of TH2B?

The answer to this question came from the comparative quantitative proteomic analysis of histone PTMs between TH2B-less and wild-type spermatogenic cells. These data show that, in the absence of TH2B, nucleosomes undergo an epigenetic reprogramming to become less stable. Indeed, in TH2B-less nucleosomes, histones gain several chemical modifications that, without any

exception, are all located at structurally strategic positions and present the potential to weaken the overall stability of the nucleosomes. These are H3K122 and H4K77 crotonylation. These two lysines are in contact with DNA and the addition of a bulky crotonyl group with its charge neutralizing capacity is able to affect nucleosome stability. The other PTMs found in TH2B-less nucleosomes are methylations at H4R35, H4R55, H4R67 and H2BR72. Remarkably all these residues are involved in histone–DNA and histone–histone interactions and their methylation has the potential to weaken these intranucleosomal interactions.

Hence, these investigations indicate that the compensatory mechanism that is activated after the loss of TH2B encompasses not only an over-expression of the canonical H2B, but also specific modifications of histones with nucleosomal destabilizing effects. In other words, the primary function of TH2B could be to generate less stable nucleosomes at the whole genome scale, which would lower the energy necessary for the cells to undertake chromosome-wide (sex chromosome inactivation) and genome-wide histone exchanges in later stages.

The nucleosome destabilizing property of TH2B was later confirmed through a series of structural studies. Compared to H2B, the presence of TH2B in a nucleosome leads to the loss of a hydrogen bond with H4 (11). Other structural works considering TH2B and TH2A (an H2A variant co-expressed with TH2B) showed even more dramatic effects on the nucleosomes stability, with significantly reduced histone–DNA contacts and modified histone–histone interactions (12, 13).

TH2B was also found expressed in oocytes and to be assembled again on the paternal genome after fertilization before its total disappearance during later development (Fig. 2) (10, 14, 15). The use of TH2B–TH2A in cell reprogramming showed that their ectopic expression stimulates the reprogramming of somatic cells into

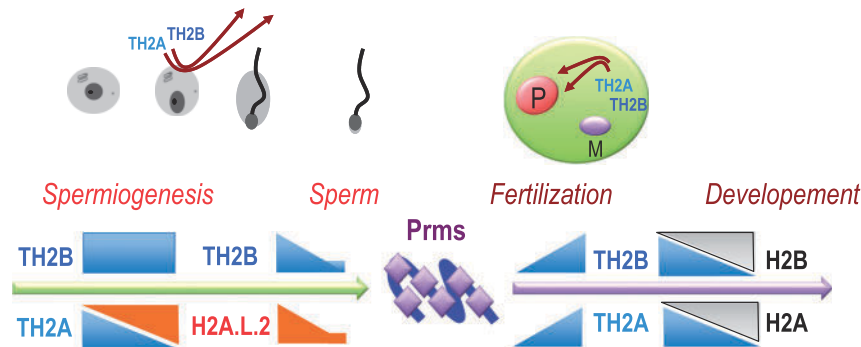


Fig. 2 The packaging cycles of the male genome with TH2A/TH2B. The histone variants TH2A and TH2B become the major histones in spermatogenic cells, until the replacement of TH2A by H2A.L.2, at the time of histone-to-Prm transition. A fraction of TH2B–H2A.L.2 dimer survives histone replacement. After fertilization, the removal of Prms is associated with the re-assembly of maternal TH2A–TH2B on the male genome. These histones will be entirely replaced by their somatic counterparts during early development. The schemes respectively represent maturing spermatids (left) and a fertilized egg with paternal (P) and maternal (M) genomes (right).

induced pluripotent stem cells, a property that could be related to the ability of these histones to create more accessible chromatin (14).

In contrast to TH2B-less situation, the knock-out of both TH2B and TH2A leads to an arrest of spermatogenesis during meiosis (16). However in this model, although the lack of TH2B induced a compensatory accumulation of H2B, as reported in the TH2B-less model (10), no H2A accumulation was observed (16). Since TH2A is also the main H2A in spermatogenic cells, in *Th2a/Th2b* KO spermatogenic cells, the absence of compensatory gain of H2A expression suggests a significant H2A under-dosage in these cells. The defects observed could therefore be due to an inappropriate chromatin structure and subsequent genome disorganization, rather than to a specific action of TH2A or TH2B (16). In agreement with this hypothesis, two recent reports showed that TH2A could be phosphorylated at the TH2A-specific Thr127 and that this phosphorylation is dispensable for normal spermatogenesis and male fertility (17, 18).

The animal models used to decipher TH2B functions also included mice that expressed a modified endogenous TH2B, bearing three tags at its C-terminal (10). Remarkably, although in these mice all the investigated events at the cellular and molecular levels, i.e. TH2B-tag assembly, transcription, meiosis, sex-chromosome inactivation, H2A.X phosphorylation and histone exchange, etc., occur normally in spermatogenic cells up to the appearance of elongating spermatids, an arrest of spermatogenesis is observed at the time of histone-to-Prm transition. This study demonstrated that TH2B-tag expressed in female animals could also sustain oocyte maturation and embryonic development with no detectable defects and leading to the generation of healthy adult mice (10).

Overall, these data show that the presence of a tag at the C-terminal end of TH2B, interferes very specifically and exclusively with defined and particular events that take place in elongating-condensing spermatids (10). Detailed observations indicated, that in these TH2B-tag expressing male germ cells, although TP and Prms

are produced, Prms are unable to replace histones leading to the accumulation of transitional structures following nucleosome disassembly. Further investigations are required to decipher the exact role of TH2B, and more specifically of its C-terminal region, in the final histone eviction.

H2A.L.2

In an attempt to identify histones that could facilitate the process of histone-to-Prm transition, surviving histones from spermatids undergoing histone replacement were purified and identified (9). This led to the identification of 5 new histone variants, two H2Bs and three H2As, which were respectively named H2B.L.1, H2B.L.2, H2A.L.1, H2A.L.2 and H2A.L.3 [please see their new nomenclature in (19, 20)]. Among these histones, H2A.L.2 presented all the criteria to be considered as a candidate histone variant involved in histone removal. Indeed, the protein is first detected in spermatids at the same time as TPs (9, 21). Additionally, H2A.L.2 along with TH2B was found in the H3/H4-less transitional structures, which were evidenced in condensing spermatids after extensive micrococcal nuclease (MNase) digestion. Finally, a fraction of H2A.L.2 remains in mature spermatozoa associated with the pericentric regions (9).

