



Étude de SLY et de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse

Charlotte Moretti

► To cite this version:

Charlotte Moretti. Étude de SLY et de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse. Génétique. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016US-PCB113 . tel-02146007

HAL Id: tel-02146007

<https://theses.hal.science/tel-02146007>

Submitted on 3 Jun 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 L'UNIVERSITÉ DE PARIS DESCARTES

Spécialité Génétique

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Charlotte MORETTI

Le 28 Novembre 2016

ÉTUDE DE SLY ET DE LA RÉGULATION (ÉPI)GÉNÉTIQUE DES CHROMOSOMES SEXUELS PENDANT LA SPERMIOGENÈSE

Thèse dirigée par Dr. Julie COCQUET et préparée au sein du laboratoire
« Génomique, Épigénétique et Physiopathologie de la Reproduction »,
Institut Cochin – U1016/UMR8104

COMPOSITION DU JURY

DR. SAADI KHOCHBIN	RAPPORTEUR
DR. MICHAEL MITCHELL	RAPPORTEUR
PR. GABRIEL LIVERA	EXAMINATEUR
DR. CATHERINE MONTCHAMP-MOREAU	EXAMINATEUR
PR. CATHERINE PATRAT	EXAMINATEUR

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes premiers remerciements aux membres de mon jury qui ont accepté de lire, de critiquer et d'écouter les résultats obtenus au cours de mes trois années de thèse. Merci donc à Gabriel Livera, Catherine Montchamp-Moreau ainsi qu'à Catherine Patrat, et plus particulièrement à Saadi Khochbin et à Michael Mitchell pour le temps consacré à l'évaluation de ces travaux.

Merci à Daniel de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de sa formidable équipe. Nos nombreux échanges scientifiques, mais aussi littéraires ou politiques, ont toujours été enrichissant au cours de ces années de thèse et ont souvent joyeusement animé nos pause-déjeuners.

Je saisis l'opportunité de ces remerciements pour exprimer ma plus grande gratitude envers Julie. J'ai pu mesurer ma chance au cours de ces trois années d'avoir effectué ma thèse sous sa supervision, et ce tant au niveau des conditions de travail financières et scientifiques qu'humaines. Enceinte jusqu'aux oreilles ou mère d'une famille récemment élargie, sa confiance et sa disponibilité sans faille ont certainement été mes meilleurs outils pour entreprendre ce travail de recherche et comprendre ce que l'épanouissement au travail peut signifier. Merci, Julie !

Ces remerciements sont plus difficiles et plus longs à écrire que je ne l'imaginais car je ne sais comment exprimer ma reconnaissance et ma profonde amitié pour chacun des membres de la superbe équipe de Génomique, Épigénétique et Physiopathologie de la reproduction ! À Sandrine, Aminata et Ahmed : un grand merci pour leur relecture appliquée de ce manuscrit et pour toutes leurs remarques constructives distillées au cours de ces trois années. Merci à Céline, compagnon de route important pendant la thèse et l'oreille attentive de l'équipe : ces derniers mois de rédaction auraient certainement été beaucoup plus laborieux sans mon enthousiaste voisine de bureau. Pour sa bonne humeur quotidienne, ses nombreux conseils protéiques et les multiples dépannages en réactifs, merci Patrick. Aux travailleurs de l'ombre qui nous permettent, entre autres, d'avoir des placards toujours remplis, les commandes toujours urgentes passées et les génotypes analysés : un énorme merci à Laurence et Côme. À Jean, Céline et à leur publication en collaboration, sans qui le labo aurait semblé bien vide et silencieux la nuit venue lors d'occasionnelles veillées nocturnes.

Aux membres non-permanents passés et présents du labo grâce auxquels je noue des amitiés beaucoup plus longues que la durée de leur contrat : merci ! Les résultats obtenus grâce à Elisabetta lors de son post-doctorat représentent un travail considérable et ma thèse n'aurait certainement pas eu le même visage sans elle. Je sais tout particulièrement gré à Myriam, Elma et Anne-Lyse car de collègues de travail nous sommes devenues amies. Je peux citer pêle-mêle quelques-unes des raisons de ma profonde estime pour elles, comme leur indéfectible soutien, leur bonne humeur, leur curiosité ou encore leur ouverture d'esprit. Merci ! Mais surtout... on se voit demain ? :) Il ne me faudrait surtout pas oublier Aurélien, mon collègue doctorant avec qui nous avons, les coudes serrés, commencé et presque terminé ces trois années de thèse ensemble.

L'âme de ce laboratoire est également composée du vent de fraîcheur et d'enthousiasme apporté chaque année par les stagiaires en soif de connaissances. Je souhaiterai tout particulièrement remercier Marion pour son travail considérable sur le nouveau projet de l'équipe, avec qui j'ai eu la chance de travailler pendant plusieurs mois.

Merci à Irène, de me faire traverser la moitié du monde pour venir lui rendre visite mais surtout pour cette belle et franche amitié ! Merci à Elisa, Lucile, Carole et Maëlle avec lesquelles j'ai passé de très bons moments au labo, mais également à l'extérieur des murs de l'institut.

Merci à tous les copains, qui depuis trois ans doivent être usés de poser cette question : « Mais, tu soutiens quand ? ». Votre soutien fidèle depuis le début de ce projet m'a réellement permis de ne pas baisser les bras pendant les heures les plus déprimantes de ces trois années et m'encourage à être toujours plus exigeante. Pour m'avoir patiemment écouté parler de mon projet et de mes problèmes, alors que la biologie, ce n'est pas votre passion : merci ! Promis, j'arrête de vous ennuyer avec ma thèse dès que c'est fini ! Mes remerciements vont aussi vers ma famille, toujours présente et toujours souriante : solide pilier et havre de paix dans ces vies modernes et mouvementées.

Enfin, pour son inébranlable soutien au quotidien et sa patience inouïe pendant ces trois années, je suis infiniment reconnaissante envers Gaëtan. Même si l'horizon géographique est un peu flou, guidés par ton sens de la justice et ta curiosité contagieuse, j'ai hâte de voir où nos prochaines aventures pourraient nous emmener. Merci d'avoir été présent à chaque instant et de continuer à l'être.

Je souhaiterai clore ces remerciements en insistant et en remerciant une nouvelle fois toute l'équipe de Daniel. J'ai passé trois années de travail formidables à vos côtés, et je suis ravie de pouvoir rester encore un peu avec vous, après cette thèse.

RÉSUMÉ

Globalement réprimés à la méiose (MSCI¹), les chromosomes sexuels sont partiellement réactivés dans les spermatides rondes avant l'arrêt général de la transcription dans les spermatozoïdes. Alors qu'il est clairement démontré que le MSCI est essentiel pour la poursuite de la spermatogenèse, la proportion de gènes réactivés ainsi que le mécanisme de régulation des chromosomes sexuels après la méiose demeurent un sujet de recherche et de débats.

Chez la souris, la délétion du bras long du chromosome Y (MSYq) provoque la surexpression de plusieurs centaines de gènes, dont la majorité est portée par les chromosomes sexuels, associée à des modifications de la chromatine; ceci aboutit à la production de spermatozoïdes malformés et non-féconds, présentant notamment une compaction anormale de leur chromatine. *Sly* est un des cinq gènes multicopies du MSYq et l'abolition de son expression chez la souris (souris *Sly*-KD) a récemment démontré qu'il est à la base de la dérégulation épigénétique des chromosomes sexuels et des problèmes de compaction de la chromatine des mâles MSYq-. De plus, les mâles avec délétion partielle de MSYq ainsi que les mâles *Sly*-KD produisent une descendance avec un excès de femelles, ce qui suggère l'existence d'un conflit intragénomique avec *Slx*, un gène multicopie homologue de *Sly* et porté par le chromosome X.