The generation of an H2A.L.2-less mouse model proved its critical role in the process of histone-to-Prm replacement. The molecular studies of spermatogenic cells lacking H2A.L.2 revealed its role in the incorporation of TPs onto chromatin. Additionally, a series of *in vitro* nucleosome reconstitution assays demonstrated that the incorporation of H2A.L.2 can drastically modify the structure of the corresponding nucleosome. A more 'open' H2A.L.2-containing nucleosome is able to load TPs, which invade the nucleosome without releasing the DNA. These TPs in turn buffer the incoming Prms and allow their assembly and the final histone eviction. TPs also mediate the processing of Prm2, which is produced as a pre-Prm2 protein (21). In fact the phenotype of H2A.L.2-less spermatogenic cells is very

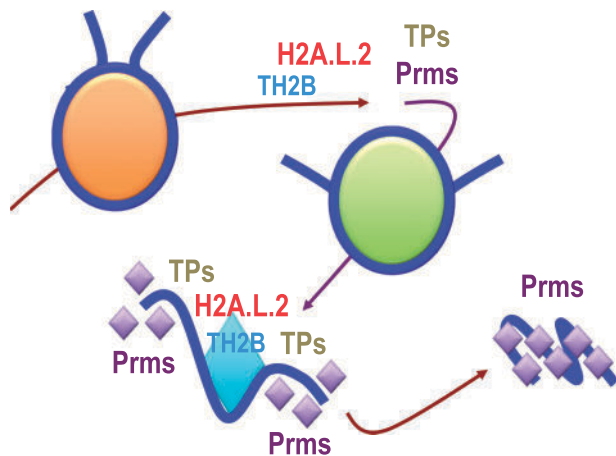


Fig. 3 Coordinate actions of histone variants, TPs and Prms in the process of histone-to-Prm replacement. The exchange of TH2B–TH2A by TH2B–H2A.L.2 opens the nucleosomes, allowing the loading of TPs that in turn direct a controlled replacement of histones, Prm assembly and genome compaction.

close to the phenotype of TP-less cells (22–24) suggesting that, in the absence of H2A.L.2, although TPs are produced, they remain non-functional.

Altogether, these observations fully support the idea that the incorporation of H2A.L.2 changes the structure of the nucleosomes allowing chromatin loading of TPs, which in turn buffer and regulate Prm processing and assembly (Fig. 3).

Prms are the true histone displacers. Indeed, they can displace histones even in the absence of TPs (or H2A.L.2). However, although not required for histone removal, TPs are necessary for an efficient Prm-dependent genome compaction.

The major outcome of these investigations is also a new vision of the process of histone-to-Prm transition. Indeed, the general belief was that histones were first replaced by TPs, which were later replaced by Prms to fully compact the genome. The new data described above demonstrate that the full picture of the process requires a histone variant that ‘prepares’ the nucleosomes to undergo disassembly (Fig. 1). In this context, TPs and Prms work together, not successively, to fully transform the nucleosomes into nucleosprotamine structures (Fig. 3).

H2A.B.3

In an attempt to identify and functionally characterize H2A histone variants that lack the characteristic acidic patch, which is present in most H2As, including canonical H2A, the mouse genome was screened in search for H2A genes with an altered acidic patch (25). The acidic patch is typically composed of a series of six acidic amino acids of H2A, present at the surface of a nucleosome, which mediates the nucleosome–nucleosome interaction and hence chromatin compaction (26, 27). This approach led to the identification of four H2A variants with an altered acidic patch, which were named H2A.Lap1–4, ‘Lap’ standing for Lack of

Acidic Patch. A further analysis showed that some of them had already been identified by Govin and colleagues: H2A.L.2 actually is H2A.Lap3, H2A.L.1 is H2A.Lap2 and H2A.L.3 is H2A.Lap4 (20). H2A.Lap1, now known as H2A.B.3, was uniquely identified in this study and functionally characterized. This H2A variant shows similar structural features as H2A.L.2 but its expression pattern is drastically different (Fig. 1). H2A.B.3 first appears in late pachytene spermatocytes and particularly accumulates in post-meiotic round spermatids but disappears from the elongating spermatids nucleus (25), when H2A.L.2 starts to accumulate (21). The protein was then found enriched at the transcriptional start sites (TSS) of highly active genes in spermatocytes as well as in round spermatids. In these latter cells, H2A.B.3 becomes associated with the X-linked genes that escape sex chromosome transcriptional inactivation (25). Further studies demonstrated that H2A.B.3 has an RNA-binding motif, binds RNA and a series of RNA processing factors and co-localizes with splicing speckles in highly active nuclear subdomains (28). These studies highlight the possibility that H2A.B.3 incorporation at exon–intron boundaries facilitates the recruitment of splicing factors from the splicing speckles.

It is of note that the studies on H2A.B.3 also revealed a specific functional interplay between this histone and the widely-studied H2A.Z in spermatogenic cells. Indeed, several years ago, a microscopic analysis of H2A.Z histone variants revealed a post-meiotic accumulation of H2A.Z on the sex chromosomes (29). A high resolution mapping of H2A.Z and H2A.B.3 revealed an interesting relationship between these two H2A variants. The replacement of H2A.Z by H2A.B.3 at the exon–intron boundaries in spermatogenic cells may play a role in the regulation of splicing at active genes. Additionally, in the surround of genes TSSs, a combination of H2A, H2A.Z and H2A.B.3 could define specific gene categories in terms of expression timing and functional classifications of their products (30). These studies extend the role of histone variants from a specific action on particular chromatin regions to a possibly direct regulation of RNA processing and splicing.

Testis specific H3

A testis-specific histone H3 was also first reported almost 40 years ago (31). However, similarly to TH2B, it is structural biology that brought hints on the possible functions of this variant, first for the human H3T (32) and then for the mouse H3t variant (33). These studies showed that the alteration of several residues in H3T compared to H3.1, perfectly explains the instability of nucleosomes bearing H3T, observed *in vitro* and *in vivo*. In the case of H3t, only one H3t-specific amino acid, H42, was found to be responsible for creating an ‘open’ nucleosome with flexible DNA at the entry–exit of the nucleosomes (33). The H3t-encoding gene becomes active in differentiating spermatogonia, and its product gradually replaces most of the somatic-type H3s.

In the absence of H3t, a significant reduction of the number of differentiating c-Kit positive spermatogonia was observed, leading to complete male infertility. Further investigations showed a drastic decrease in the number of post-meiotic cells and suggested a possible role for this histone in the entry of cells into meiosis. However, since there was no compensatory increase of H3 gene expression to maintain cellular H3 levels, the observed defects in the absence of H3t could also be explained by histone underdosage.

H3.3

Besides the mouse models harbouring the inactivation of genes encoding testis-specific histone variants, the targeted inactivation of H3.3-encoding genes in the mouse testis was also performed. H3.3 is a replication-independent H3 that is required for chromatin assembly whenever the replication-dependent pathway is not operational, such as post-fertilization chromatin assembly on the paternal genome (34–36).

In the mouse two independent H3.3 encoding genes, *H3f3a* and *H3f3b*, generate identical H3.3. However individual targeted KO of these genes have different impact on spermatogenesis. The knock-out of *H3f3a* leads to the generation of abnormal spermatozoa (37), while the KO of *H3f3b* has a much more dramatic phenotype including a spermatogenesis arrest at the stage of round spermatid (37, 38).

These functional analyses of H3.3 had been awaited since the interesting observation by de Boer's laboratory of the massive replacement of H3 by H3.3 on the sex chromosomes in meiotic cells (39). During meiosis the unsynapsed X and Y chromosomes create a specific domain in the nucleus of spermatocytes known as the sex body, which undergoes a total transcriptional inactivation during meiosis known as meiotic sex chromosome inactivation (MSCI).

A consequence of this selective incorporation of H3.3 on the sex chromosomes is the creation of interesting combinations of histone variants. In spermatocytes, the macroH2A histone variant was known to accumulate on the sex body (40), while in post-meiotic cells it is H2A.Z that becomes enriched on these chromosomes (29). The presence of both H3.3 and macroH2A in spermatocytes and of H3.3 and H2A.Z in round spermatids increases the probability for these combinations to be present within the same nucleosome. While macroH2A is associated with less active and more stable chromatin domains (41), the H3.3–H2A.Z combination is known to create a particularly unstable nucleosome (42, 43), which could be important for the post-meiotic reactivation of the sex-linked genes.

The generation of these H3.3 KO models therefore provided the possibility to investigate more specifically the importance of H3.3 on the sex chromosome biology during spermatogenesis. However, at least in spermatocytes, no global defects were observed after a reduction in H3.3 expression (37), and the question of the function of H3.3 in MSCI and in the post-meiotic partial reactivation of sex chromosomes at the molecular levels remains open.

Concluding Remarks

In addition to almost all the histone variants present in somatic cells, spermatogenic cells express a number of unique histone variants of the H2A, H2B and H3 types (Fig. 1).

The structural studies of all these testis-specific variants revealed their capacity to induce nucleosome instability. Remarkably, short H2As, H2A.L.2 and H2A.B.3 as well as H3t are able to generate flexible DNA ends at the entry and exit of nucleosomes. Although these variants induce open chromatin features, these histones are expressed at quite different timings during spermatogenesis. H3t is expressed early in differentiating spermatogonia, while H2A.B.3 is expressed in pachytene spermatocytes and to a greater extent in round spermatids and is eventually replaced by H2A.L.2 in elongating spermatids. Therefore, the configuration of chromatin seems to gradually open from the early stage of commitment of cells into meiotic divisions to the late post-meiotic stage of histone-to-Prm transition. Additionally, spermatocytes express TH2B and TH2A that also form unstable and programmable chromatin. TH2B–TH2A remains in spermatogenic cells until the time of histone replacement, when H2A.L.2 accumulates and becomes the privileged partner of TH2B (Fig. 2).

Therefore, due to the action of these histone variants, the chromatin of spermatogenic cells becomes potentially 'prepared' to undergo histone-to-Prm replacement. Consequently, it is possible to speculate that it is the timing of TPs and Prms expression that decides histones replacement. However, the generation of an H2A.L.2-less mouse model demonstrated that the incorporation of this variant is indispensable for TPs to be efficiently loaded onto chromatin and that TPs incorporation controls the efficiency of the Prm-dependent replacement of histones (21).

Additionally, a genome-wide occurrence of histone hyperacetylation and of other histone acylations also seems necessary for histone replacement (1–3). It can therefore be concluded that a change in the structure of nucleosomes due to the incorporation of testis-specific histone variants is only one facet of the mechanisms involved in general histone eviction and that other mechanisms, mostly histone PTM-based events, are equally important.

Therefore, the future challenge will be to decipher the molecular links between histone variants and histone PTMs in the process of coupled histone eviction and Prm assembly.

Funding

This work is supported by ANR Episperm 3 program, by a grant from 'Fondation pour la Recherche Medicale (FRM)' 'analyse bio-informatique pour la recherche en biologie' program as well as INCa libre program (RPT13001CCA). Additional supports were from: Fondation ARC 'Canc'air' project (RAC16042CLA), Plan Cancer (CH7-INS15B66) and Plan Cancer (ASC16012CSA) and the 'Université Grenoble Alpes' ANR-15-IDEX-02.

Conflict of Interest

A.V. is a recipient of a PhD fellowship from CNRS.