Quel rôle pour SLY pendant la spermiogenèse ? Afin de répondre à cette question nous avons étudié les gènes cibles et les partenaires de SLY. Nous avons montré que SLY interagit avec TBL1XR1, membre inhérent au complexe répressif Ncor. De plus, localisée au niveau des promoteurs de gènes exprimés dans les spermatides et liés aux chromosomes sexuels et autosomaux, SLY contrôle des gènes impliqués dans la régulation génique et chromatinienne (e.g, variants H2A et DOT1L). Nous avons également détecté une baisse significative de la marque H3K79me2 accompagnée d'une rétention anormale des histones dans les spermatozoïdes des souris *Sly*-KD et proposons que DOT1L, la seule H3K79 méthyltransférase identifiée à ce jour, est essentielle au remodelage de la chromatine.

Quels sont les mécanismes moléculaires du conflit intragénomique entre SLY et SLX ? Des expériences de co-immunoprécipitations ont démontré que SSTY, codée comme SLY par un gène multicopies du MSYq, interagit préférentiellement avec SLX *in vivo*. En outre, SLX et SLY sont capables toutes deux d'interagir avec SPIN1, homologue de SSTY et capable de se lier à H3K4me3. Ces différentes interactions entre SLX/SLY et SPIN1/SSTY pourraient participer au conflit intragénomique. Par la réévaluation de plusieurs jeux de données (RNA-Seq et ChIP-Seq) nous avons démontré que la répression des chromosomes sexuels ne persiste pas au-delà de la méiose et que le conflit intragénomique entre SLY et SLX représente une pression de sélection considérable, en partie responsable du paysage épigénétique spécifique des chromosomes sexuels et de leur enrichissement en gènes multicopies exprimés après la méiose.

En conclusion, nos travaux ont permis de caractériser le mode d'action de SLX/SLY et d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation (épi)génétique pendant la spermiogenèse qui sont conservés chez l'homme.

Mots-clés : SLX/SLY, spermiogenèse, régulation épigénétique, chromosomes sexuels

¹ MSCI : *Meiotic Sex Chromosome Inactivation*

Table des matières

INTRODUCTION.....	10
1. La spermatogenèse	10
a. Le testicule.....	10
b. La prolifération spermatogoniale.....	13
c. La méiose.....	14
Le complexe synaptonémal	16
Les cassures doubles brins et la recombinaison homologue.....	17
Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI)	19
d. La spermiogenèse.....	22
Post-meiotic sex chromatin (PMSC).....	22
Compaction de l'ADN nucléaire.....	26
Formation du flagelle.....	37
Formation de l'acrosome.....	38
e. Le cycle séminifère	39
2. Les chromosomes sexuels	41
a. L'évolution des chromosomes sexuels.....	41
Evolution du chromosome Y.....	42
Evolution du chromosome X.....	46
L'empreinte des conflits intragénomiques sur les chromosomes sexuels	49
b. Infertilité masculine humaine & chromosomes sexuels	51
c. Rôle des chromosomes sexuels murins pendant la spermiogenèse.....	52
Structure du chromosome Y murin.....	53
Délétion du bras court du chromosome Y	55
Délétion du bras long du chromosome Y (MSYq)	58
3. Etude des protéines impliquées dans la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse.....	63
a. SLY est une protéine clé pour la régulation de la chromatine sexuelle après la méiose (PMSC) .	63
Caractérisation du rôle de SLY : utilisation de souris déficientes en SLY.....	65
b. SSTY : un candidat prometteur pour la régulation de la PMSC dans les spermatides rondes.....	70
c. Deux autres membres de la famille SYCP3-like : SLX et SLXL1	71
SLX et SLXL1 sont des protéines homologues à SLY.....	71
Caractérisation du rôle de SLX et SLXL1 : utilisation de souris déficientes.....	72
d. SLY et SLX/SLXL1 : le <i>yin</i> et le <i>yang</i> de la régulation transcriptionnelle des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse	75
SLX/SLXL1 : des protéines activatrices de la PMSC ?	75
SLY et SLX/SLXL1 ont des effets antagonistes nucléaires et cytoplasmiques	76
De l'importance des conflits génomiques dans la spéciation des espèces.....	78
e. Régulateurs autosomaux des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse.....	80
UBE2B est essentielle pour la répression du chromosome X dans les spermatides	80
RNF8 régule les marques épigénétiques activatrices de la PMSC.....	81
Un modèle pour la régulation transcriptionnelle des chromosomes sexuels dans les spermatides rondes ?.....	84

OBJECTIFS DE LA THÈSE	85
RÉSULTATS.....	87
Article n°1.....	87
Article n°2.....	117
Article n°3.....	147
RÉSULTATS NON-PUBLIÉS.....	218
1. SLX/SLXL1 est enrichie sur la chromatine en l'absence de SLY	218
2. L'interaction entre SSTY et SLX/SLY est essentielle pour leur liaison à l'ADN.....	221
3. SLX/SLXL1 et SLY interagissent <i>in vivo</i> avec SPIN1	224
MATÉRIELS & MÉTHODES.....	227
Immunoprécipitation de la chromatine et séquençage à haut-débit.....	227
Co-immunoprécipitations	227
Retard sur gel (EMSA)	227
DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	230
1. SLY : répresseur de l'activité transcriptionnelle	230
a. Mécanismes de la régulation de la transcription par SLY	230
b. Conséquences de la dérégulation de la transcription sur la compaction de la chromatine.....	234
2. SLY : acteur du conflit intragénomique	238
a. SLX/SLXL1 est enrichie sur la chromatine en l'absence de SLY	238
b. Quel(s) rôle(s) jouent les membres de la famille SSTY/SPIN dans le conflit intragénomique ?..	239
c. Le conflit intragénomique : au-delà des chromosomes sexuels	241
CONCLUSION	247
SLY, un point d'entrée pour l'étude de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels. .	247
BIBLIOGRAPHIE	249

Liste des abréviations

A1, A2, A3, A4	Spermatogonie de type A1-A4
AA	Acide Aminé
A_{al}	Spermatogonie A _{aligned}
A_{pr}	Spermatogonie A _{paired}
A_s	Spermatogonia A _{single}
B	Spermatogonie B
bp	Paire de bases
BRDT	Protéine à bromodomaine spécifique du testicule
ChIP-Seq	Immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage
CMA3	Chromomycine A3
CS	Complexe synaptonemal
DSB	Cassure double brin
FIV	Fécondation <i>in vitro</i>
HDAC	Histone déacétylase
ICSI	Injection intracytoplasmique de spermatozoïde
IF	ImmunoFluorescence
Int	Spermatogonie intermédiaire
Kac	Acétylation de la lysine
Kbu	Butyrylation de la lysine
Khib	2-hydroxyisobutyrylation de la lysine
Kme	Méthylation de la lysine
MAR	Matric Nuclear Attachment Region
MS	Spectrométrie de Masse
MSCI	Meiotic Chromosome Inactivation
MSUC	Meiotic Silencing of Unsynapsed Chromosome
MSYq	Bras long du MSY (spécifique des individus mâles)
NPYq	Segment non-apparié du chromosome Y
PAR	Région Pseudo Autosomale
PGCs	Cellules germinales primordiales
PMA	Procréation médicalement assistée
PMSC	Post-Meiotic Sex Chromatin
Prm1	Protamine 1
Prm2	Protamine 2
PTM	Modification Post-Traductionnelle
SGE	Elément génétique égoïste
SGE	Selfish Genetic Element
shSLX/SLXL1 ou Slx/Slxl1-KD	Souris déficientes en SLX/SLXL1
shSLY ou Sly-KD	Souris déficientes en SLY
SSCs	Cellules souches spermatogoniales
TP1	Protéine de transition 1
TP2	Protéine de transition 2
TSS	Site d'initiation de la transcription
WB	Western Blot
Yp	Bras court du chromosome Y
Yq	Bras long du chromosome Y

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. La spermatogenèse

Chez les hommes âgés de moins de 50 ans, la production quotidienne de spermatozoïdes varie entre 150 et 275 millions [1], ce qui signifie qu'un homme produit entre 1700 et 3000 spermatozoïdes par seconde. La spermatogenèse est le processus biologique qui assure la formation continue de ces spermatozoïdes.