References

- Goudarzi, A., Shiota, H., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2014) Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J. Mol. Biol.* **426**, 3342–3349
- Goudarzi, A., Zhang, D., Huang, H., Barral, S., Kwon, O.K., Qi, S., Tang, Z., Buchou, T., Vitte, A.L., He, T., Cheng, Z., Montellier, E., Gaucher, J., Curtet, S., Debernardi, A., Charbonnier, G., Puthier, D., Petosa, C., Panne, D., Rousseaux, S., Roeder, R.G., Zhao, Y., and Khochbin, S. (2016) Dynamic competing histone H4 K5K8 acetylation and butyrylation are hallmarks of highly active gene promoters. *Mol. Cell* **62**, 169–180
- Liu, S., Yu, H., Liu, Y., Liu, X., Zhang, Y., Bu, C., Yuan, S., Chen, Z., Xie, G., Li, W., Xu, B., Yang, J., He, L., Jin, T., Xiong, Y., Sun, L., Liu, X., Han, C., Cheng, Z., Liang, J., and Shang, Y. (2017) Chromodomain protein CDYL acts as a crotonyl-CoA hydratase to regulate histone crotonylation and spermatogenesis. *Mol. Cell* **67**, 853–866
- Bao, J., and Bedford, M.T. (2016) Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* **151**, R55–R70
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., and Zhao, M. (2003) Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* **111**, 483–488
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004) The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3459–3469
- 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
- Li, A., Maffey, A.H., Abbott, W.D., Conde e Silva, N., Prunell, A., Siino, J., Churikov, D., Zalensky, A.O., and Ausio, J. (2005) Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* **44**, 2529–2535
- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thevenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., and Caron, C. (2007) Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* **176**, 283–294
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, 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., and Khochbin, S. (2013) Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* **27**, 1680–1692
- Urahama, T., Horikoshi, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., and Kurumizaka, H. (2014) Structure of human nucleosome containing the testis-specific histone variant TSH2B. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* **70**, 444–449
- Padavattan, S., Shinagawa, T., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Ishii, S., and Kumarevel, T. (2015) Structural and functional analyses of nucleosome complexes with mouse histone variants TH2a and TH2b, involved in reprogramming. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 929–935
- Padavattan, S., Thiruselvam, V., Shinagawa, T., Hasegawa, K., Kumasaka, T., Ishii, S., and Kumarevel, T. (2017) Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. *Biophys. Chem.* **221**, 41–48
- Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L.M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., Sado, T., Takahashi, S., Ogura, A., Shirahige, K., and Ishii, S. (2014) Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **14**, 217–227
- Iuso, D., Czernik, M., Toschi, P., Fidanza, A., Zacchini, F., Feil, R., Curtet, S., Buchou, T., Shiota, H., Khochbin, S., Ptak, G.E., and Loi, P. (2015) Exogenous expression of human protamine 1 (hPrm1) remodels fibroblast nuclei into spermatid-like structures. *Cell Rep.* **13**, 1765–1771
- 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
- Hada, M., Kim, J., Inoue, E., Fukuda, Y., Tanaka, H., Watanabe, Y., and Okada, Y. (2017) TH2A is phosphorylated at meiotic centromere by Haspin. *Chromosoma* **126**, 769–780
- 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
- Talbert, P.B., Ahmad, K., Almouzni, G., Ausio, J., Berger, F., Bhalla, P.L., Bonner, W.M., Cande, W.Z., Chadwick, B.P., Chan, S.W., Cross, G.A., Cui, L., Dimitrov, S.I., Doenecke, D., Eirin-Lopez, J.M., Gorovsky, M.A., Hake, S.B., Hamkalo, B.A., Holec, S., Jacobsen, S.E., Kamieniarz, K., Khochbin, S., Ladurner, A.G., Landsman, D., Latham, J.A., Loppin, B., Malik, H.S., Marzluff, W.F., Pehrson, J.R., Postberg, J., Schneider, R., Singh, M.B., Smith, M.M., Thompson, E., Torres-Padilla, M.E., Tremethick, D.J., Turner, B.M., Waterborg, J.H., Wollmann, H., Yelagandula, R., Zhu, B., and Henikoff, S. (2012) A unified phylogeny-based nomenclature for histone variants. *Epigenetics Chromatin* **5**, 7
- El Kennani, S., Adrait, A., Shaytan, A.K., Khochbin, S., Bruley, C., Panchenko, A.R., Landsman, D., Pflieger, D., and Govin, J. (2017) MS_HistoneDB, a manually curated resource for proteomic analysis of human and mouse histones. *Epigenetics & Chromatin* **10**, 2
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M., Charbonnier, G., Coute, Y., Puthier, D., Buchou, T., Boussouar, F., Urahama, T., Fenaille, F., Curtet, S., Hery, P., Fernandez-Nunez, N., Shiota, H., Gerard, M., Rousseaux, S., Kurumizaka, H., and Khochbin, S. (2017) Histone variant H2A.L.2 guides transition protein-dependent protamine assembly in male germ cells. *Mol. Cell* **66**, 89–101.e8
- Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Sukanuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004) Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* **38**, 200–213
- Zhao, M., Shirley, C.R., Mounsey, S., and Meistrich, M.L. (2004) Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations. *Biol. Reprod.* **71**, 1016–1025
- 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

25. Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2011) A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 25–30
26. Chodaparambil, J.V., Barbera, A.J., Lu, X., Kaye, K.M., Hansen, J.C., and Luger, K. (2007) A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1105–1107
27. Zhou, J., Fan, J.Y., Rangasamy, D., and Tremethick, D.J. (2007) The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1070–1076
28. Soboleva, T.A., Parker, B.J., Nekrasov, M., Hart-Smith, G., Tay, Y.J., Tng, W.-Q., Wilkins, M., Ryan, D., Tremethick, D.J., and Schneider, R. (2017) A new link between transcriptional initiation and pre-mRNA splicing: the RNA binding histone variant H2A.B. *PLoS Genet.* **13**, e1006633
29. Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006) The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing [corrected] facultative heterochromatin [corrected] following meiosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5394–5405
30. Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Ryan, D.P., and Tremethick, D.J. (2014) Histone variants at the transcription start-site. *Trends Genet.* **30**, 199–209
31. Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* **266**, 273–275
32. Tachiwana, H., Kagawa, W., Osakabe, A., Kawaguchi, K., Shiga, T., Hayashi-Takanaka, Y., Kimura, H., and Kurumizaka, H. (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **107**, 10454–10459
33. Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., Makino, Y., Nogami, J., Horikoshi, N., Osakabe, A., Taguchi, H., Tanaka, H., Tachiwana, H., Yao, T., Yamada, M., Iwamoto, T., Isotani, A., Ikawa, M., Tachibana, T., Okada, Y., Kimura, H., Ohkawa, Y., Kurumizaka, H., and Yamagata, K. (2017) Testis-specific histone variant H3t gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* **18**, 593–600
34. Filipescu, D., Szenker, E., and Almouzni, G. (2013) Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet.* **29**, 630–640
35. Lin, C.J., Koh, F.M., Wong, P., Conti, M., and Ramalho-Santos, M. (2014) Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Dev. Cell.* **30**, 268–279
36. Inoue, A., and Zhang, Y. (2014) Nucleosome assembly is required for nuclear pore complex assembly in mouse zygotes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 609–616
37. Tang, M.C.W., Jacobs, S.A., Mattiske, D.M., Soh, Y.M., Graham, A.N., Tran, A., Lim, S.L., Hudson, D.F., Kalitsis, P., O'Bryan, M.K., Wong, L.H., Mann, J.R., and Tremethick, D. (2015) Contribution of the two genes encoding histone variant h3.3 to viability and fertility in mice. *PLoS Genet.* **11**, e1004964
38. Yuen, B.T., 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
39. van der Heijden, G.W., Derijck, A.A., Posfai, E., Giele, M., Pelczar, P., Ramos, L., Wansink, D.G., van der Vlag, J., Peters, A.H., and de Boer, P. (2007) Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* **39**, 251–258
40. Hoyer-Fender, S., Costanzi, C., and Pehrson, J.R. (2000) Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis. *Exp Cell Res.* **258**, 254–260
41. Talbert, P.B., and Henikoff, S. (2017) Histone variants on the move: substrates for chromatin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 115–126
42. Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007) Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* **21**, 1519–1529
43. Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G. (2009) H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark nucleosome-free regions of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* **41**, 941–945

Purification and Analysis of Male Germ Cells from Adult Mouse Testis

Thierry Buchou, Minjia Tan, Sophie Barral, Anne-Laure Vitte, Sophie Rousseaux, Juan Arechaga, and Saadi Khochbin

Abstract

Isolation of pools of spermatogenic cells at specific developmental stages is essential for the investigations of molecular events controlling critical transitions during spermatogenesis. Large-scale cell purification techniques allow for combined proteomics, genomics, and transcriptomics studies. Herein, we describe a procedure for the purification of meiotic and post-meiotic male germ cells from adult mouse testes. We also describe how the fractionated cell populations could be used for further studies. In our laboratory, these protocols are routinely used to specifically investigate the molecular basis of histone acetylation/acylation-driven epigenetic programming.