Leur production régulière est assurée par des processus biologiques spécifiques de la spermatogenèse leur permettant de devenir haploïdes et d'acquérir les organelles (flagelle et acrosome) nécessaires à leur fonction reproductrice. Cette différenciation extrême des cellules nécessite des acteurs moléculaires spécifiques, dont certains sont uniquement exprimés pendant la spermatogenèse. Des études mêlant des analyses transcriptomiques et protéomiques ont montré que le testicule est l'organe contenant le plus grand nombre de transcrits, de variants d'épissage et de protéines spécifiquement exprimés dans un tissu [2-6].

Tant au regard de l'histologie que de la chronologie, la spermatogenèse chez l'homme et la souris est remarquablement conservée. Considérant la difficulté des techniques d'études *in vitro* de la spermatogenèse, la souris représente un modèle de prédilection pour l'étude de la spermatogenèse. Sauf précision, seul le modèle murin sera étudié au cours de ce manuscrit.

a. Le testicule

Le testicule est composé d'un tissu interstitiel et de tubes séminifères. Le développement embryonnaire de ces tissus se fait indépendamment l'un de l'autre. Les gonades embryonnaires bipotentielles proviennent de la face ventrale du mésonephros. Au stade embryonnaire E10 chez la souris, l'expression de *Sry* va initier l'acquisition de leur identité sexuelle mâle et la différenciation des cellules somatiques en cellules de Sertoli [7]. En parallèle, les cellules germinales primordiales (PGCs) provenant de l'épiblaste migrent dans les crêtes génitales [8] et commencent à interagir avec les cellules de Sertoli, de Leydig et les cellules myéloïdes. Au stade E12.5, le testicule embryonnaire est formé. Les PGCs vont proliférer intensément jusqu'au stade E13.5. Elles migrent progressivement du centre du tube séminifère vers sa périphérie pour former les prospermatogonies avant de rentrer en

quiescence jusqu'à la naissance où elles formeront les cellules souches spermatogoniales (SSC) et les spermatogonies (Spg) (**Figure 1**) [9, 10].

Au total, ce n'est pas moins de 30 types cellulaires différents qui sont générés au cours du développement embryonnaire et après la naissance [11].

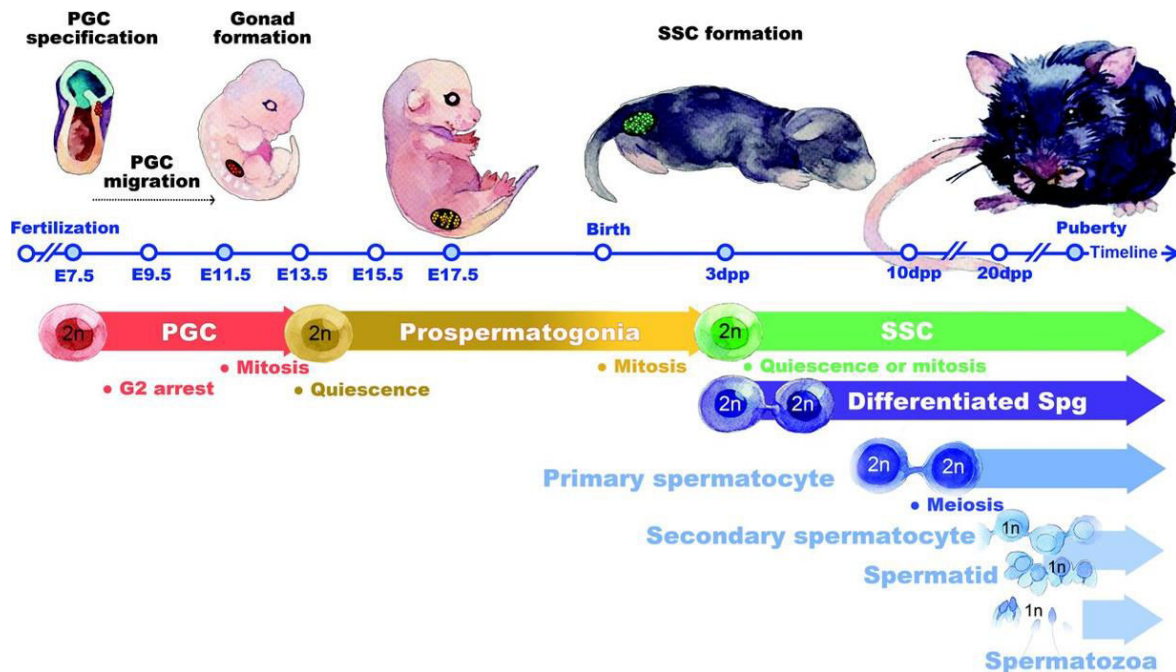


Figure 1. Développement des cellules germinales chez la souris. Au stade embryonnaire E7.5, les PGCs provenant de l'épiblaste migrent jusqu'aux crêtes génitales et témoignent d'une forte activité mitotique. Les PGCs forment alors les prospermatogonies qui restent quiescentes jusqu'à la naissance. Les prospermatogonies se développent en cellules souches spermatogoniales (SSC) et entrent en mitose de 3 à 6 jours après la naissance pour produire des spermatogonies différenciées (Differentiated Spg) et pour renouveler la niche de cellules souches. Un cycle de spermatogenèse peut alors s'engager et les Spg différenciées vont se développer en spermatocytes primaires avant d'entamer une première division méiotique pour devenir spermatocytes secondaires. Ceux-ci vont s'engager dans une deuxième division méiotique et deviennent haploïdes. Une phase de maturation appelée spermiogenèse commence avec le développement des spermatides rondes en spermatides allongés et se conclut par la production de spermatozoïdes. Adapté de [12].

Le tissu interstitiel du testicule est composé de cellules de Leydig, de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques (**Figure 2**). Les cellules de Leydig sont les principales pourvoyeuses de testostérone chez les mâles : elles sont à l'origine de 95% de la testostérone circulante [13].

Les tubes séminifères sont composés de trois catégories de types cellulaires : les cellules fibro-myoïdes (ou péritubulaires), les cellules germinales et les cellules de Sertoli (**Figure 2**). Les cellules myéloïdes sont des cellules mésenchymateuses aplaties et localisées sur la membrane basale des tubes séminifères. Elles détiennent des propriétés communes avec les fibroblastes et d'autres avec les cellules musculaires et sont capables de propulser le fluide testiculaire qui contient les spermatozoïdes immobiles [14]. Elles participent également

à la régulation paracrine des différentes cellules testiculaires et au maintien de la barrière hémato-testiculaire [15, 16]. Cependant, les cellules principalement responsables de la barrière hémato-testiculaire sont les cellules de Sertoli. Véritables cellules nourricières au service des cellules germinales, elles sont indispensables à leur développement et leur maturation. Les cellules de Sertoli représentent approximativement 14% des cellules du tube séminifère chez la souris [17]. Ces cellules sont polarisées et leur apex pointe vers la lumière du tube. Leur morphologie ramifiée leur permet d'accueillir de 30 à 50 cellules germinales au sein de leurs replis cytoplasmiques [18]. Ce sont d'ailleurs ces replis cytoplasmiques et les jonctions serrées (*tight junctions*) du compartiment basal qui constituent la barrière hémato-testiculaire et séparent les compartiments basal et adluminal (**Figure 2**) [19]. Grâce à leur activité de phagocytose, les cellules de Sertoli sont également capables de débarrasser les tubes séminifères des cellules germinales dégénérées et des corps cytoplasmiques résiduels des spermatides allongées [20]. Les cellules de Sertoli sont donc indispensables pour le bon déroulement de chacune des étapes de la spermatogenèse.

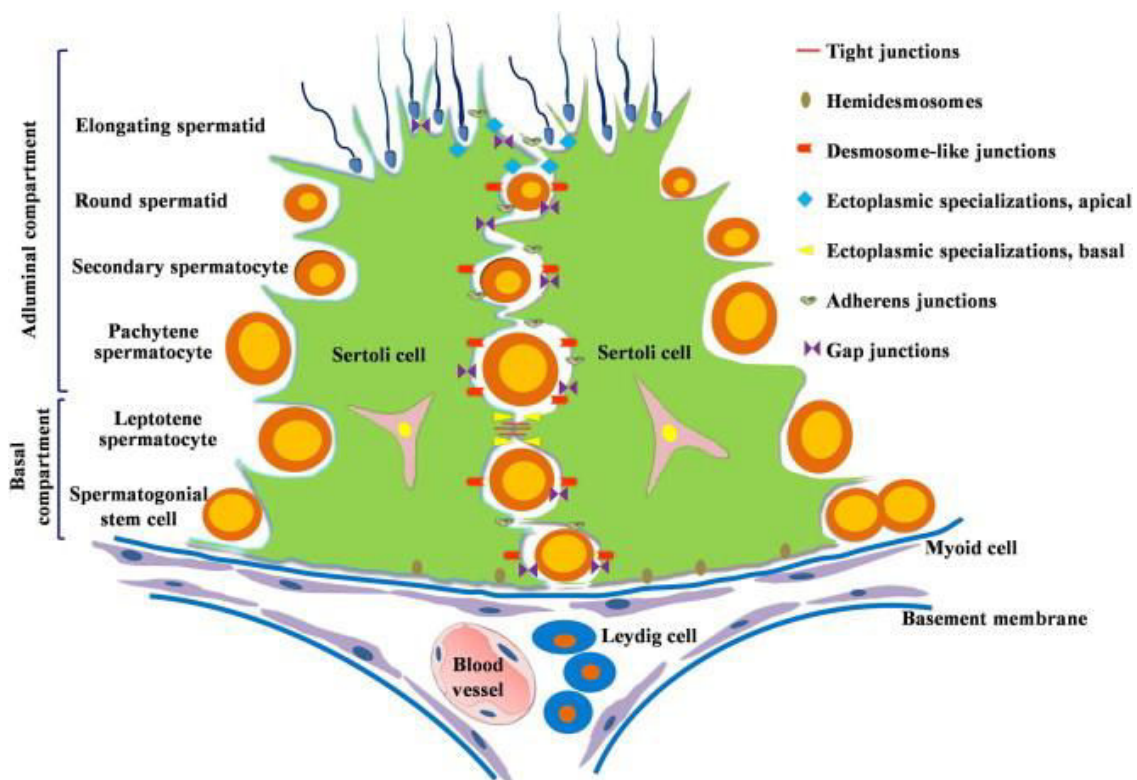


Figure 2. Schéma représentant une section de tube séminifère chez la souris. Le tissu interstitiel est composé de vaisseaux sanguins et des cellules de Leydig (en bleu). Les tubes séminifères sont composés de cellules de myéloïdes accolées à la membrane basale ainsi que de cellules de Sertoli, représentées en vert, et différents types de cellules germinales. Les différents types de jonction dont celles qui permettent de mettre en place la barrière hémato-testiculaire (*tight junction*) et de séparer le tube en deux compartiments basal et adluminal sont également représentés. Extrait de [21].

La spermatogenèse est classiquement divisée en trois phases : une étape de prolifération cellulaire, deux divisions méiotiques et une étape de maturation des spermatides appelée spermiogenèse.

b. La prolifération spermatogoniale

Les spermatogonies sont en contact étroit avec la membrane basale des tubes séminifères et initient la spermatogenèse. Elles sont responsables de l'augmentation de la population de cellules germinales. En effet, ces cellules subissent de 8 à 9 divisions cellulaires avant de se développer en spermatocytes et d'aborder la méiose [22]. Ce qui signifie qu'une unique spermatogonie peut donner jusqu'à 4096 spermatozoïdes.

Plusieurs types de spermatogonies coexistent dans le testicule. La première de cette longue lignée est appelée spermatogonie A_{single} ou A_{isolated} . Ces spermatogonies sont des cellules souches capables de s'auto-renouveler ou de se différencier (**Figure 3**) [23]. Au contraire des spermatogonies différenciées, elles possèdent des noyaux avec très peu d'hétérochromatine et ne sont pas reliées l'une à l'autre par des ponts cytoplasmiques [24].

Les cellules A_{single} vont ensuite se différencier en spermatogonies A_{paired} (**Figure 3**). A partir de ce stade, la cytokinèse des cellules ne sera plus complète et elles seront dorénavant reliées entre elles par un pont cytoplasmique. Cette curiosité biologique permet l'échange efficace de composants cytoplasmiques et de synchroniser les cellules pendant la spermatogenèse [22]. Ce phénomène permet également d'homogénéiser le contenu des cellules et, lorsque celles-ci seront haploïdes, de limiter toute expression gamétique différentielle qui pourrait aboutir à une transmission préférentielle de certains allèles [25]. Les cellules A_{paired} vont subir de deux à trois divisions mitotiques et former des chapelets de 4 à 16 cellules dénommées A_{aligned} (**Figure 3**).

Les spermatogonies A_{aligned} vont se différencier en spermatogonies différenciées A_1 . Alors que la transformation de A_{aligned} à A_1 se passe pendant la phase G_0/G_1 de la cellule, cinq divisions cellulaires successives ont lieu pour former les spermatogonies B (**Figure 3**). Les cellules spermatogoniales B passent par une ultime division mitotique afin de former les spermatocytes pré-leptotènes et de pouvoir amorcer la phase de division mitotique.