Key words Mouse testis, Male germ cell, Haploid post-meiotic spermatid

1 Introduction

One of the most dramatic genomic reorganizations and chromatin remodeling processes takes place after the commitment of progenitor spermatogenic cells, spermatogonia, into meiotic and post-meiotic differentiation [1]. This transition is characterized by chromosome-wide and genome-scale exchange of histones by specific variants and massive histone posttranslational modifications [2, 3]. At post-meiotic stages haploid cells undergo a general transcriptional activity shutdown associated with histone hyperacetylation and a genome-wide histone replacement by non-histone basic proteins [4]. These dramatic events are driven by factors encoded by genes that are parts of male-specific gene expression programs that are activated in a stage-specific manner [5]. Histone acetylation as well as other lysine acylation events appears to be not only determinant elements in controlling these gene expression programs but also essential in mediating the final metamorphosis of a nucleosome-based genome organization into a new type of genome packaging based on non-histone proteins [2, 6].

Although these genome reorganizations are essential for the life cycle and procreation, almost nothing is known on the underlying molecular basis [7]. The fact that testis is formed of a variety of very different cell types including somatic type cells and the absence of satisfactory in vitro or ex vivo systems make these studies particularly challenging.

In our laboratory we are using the sedimentation based spermatogenic cell fractionation procedure and have adapted chromatin, RNA, protein and histone extraction protocols to these isolated cell populations to characterize at large-scale all the molecular events that drive critical genome organization transitions and programming. They include the mapping of histone posttranslational modifications (PTMs) and histone variants on chromatin, as well as analyzing gene expression and protein complexes.

Detailed protocols are provided here that aim at enabling interested investigators to fractionate dissociated spermatogenic cells from adult mouse testes and to proceed with the molecular analyses.

2 Materials

2.1 BSA Gradient

1. Fluorinert-FC77 (3M, ZV-0170-0734-5).
2. Na Butyrate 2 M: 4 ml n-butyric acid, 8 ml NaOH 5 N, 10 ml 1× PBS, keep at 4 °C.
3. BSA 4%: 8 g/200 ml of DMEM/F12 medium, 2%: 4 g/200 ml of DMEM/F12 medium, and 0.5%: 1 g/200 ml of DMEM/F12 medium; dissolve at room temperature using magnetic stirring and keep in cold room.
4. Collagenase solution: 10 mg of collagenase in 10 ml 1× PBS, final concentration 1 mg/ml.

2.2 Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

1. Lysis buffer: Tris-HCl pH 7.4 15 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, sucrose 0.34 M, EDTA 2 mM, EGTA 0.5 mM, spermidine 0.65 mM, dithiothreitol 1 mM, Triton X-100 0.03%, glycerol 1%, “cOmplete, EDTA-free” Protease Cocktail Inhibitor according to manufacturer (Roche, 05056489001).
2. Wash buffer: Tris-HCl pH 7.4 15 mM, KCl 60 mM, NaCl 15 mM, sucrose 0.34 M, spermidine 0.65 mM, dithiothreitol 1 mM, Protease Cocktail Inhibitor.
3. Micrococcal nuclease (MNase) buffer: Tris-HCl pH 7.5 10 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 2 mM.
4. Micrococcal nuclease (S7 nuclease Roche; 10107921001; 15,000 U dissolved in 3 ml Tris-HCl pH 7.5, NaCl 100 mM, glycerol 50%; keep at -20 °C).
5. LSDB500 buffer: Hepes 50 mM pH 7, MgCl₂ 3 mM, KCl 500 mM, glycerol 20%, Protease Cocktail Inhibitor.

6. Dynabeads protein G (Invitrogen, 10003D).
7. LSDB350 buffer: Hepes 50 mM pH 7, MgCl₂ 3 mM, KCl 350 mM, glycerol 20%, Protease Cocktail Inhibitor.
8. Elution buffer: Tris-HCl 10 mM pH 8.5, EDTA 1 mM.

2.3 RNA Purification

1. TRIzol Reagent (Ambion/Invitrogen, 15596026).
2. RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104).

2.4 Histone Extraction

1. Extraction buffer: HEPES 10 mM pH 7, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, sucrose 0.34 M, Nonidet P-40 0.5%, Protease Cocktail Inhibitor, Na Butyrate 2 mM, and nicotinamide 5 mM.
2. Wash buffer: HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, sucrose 0.34 M, without Nonidet P-40, Protease Cocktail Inhibitor, Na Butyrate 2 mM, and nicotinamide 5 mM.

2.5 Pull Down

1. LSBD250 buffer: Hepes 50 mM pH 7, MgCl₂ 3 mM, KCl 250 mM, glycerol 20%, Protease Cocktail Inhibitor.
2. LSBD0 buffer: Hepes 50 mM pH 7, MgCl₂ 3 mM, glycerol 20%, Protease Cocktail Inhibitor.

3 Methods

3.1 Fractionation of Male Germ Cells by Sedimentation on a BSA Gradient

3.1.1 Preparation of Apparatus/Solutions

1. In order to inhibit Histone DeAcetylase (HDAC) activities, add Na Butyrate at a final 10 mM concentration in all solutions.
2. In the cold room, fill up the bottles with Fluorinert-FC77, up to a volume greater than 800 ml each. Assemble the chambers, tighten the screw diagonally on the lid with the bottom chamber (not too tight), install the soft tube with stopper on the top, and the hard tube at the bottom. Place the chambers in the cold room horizontally. Place the stirrer, two graduated cylinders connected with the tubes, and a syringe in the cold room. Place the second cylinder on the stirrer. Make sure the stirrer bar works, fix the position with tape. Place the first cylinder on a platform to adjust the height. Close the gate of the tube on first cylinder. Cover the top of cylinders with Parafilm. Take the tube from the bottom of the chamber into a bottle of FC77. Make sure that the tip is reaching to the bottom of the bottle. Fix the position of the tube with tape. Cover the top of the bottle with Parafilm. Label (1–36) 36 × 15 ml *Falcon* tubes. Remove the cap and keep them.
3. Prepare BSA 4%, 2%, 0.5%, and 1 liter 1 × PBS. These solutions are kept at 4 °C.
4. Weight Collagenase in 50 ml *Falcon* tube and keep at –20 °C.
5. Prepare 36 slides aligned (twice as many if two chambers are used).