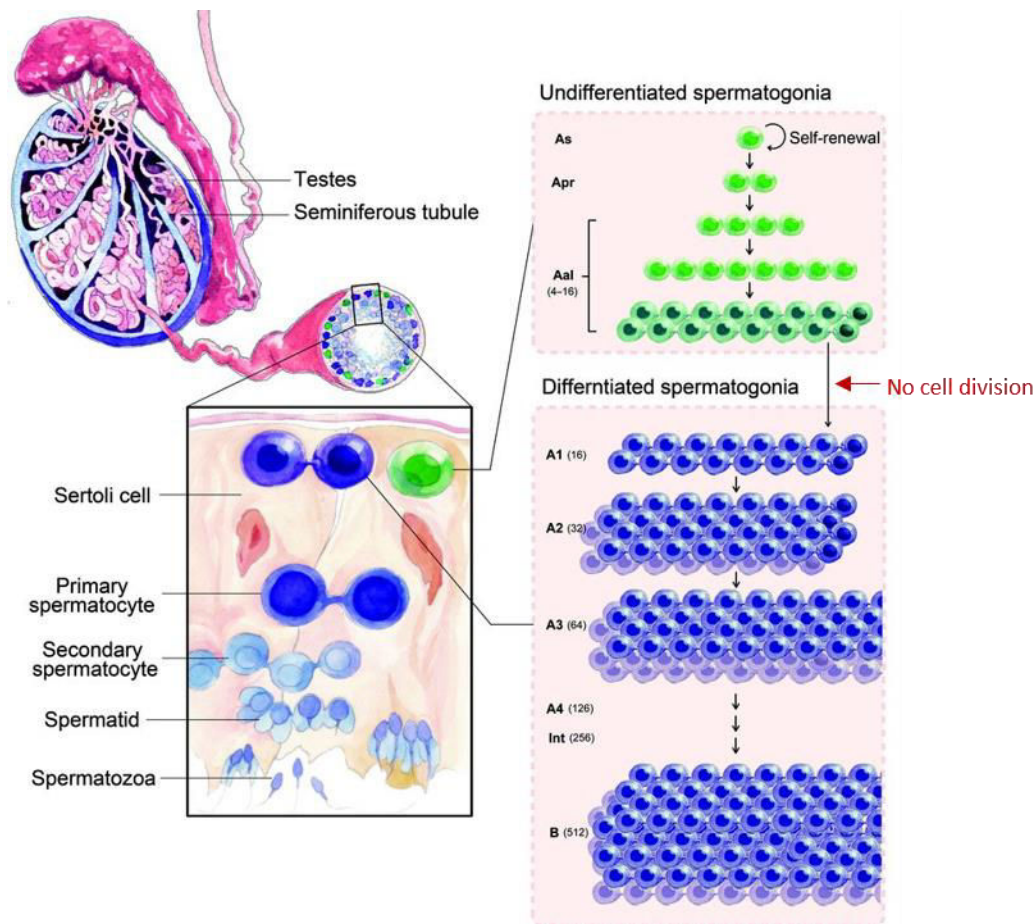


Figure 3. Vue d'ensemble de la prolifération spermatogoniale. Illustration d'une coupe transversale d'un testicule et d'un tube séminifère de souris, à gauche. Les spermatogonies non-différenciées (vertes) sont situées le long de la lame basale. Les cellules A_s sont à la fois capable de s'auto-renouveler mais aussi de s'engager dans la voie de la différenciation spermatogoniale grâce à plusieurs divisions mitotiques successives pour devenir des cellules A_{al} (bleues foncées). Par simple transformation, les spermatogonies se différencient et après cinq divisions mitotiques vont finalement former des spermatogonies B. Les spermatocytes primaires sont le produit d'une division mitotique supplémentaire et s'engagent ensuite dans deux divisions méiotiques consécutives pour former les spermatides haploïdes. Les spermatides vont ensuite évoluer jusqu'à former des spermatozoïdes matures. A_s , spermatogonie A_{single} ; A_{pr} , spermatogonie A_{paired} ; A_{al} , spermatogonie $A_{aligned}$; A1, A2, A3, A4, spermatogonie de type A1-A4 ; Int, spermatogonie intermédiaire ; B, spermatogonie B. Adapté de [12].

c. La méiose

Les spermatocytes pré-leptotènes contiennent deux copies de chaque chromosome (paternel et maternel) et chacune des chromatides sœurs obtenues par la réplication de l'ADN précédant la méiose sont maintenues l'une à l'autre grâce à un complexe multiprotéique appelé cohésine [26]. Leur matériel génétique dupliqué, les cellules peuvent alors s'engager dans la méiose et subir successivement une division réductionnelle et une division équationnelle (**Figure 4**).

La première division méiotique s'engage avec la prophase I qui peut être subdivisée en cinq stades. Trois événements marquent le début du stade **leptotène** : la compaction de l'ADN, la formation du complexe synaptonemal (CS) et l'initiation des cassures double brin de l'ADN (DSB pour *Double Strand Break*) [27, 28]. Au stade **zygotène**, afin d'obtenir un strict appariement des chromosomes homologues, une synapse est formée entre eux par le CS. Une fois la synapse achevée, des recombinaisons surviennent entre les deux chromosomes homologues compactés et les DSB sont réparées au stade **pachytène**. L'apparition des DSB et leur réparation produiront des échanges de matériel entre chromosomes homologues appelés enjambements (*crossovers*) contribuant au brassage génétique lors de la reproduction. Chez la souris, l'absence d'événements de recombinaisons homologues ou de synapses entraîne un arrêt de la méiose en phase pachytène et une infertilité [29-35]. La synapse disparaît au stade **diplotène** et les chromosomes homologues ne sont maintenant plus reliés que par les chiasmats provenant des événements de recombinaisons antérieurs (**Figure 4**).

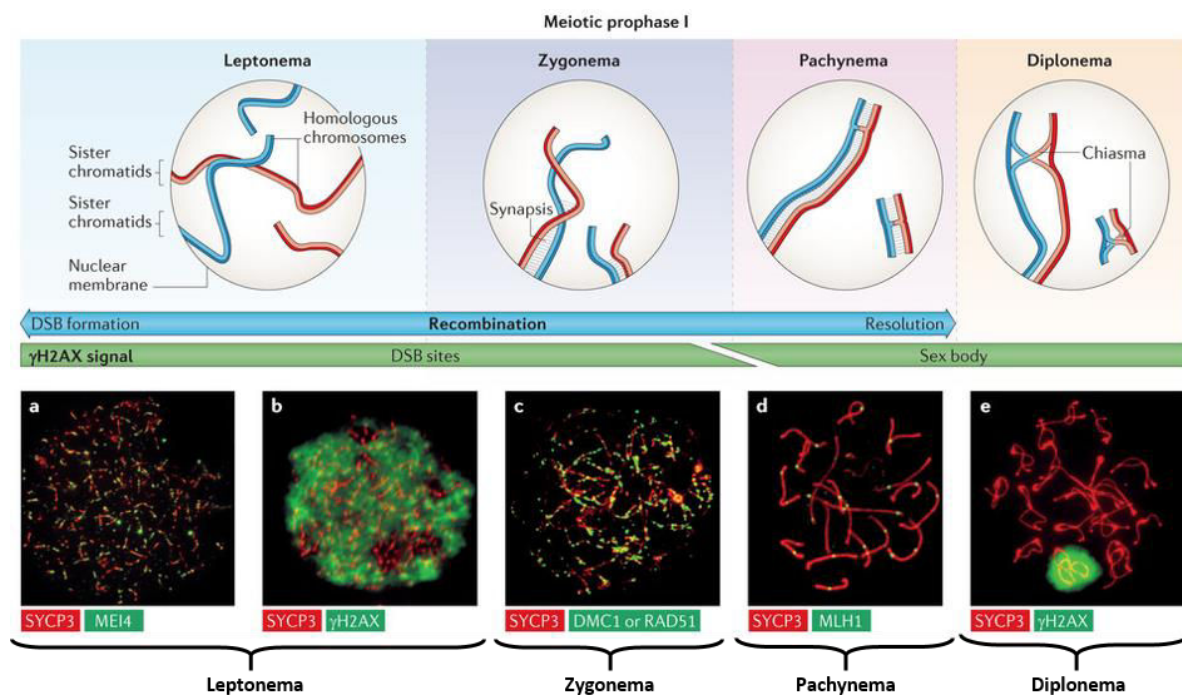


Figure 4. Schéma détaillé de l'organisation des chromosomes pendant la prophase I lors de la méiose. En haut, deux paires de chromosomes homologues avec leurs chromatides sœurs sont illustrées. Les cassures double brin sont initiées au stade leptotène et engendrent les événements de recombinaisons qui apparaissent au stade pachytène et sont résolus lors du stade diplotène. Les éléments latéraux du complexe synaptonémal commencent à s'assembler au stade leptotène pour former la synapse du stade zygotène jusqu'au stade pachytène. **a-b.** Au stade leptotène, la protéine spécifique de la méiose MEI4 colocalise avec une protéine du complexe synaptonémal SYCP3 qui permet de localiser l'axe des chromosomes. H2AX phosphorylé (γH2AX) apparaît lors des cassures doubles brins. **c.** Les protéines de réparation de l'ADN DMC1 et RAD51 sont mobilisées aux points de cassures double brin lors du stade zygotène. **d.** MLH1 est un marqueur de recombinaisons homologues entre les chromosomes qui ont lieu pendant le stade pachytène. **e.** Alors que le signal de γH2AX a disparu sur les autosomes, il est enrichi sur les chromosomes sexuels au stade diplotène. DSB, cassure double brin. Adapté de [36].

La **diacinèse** conclut cette première division : les chiasmas et l'enveloppe nucléaire disparaissent progressivement. Les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique et deux spermatocytes secondaires contenant un chromosome de chaque paire sont obtenus à la fin de l'anaphase I. La prophase II est beaucoup plus brève : l'ADN des chromosomes est déjà compacté et les chromosomes peuvent immédiatement s'engager dans la division équationnelle pour générer quatre spermatides rondes haploïdes.

Le complexe synaptonémal

Le complexe synaptonémal se met en place dès le début de la prophase I. Les éléments axiaux se forment le long des chromosomes pendant la phase leptotène. Au stade zygotène ils deviennent les éléments latéraux et sont rattachés les uns aux autres avec la participation de l'élément central et des filaments transverses qui forment la région centrale (**Figure 5**).

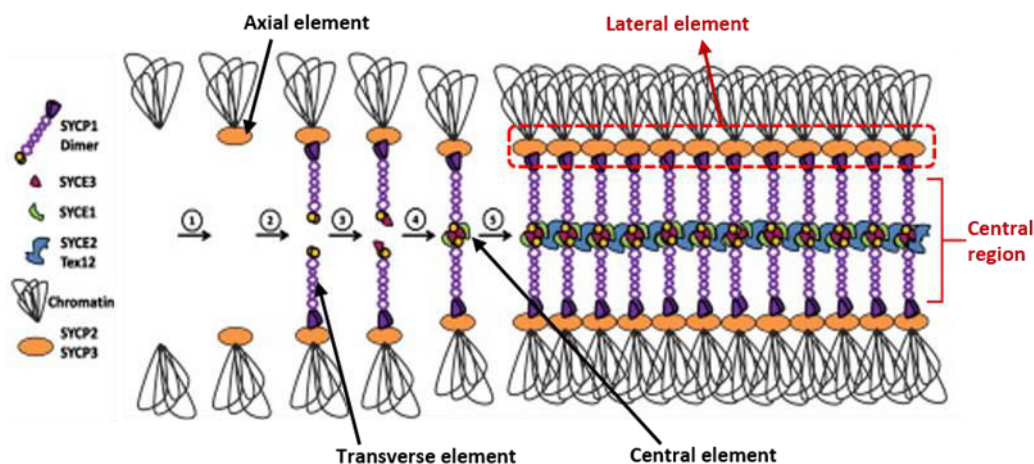


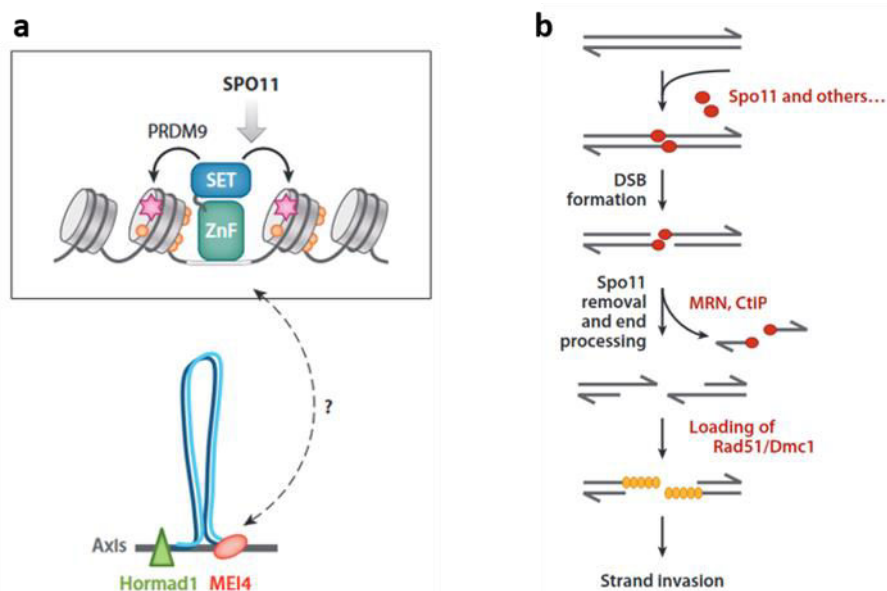
Figure 5. Assemblage du complexe synaptonémal. Les éléments axiaux (SYCP2/3) interagissent avec les boucles de chromatines et s'assemblent pour former les éléments latéraux. Ils vont s'aligner et être ancrés à la région centrale composée de l'élément central (SYCP1) et des filaments transversaux (SYCE1-3 et Tex12). Adapté de [37].

Sept protéines participent à ce complexe. Les éléments transversaux sont composés d'homodimères de SYCP1 qui s'assemblent, avec leur domaine central, en super hélice α (ou *coiled-coil*) [38]. SYCP1 interagit directement avec SYCE1 [39] qui compose l'élément central avec SYCE2, SYCE3 et Tex12 [40, 41]. SYCP2 et SYCP3 composent les éléments axiaux (**Figure 5**) [42]. SYCP2, capable d'interagir à la fois avec SYCP1 et SYCP3, permet de relier les filaments transversaux et l'élément latéral [33, 43].

L'assemblage du complexe synaptonémal est concomitant avec la présence de DSB (**Figure 4**). Cette simultanéité dans le temps reflète le lien très fort qui existe entre ces deux processus. En effet, l'apparition et la prise en charge des DSB sont indispensables pour l'assemblage de la synapse et l'appariement des chromosomes. Inversement, les protéines du complexe synaptonémal SYCP2 et SYCP3 favoriseraient la recombinaison entre chromosomes homologues plutôt qu'entre chromatides sœurs afin de générer un brassage génétique plus conséquent lors de la production des gamètes [44].