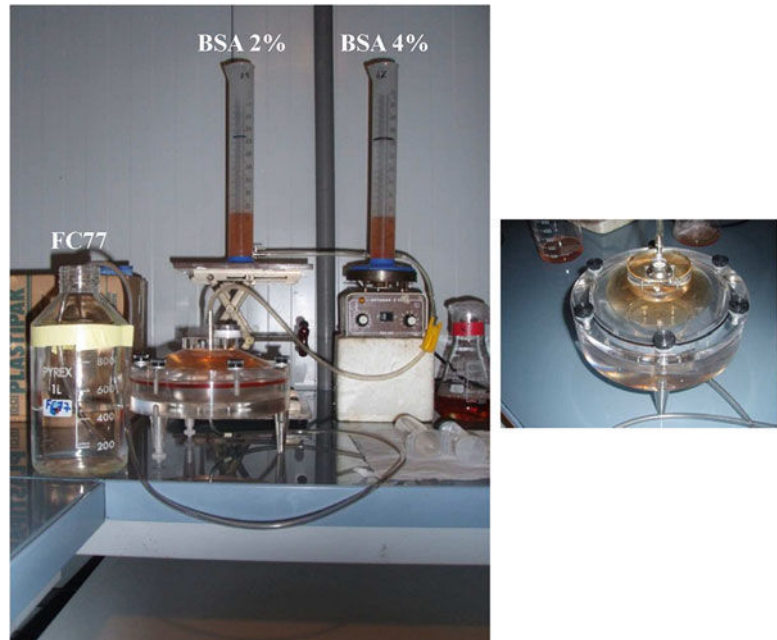


Fig. 1 BSA gradient in chamber. The chamber is filled up with the BSA 2–4% gradient in the cold room

3.1.2 Prepare Gradient in Chamber

1. In the cold room, fill up the sedimentation chamber with Fluorinert-FC77, prime using syringe (*see Notes 1 and 2*).
2. Fill up the two graduated cylinders respectively with BSA 4% (right) and BSA 2% (left), 180 ml each. To allow the BSA gradient to develop, fill up the chamber (approximately 1 ml/10 s; Figs. 1 and 2).
3. When this process is over, the sample of total germ cells suspension (*see below*) can be added. Add 90 ml of cold 1× PBS to “center” the gradient into the homogenous part of the chamber.

3.1.3 Preparation of Total Germ Cells (TGCs) Suspension and Sedimentation

1. Turn on centrifuge to cool it down, and water bath at 35 °C. Euthanize two male mice and recover the four testes. Remove albuginae and transfer seminiferous tubules in 50 ml tube containing a fresh collagenase/1× PBS solution. Incubate during 10–15 min at 35 °C and vortex regularly (follow digestion: the seminiferous tubules should unravel in the collagenase solution). Centrifuge at $200\times g$ for 10 min at 4 °C. Resuspend the pellet in 10 ml BSA 0.5%. Dissociate the aggregates by rapid pipetting for 10 min on ice with transfer pipets (graduated 3 ml large bulb). Centrifuge at $200\times g$ for 10 min at 4 °C. Resuspend the pellet in 5 ml BSA 0.5%. Filter the suspension on 15 ml tube with a 100 μm filter. Rinse the tube with 1 ml BSA 0.5% and filter the suspension again using the same filter. Filter the

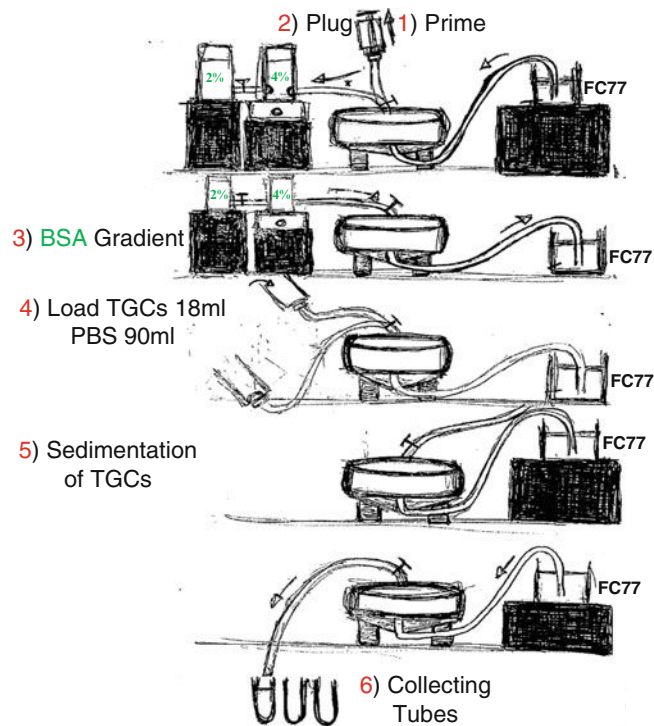


Fig. 2 Purification of male germ cells by sedimentation. Fill up the bottles with Fluorinert-FC77 (1). Connect the tube with the stopper on the top of the chamber with the cylinder containing BSA 4% (2). Fill up the chamber with the BSA gradient (3). Gently add the TGCs suspension on the top of the BSA gradient (4). Leave cells to sediment for 70–75 min (5). Collect the cell fractions (6)

suspension on a new 15 ml tube with a second 100 μm filter. Rinse the tube with 1 ml BSA 0.5% and filter using the same filter. Add BSA 0.5% up to a total volume of 18 ml.

2. Gently add the TGCs suspension on the top of the BSA gradient in the cold room. Add 90 ml of cold 1 \times PBS to “center” the gradient as described above. Leave cells to sediment for 70–75 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ (Fig. 2).
3. Remove 1 \times PBS (approximately 90 ml) and start collecting the cell fractions in the 15 ml labeled tubes (10 ml/ tube, Fig. 2).
4. Centrifuge each of the collected fractions at 200 $\times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and remove the supernatant (approximately 9 ml); resuspend cells in 1 ml of the remaining fluid. Use a small aliquot of each fraction (on a slide with coverslip) for examination with a phase contrast microscope. Pool the fractions with the same cell types (Spermatocytes, Round Spermatids, Elongating/Condensing Spermatids; Fig. 3) and wash them in 10 ml cold 1 \times PBS by centrifugation at 200 $\times g$ for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ (See Note 3).

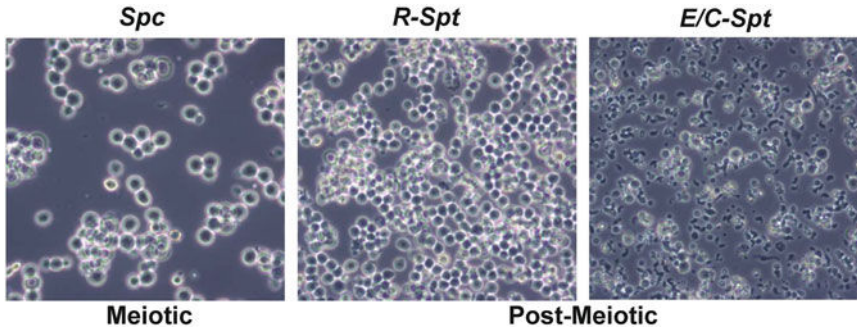


Fig. 3 Purified meiotic and post-meiotic male germ cells. Examination of collected cell fractions with a phase contrast microscope. *Spc* pachytene spermatocytes, *R-Spt* early post-meiotic Round Spermatids, *E/C-Spt* elongated/condensed spermatids

3.2 Chromatin Preparation and ChIP

1. Purified pool fractions of germ cell nuclei from ten testes ($2\times$ sedimentation procedures) are prepared by resuspension of the PBS-washed cell pellets with 1.5 ml lysis buffer with Na Butyrate 10 mM in a 1.5 ml tube at 4 °C followed by centrifugation for 15 min at $200\times g$ at 4 °C. Nuclei (pellet) are resuspended in 1.5 ml wash buffer with Na Butyrate 10 mM and centrifuged again. Nuclei can be stored at -20 °C in 500 μ l wash buffer with Na Butyrate 10 mM/Glycerol 50% (mix 1/1 v/v, wash buffer with Na Butyrate 10 mM and Glycerol 100% carefully) or are processed directly. Resuspend nuclei in 200 μ l of MNase buffer with Na Butyrate 10 mM. 5 μ l of nuclei solution are treated with 5 μ l micrococcal nuclease S7 (5 U/ μ l) in 100 μ l MNase buffer for 5 min at 37 °C. 900 μ l Urea 8 M is added to the reaction and DNA content is measured by OD at 260 nm using a NanoDrop apparatus (1 unit OD260 corresponds to 50 μ g DNA/ml). Nuclei (200 μ g) are incubated in 200 μ l MNase buffer (final concentration 1 μ g/ μ l) with Na Butyrate 10 mM in the presence of 2 μ l micrococcal nuclease (5 U/ μ l; 20 μ g/U) at 37 °C for the desired time, to obtain mononucleosomes. The digestion reaction is stopped by adding EDTA at 5 mM final concentration. The nucleosome fraction is isolated by centrifugation at $600\times g$ for 15 min at 4 °C. In order to quantify the mononucleosomes in the supernatant, 100 μ l of SDS 0.2% is added to 1 μ l of the fraction and the DNA content is measured at OD260 nm. The mononucleosome fraction can be tested: 10 μ l of the supernatant is added to 40 μ l H₂O and mixed with 50 μ l phenol-chloroform-isoamyl Alcohol. After strong mixing by vortex and centrifugation ($9400\times g$ for 5 min at 4 °C) the aqueous phase (40 μ l) is mixed with 5 μ l loading buffer and analyzed after migration on a regular agarose gel 2%. The mononucleosome DNA signal is around 150 bp. Save chromatin input (10 μ l).

2. Chromatin Immuno Precipitations (ChIPs) are carried with 5 μg of antibodies (*see Note 4*) and 100 μg (100 μl) of mono-nucleosomes diluted in 200 μl LSDB500 buffer with Na Butyrate 10 mM for 16 h at 4 °C. Antibodies have to be previously coupled to magnetic beads (1/10th of the final volume, 30 μl) according to the manufacturer's manual (Dynabeads protein G) for 6–16 h in 1 \times PBS, BSA 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (note that the final KCl concentration is therefore 350 mM). Beads were washed three times with LSDB350 with Na Butyrate 10 mM at 4 °C (tenfold volume of beads) and once with elution buffer with Na Butyrate 10 mM before nucleosome elution with 150 μl elution buffer containing, SDS 1%.
3. DNA purification: Process the input in parallel: 140 μl of elution buffer containing SDS 1% is added to 10 μl of the conserved fraction before ChIP. Elution and input samples are incubated for 20 min at 65 °C (mixed every 5 min). Isolate the flow-through and add 250 μl elution buffer. Add 4 μl of RNaseA 20 mg/ml and incubate for 1 h at 37 °C. Add 8 μl of proteinase K 10 mg/ml and incubate for 1 h at 55 °C. Add 400 μl phenol–chloroform–isoamyl alcohol and mix gently (no vortex). Centrifuge at 18,500 $\times g$ for 10 min. Transfer the aqueous layer and add 300 μl chloroform (mix gently, no vortex). Centrifuge at 18,500 $\times g$ for 10 min. Transfer the aqueous layer and add NaCl (200 mM, final concentration), Glycogen 40 μg , and 2 \times volume cold ethanol 100%. Mix briefly and incubate at –80 °C for 30 min. Centrifuge at 18,500 $\times g$ for 15 min at 4 °C. Wash the pellet with 1 ml cold ethanol 70% and centrifuge at 18,500 $\times g$ for 5 min at 4 °C. Let the pellet dry and resuspend into 20 μl of pure water. The samples can be kept at –20 °C.

(*See Note 5*).

3.3 RNA Purification

1. Add in a 1.5 ml tube 1 ml of Trizol reagent onto the PBS-washed germ cell pellet and resuspended robustly. This can be kept at –80 °C.
2. Add chloroform (0.2 ml), shake 30 s and incubate for 2–3 min at room temperature. Centrifuge at 12,000 $\times g$ for 10 min at 4 °C. The aqueous phase is transferred into a new tube and isopropanol 0.5 ml is added, mixed, and incubated for 10 min at room temperature. Centrifuge at 12,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C. The pellet is washed with ethanol 75%. Centrifuge at 7500 $\times g$ for 5 min at 4 °C. Air-dry the pellet and dissolves in 50 μl RNase-free water. Incubate at 55 °C for 10 min. Quantify using a NanoDrop apparatus. The RNA samples can be kept at –20 °C and/or tested by RT-qPCR.
3. For transcriptomic analysis, RNAs are further purified using the RNeasy Minit Kit (Qiagen). Adjust to 100 μl RNA

samples with RNase-free water. Add 250 μl ethanol 100%. Load onto an RNeasy Mini spin column and centrifuge at $10,000 \times g$ for 30 s at room temperature. Wash with 350 μl of the RW1 solution and centrifuge at $10,000 \times g$ for 15 s at room temperature. Add onto the membrane of the column a mix of 10 μl RNase-free DNaseI (Qiagen) with 70 μl RDD buffer and let incubate for 15 min at room temperature. Add 350 μl RW1 and centrifuge at $10,000 \times g$ for 15 s at room temperature. Wash twice with 500 μl RPE buffer and centrifuge: the first washing step at $10,000 \times g$ for 15 s and the second at $10,000 \times g$ for 3 min, both at room temperature, in order to dry the membrane. The elution step is processed twice into a new collection tube with 20 μl of RNase-free water after centrifugation at $10,000 \times g$ for 1 min at room temperature. Quantify using a NanoDrop apparatus (1 unit OD260 corresponds to 40 μg RNA/ml). The RNA samples can be kept at -20°C .