Les cassures doubles brins et la recombinaison homologue

La recombinaison entre chromosomes homologues est initiée par de nombreuses cassures double brin de l'ADN qui apparaissent dès le stade leptotène (**Figure 4**). Lors de la réparation, certaines cassures double brin génèrent des enjambements (*crossover*) et l'échange de matériel génétique entre chromosomes homologues. De 250 à 300 sites de cassures sont présents dans les spermatocytes et ils engendreront au minimum un enjambement par paire de chromosomes [45].



Chez la souris, la localisation des sites de cassures double brin de l'ADN est déterminée par PRDM9 (**Figure 6a**) [47]. Cette protéine possède un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine méthyltransférase qui lui permet de catalyser la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3). Bien que le rôle de H3K4me3 dans la détermination des sites de cassure double brin de l'ADN ne soit pas encore complètement élucidé, il semblerait que PRDM9, par son action catalytique, empêche la formation de cassures double brin dans les promoteurs et les régions régulatrices enrichies en H3K4me3, comme cela a été précédemment observé chez des souris déficientes en PRDM9 [48]. La protéine MEI4 ainsi que la protéine Hormad1, localisées au niveau de l'axe formé par les éléments latéraux du CS, sont indispensables à la formation des cassures double brin et à leur relocalisation axiale au stade zygotène (**Figure 6a**) [49, 50]. PRDM9 promeut alors la fixation et l'activation de la protéine SPO11 qui génère la quasi-totalité des cassures double brin pendant la méiose (**Figure 6b**). Le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) et la protéine CtIP vont effectuer une résection de l'ADN pour permettre la production d'une longue séquence d'ADN simple brin avec une extrémité 3' libre [51]. Le complexe MRN recrute et active ATM qui phosphoryle H2AX (γ H2AX) [52, 53]. Le simple brin d'ADN est alors recouvert de protéines RPA qui sont rapidement remplacées par les recombinaisons Rad51 et DMC1 : cet événement permet l'invasion du chromosome homologue par le simple brin d'ADN (**Figure 6b**) [54].

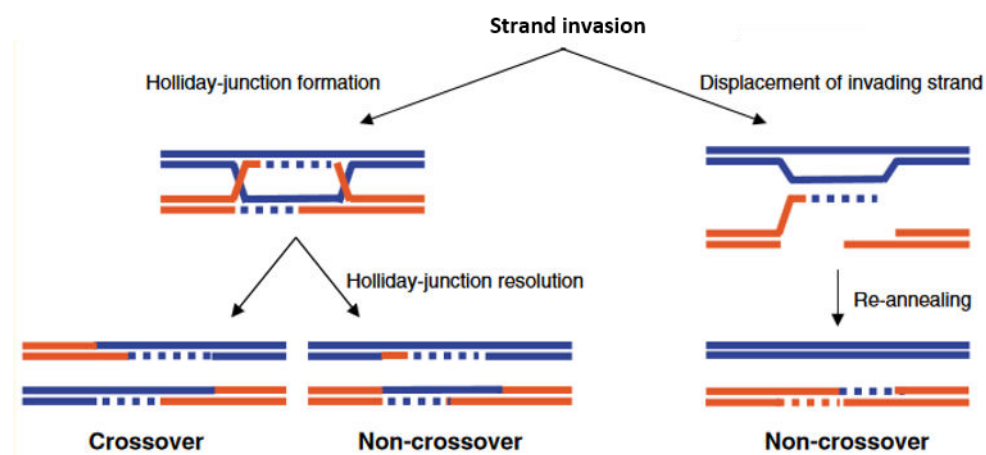


Figure 7. Différentes voies de réparation des cassures simples brins. La résolution des cassures par la formation d'une jonction de Holliday aboutit soit à un enjambement (*crossover*) soit à une conversion de gènes limités (*non-crossover*). Après l'invasion des chromosomes homologues et réparation du brin réséqué, le simple brin peut se déplacer et se relier avec son brin initial avec échange limité de matériel et sans enjambement (*non-crossover*). Adapté de [55].

Chez la souris, le nombre de cassure double brin est dix fois plus élevé que le nombre d'enjambements ou *crossovers* [36]. En fonction de la voie de régulation engagée pour la réparation de l'ADN, toutes les cassures doubles brins ne génèrent donc pas des

enjambements. Si l'invasion de l'ADN simple brin donne lieu à un échange réciproque de matériel génétique entre les homologues sur un large intervalle chromosomique, alors il y a eu enjambement. Si la réparation n'aboutit qu'à un échange limité et non-réciproque de matériel génétique, on parle alors de conversions de gènes. (**Figure 7**).

Contrairement aux autosomes, les deux chromosomes sexuels X et Y sont extrêmement hétéromorphiques et ne partagent qu'une petite portion homologue appelée région pseudo-autosomale (PAR pour *Pseudo-Autosomal Region*). Lors du stade zygotène, la synapse s'assemble uniquement sur la PAR des chromosomes sexuels [56]. Alors que ces chromosomes subissent, au même titre que les autosomes, une vague de cassure double brin, ils ne peuvent s'engager dans la voie de réparation de l'ADN par recombinaison homologue en l'absence de synapse et d'appariement en dehors de la PAR [57]. Les cassures double brin ne peuvent être résolues immédiatement et les marqueurs de ces cassures (Rad51 et DMC1) perdurent plus longtemps sur les chromosomes sexuels que sur les autosomaux [45, 57]. Les chromosomes sexuels sont alors compartimentés dans une vésicule sexuelle (ou *XY body*) et leur activité transcriptionnelle sera réprimée jusqu'à la fin de la méiose. Cet événement appelé *meiotic sex chromosome inactivation* (MSCI) est fondamental pour la poursuite de la spermatogenèse et la fertilité de l'individu [58-60].

Meiotic Sex Chromosome Inactivation (MSCI)

Une des marques les plus prégnantes du MSCI est la persistance de γ H2AX sur les chromosomes sexuels (**Figure 8**) [61]. Alors qu'au stade pachytène, cette marque est complètement perdue par les autosomes, une seconde vague de phosphorylation par la protéine **ATR** permet le maintien de γ H2AX sur les chromosomes X et Y [62]. La protéine BRCA1 permet le recrutement et la distribution de la protéine ATR et de son activateur TOPBP1 sur l'axe des chromosomes non-appariés [63]. La protéine Hormad1, ainsi que la protéine du CS SYCP3 permettent l'accumulation de BRCA1 sur les chromosomes non-appariés [64, 65]. La diffusion de γ H2AX par ATR sur toutes les boucles de chromatines (reliées aux éléments axiaux du CS) est assurée par la protéine MDC1 [59].

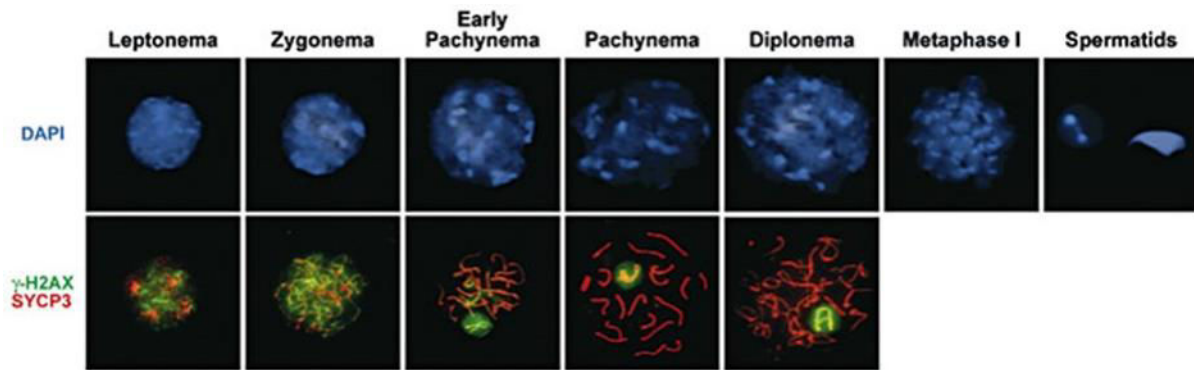


Figure 8. Evolution du marquage γ H2AX pendant et après la méiose. Marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) et immunodétection du complexe synaptonémal grâce à SYCP3 (rouge) et des cassures double brin par γ H2AX (vert). Alors que la résolution des cassures double brin sur les autosomes se manifeste par une disparition du signal γ H2AX au stade pachytène, les chromosomes sexuels vont former la vésicule sexuelle et être transcriptionnellement réprimés. Adapté de [61].