(See Note 6).

3.4 Acidic Histone Extraction

1. Add 3 \times PBS-washed germ cell pellet volumes of ice-cold extraction buffer. Gently resuspend the cells with a pipette, and incubate on ice for 20 min. Check under the microscope to ensure that the plasma membrane is disrupted but not the nuclear membrane. Centrifuge at $1000 \times g$ for 5 min at 4°C , discard the supernatant with pipette, save the pellet. Wash the pellets in ice-cold wash buffer twice by resuspending the pellets completely. Spin the pellets in cooled centrifuge, $1000 \times g$ for 5 min and completely remove the supernatant.
2. Add 10 \times pellet volumes of H_2SO_4 0.2 M into pellets, vortex the solution until the pellets are dissolved, and incubate the mixture for 16 h on rotator at 4°C . Centrifuge at $20,000 \times g$ for 15 min and save the supernatant. Add TCA drop by drop with pipette into the supernatant with a final concentration of Trichloroacetic acid 20% (TCA: supernatant, v/v). Place the tubes on ice for at least 30 min and centrifuge at $16,000 \times g$ for 10 min to obtain the histone pellets. Wash samples with cold acetone with HCl 0.1% (v/v), which is followed by washing with cold acetone 100% twice. Allow precipitates to dry completely at room temperature.

(See Notes 7 and 8).

3.5 GST-Fusion Protein Pull-Down

1. Prepare Trichostatin A (TSA) 1 mg/ml in DMSO and keep at -20°C . Dilute before use to 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ into H_2O (250 \times). In order to inhibit Histone DeAcetylase (HDAC) activities, add TSA at a final 100 ng/ml concentration.

2. Incubate PBS-washed germ cell pellets from four testes in 2 ml lysis buffer (LSBD500 with Nonidet P-40 0.1%, dithiothreitol 1 mM, and TSA 100 ng/ml) for 15–20 min at 4 °C. Centrifuge at $18,000\times g$ for 10 min at 4 °C. Transfer the supernatant (1.8 ml) and separate equally (0.9 ml) to 250 μ l of packed pre-bound Glutathione Sepharose beads, which have been pre-incubated with 130 μ g GST (control) or with 130 μ g GST-fusion protein of interest according to the manufacturer's protocol in the equilibration buffer (LSBD250 with Nonidet P-40 0.1%, dithiothreitol 1 mM, and TSA 100 ng/ml) buffer. Immediately, add an equal volume (0.9 ml) of LSBD0 buffer with Nonidet P-40 0.1%, dithiothreitol 1 mM, and TSA 100 ng/ml and incubate for 16 h with rotation at 4 °C. Wash beads twice with 1.5 ml LSBD250 buffer with Nonidet P-40 0.1%, dithiothreitol 1 mM, and TSA 100 ng/ml and twice with 1.5 ml 1 \times PBS with TSA 100 ng/ml.
3. The cDNA of interest corresponding to the GST-fusion protein is cloned into a pGEX4T2 vector. This strategy allows the elution of the protein of interest after thrombin treatment. Therefore, 1 \times PBS with TSA 100 ng/ml equilibrated beads are incubated for 16 h with rotation at 4 °C with 350 μ l 1 \times PBS with TSA 100 ng/ml containing 50 units of thrombin. Centrifuge at $2400\times g$ for 5 min at 4 °C in order to remove the beads and the GST only bound fraction. Supernatant aliquots of 50 μ l can be kept at -20 °C for further proteomic analysis.

4 Notes

1. The sides of the chambers are available upon request.
2. Fluorinert-FC77 is a high density liquid that maintains a stable BSA gradient.
3. An original protocol has been described previously [8].
4. Antibodies should be selected as ChIP-grade quality according to manufacturer.
5. This protocol has been validated in our laboratory (see refs. 3, 5, 9, 10).
6. This purification has been tested in our team (see refs. 3, 5).
7. In Early Round spermatid extract the testis-specific TH2B histone variant [3] replaces most of the H2B histone specie detected in HeLa cell somatic extract (see Fig. 4).
8. This extraction protocol is routinely used in different laboratories (see refs. 3, 9).

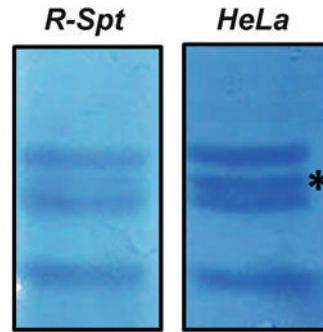


Fig. 4 Acidic histone extracts analysis by SDS-PAGE and Coomassie staining. *R-Spt* early post-meiotic Round Spermatid extract, *HeLa* HeLa cell extract. *Asterisk* H2B histone variant signal in HeLa cell extract almost not present in early Round Spermatid extract

Acknowledgment

This work is supported by a grant from “Foundation pour la Recherche Medicale (FRM)” “analyse bio-informatique pour la recherche en biologie” program as well as by ANR EpiSperm2 and Episperm3 programs and by INCA libre program.

References

1. Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussovar F, Rousseaux S, Khochbin S (2010) From meiosis to post-meiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 277:599–604
2. Montellier E, Rousseaux S, Khochbin S (2012) Cross-fire over the nucleosome: molecular basis of post-meiotic male haploid genome compaction. *Med Sci (Paris)* 28:485–489
3. Montellier E, Boussovar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F et al (2013) Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev* 27:1680–1692
4. Goudarzi A, Shiota H, Rousseaux S, Khochbin S (2014) Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J Mol Biol* 426:3342–3349
5. Gaucher J, Boussovar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S et al (2012) Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 31:3809–3820
6. Rousseaux S, Khochbin S (2015) Histone acylation beyond acetylation: terra incognita in chromatin biology. *Cell J* 17:1–6
7. Rousseaux S, Khochbin S (2012) Combined proteomic and *in silico* approaches to decipher post-meiotic male genome reprogramming in mice. *Syst Biol Reprod Med* 58:191–196
8. Bellvé AR (1993) Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* 225:84–113
9. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E et al (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146:1016–1028
10. Dai L, Peng C, Montellier E, Lu Z, Chen Y, Ishii H et al (2014) Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nat Chem Biol* 10:365–370