Après l'initiation du MSCI, les histones des chromosomes X et Y vont arborer différentes modifications post-traductionnelles (PTMs pour *Post-Translational Modifications*) qui participent à la répression transcriptionnelle, telles que l'ubiquitinylation des histones H2A (H2Au) ou encore la di- et triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2 et H3K9me3) (**Figure 9**) [66-68]. Les protéines CBX1 (HP1 β) et CBX3 (HP1 γ), connues pour interagir avec H3K9me3, sont également enrichies sur la chromatine des chromosomes sexuels (**Figure 9**) [69, 70]. Des variants d'histones sont aussi spécifiquement incorporés à la chromatine sexuelle tel que le variant d'histone macroH2A1.2, dont la fonction reste actuellement obscure, et H3.3 qui remplace le variant H3.1 spécifique de la réplication (**Figure 9**) [71, 72].

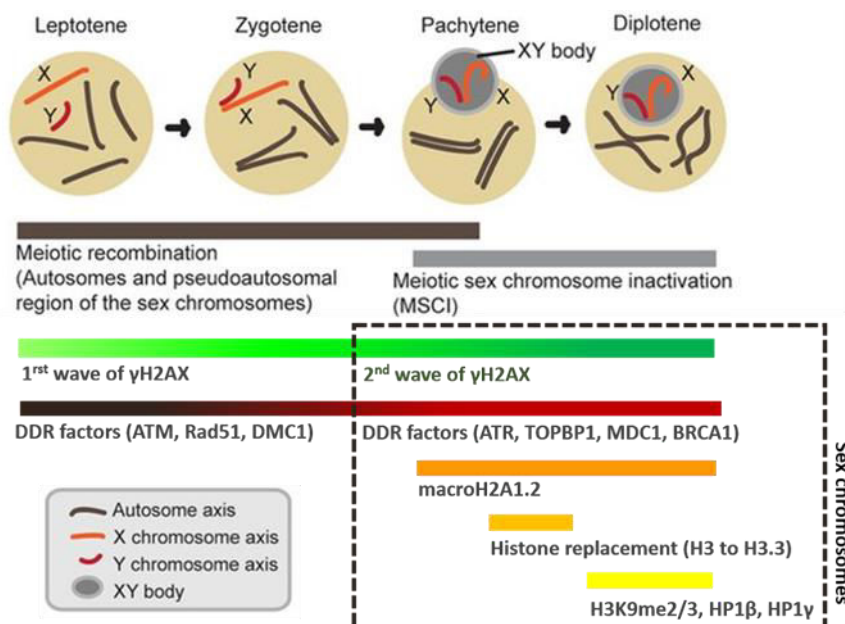


Figure 9. Dynamique des marques épigénétiques présentes sur les chromosomes sexuels à l'initiation du MSCI. Après la seconde vague de phosphorylation de γ H2AX, la voie de signalisation du MSCI se met en place grâce au recrutement d'ATR et de son activateur TOPBP1 par la protéine BRCA1. Une fois les MSCI initiés, l'incorporation du variant d'histones macroH2A1.2 et le remplacement de H3.1 et H3.2 par H3.3 prend place. La mise en place de marques épigénétiques répressives a lieu pendant la transition pachytène-diplotène. Adapté de [73].

Bien que les marqueurs du MSCI soient actuellement très bien renseignés, les mécanismes de réparation des cassures double brin, ultérieurs à la répression transcriptionnelle généralisée des chromosomes sexuels, ne sont pas encore clarifiés. De même, plusieurs hypothèses concernant le (ou les) rôle(s) du MSCI ont été proposées mais, à ce jour, aucune d'entre elles n'a pu être formellement (in)validée. Le MSCI fait partie d'un phénomène plus large appelé *meiotic silencing of unsynapsed chromosomes* (MSUC) qui aboutit à la répression transcriptionnelle de n'importe quel chromosome non-apparié.

- Réparation des cassures double brin : Un des rôles supposés du MSUC pourrait être la réparation des cassures double brin d'un chromosome non-apparié en utilisant la chromatide sœur comme matrice de réparation en l'absence de chromosome homologue. L'étude de la persistance des cassures double brin dans les modèles murins déficients dans l'initiation du MSCI (souris invalidée pour *Brca*, *Atr*, *Mdc1* ou *H2ax*) pourrait permettre de confronter cette hypothèse. Parallèlement, les cassures double brin étant à l'origine des recombinaisons par enjambements entre chromosomes, la répression transcriptionnelle des chromosomes sexuels hétéromorphiques et la réparation efficace des cassures double brin pourraient éviter toutes recombinaisons non-homologues entre eux [74].

- Point de contrôle de la prophase I : La répression transcriptionnelle pourrait agir comme senseur de cassures double brin non-résolues et empêcher la cellule de s'engager plus en avant dans la prophase. En effet, quand les protéines BRCA1 et ATR sont maintenues sur les cassures double brin, la voie de signalisation p53/Chk2/p63 est activée et déclenche un arrêt de la prophase I [75]. De plus, le MSUC pourrait également détecter les chromosomes non-appariés et empêcher la formation de gamètes haploïdes. En utilisant des souris présentant une translocation entre le chromosome X et le chromosome 16, Turner et al. ont démontré que les problèmes de mise en place de la synapse et d'appariement des chromosomes 16 débouchent sur un arrêt en prophase I de la méiose [76].

- Répression de gènes létaux pour les spermatocytes : Le contenu génétique des chromosomes X et Y, quand il est ectopiquement exprimé pendant la méiose, s'avère léthal pour les cellules [60]. Le rôle du MSUC (et donc du MSCI) pourrait être simplement d'empêcher l'expression de gènes qui bloquent l'avancée dans la méiose. Dans ce cas, l'arrêt de la méiose en prophase I observée en présence des autosomes non-appariés est

directement provoqué par la répression transcriptionnelle de gènes essentiels au développement des cellules germinales.

Aucune de ces hypothèses n'est mutuellement exclusive et les recherches à l'aide de modèles murins déficients pour l'initiation des cassures double brin ou pour les recombinaisons homologues pourront certainement fournir des réponses à ces questions.

d. La spermiogenèse

Arrivées à cette étape de la spermatogenèse, les cellules germinales ont vu leur effectif se multiplier lors de la première étape de prolifération cellulaire et leur matériel génétique être divisé par quatre grâce à la méiose. L'activité transcriptionnelle de ces cellules haploïdes rondes va progressivement décliner avant d'être globalement réprimée dans les spermatides allongées. Les spermatides rondes vont également s'engager dans un processus de maturation leur permettant d'obtenir les caractéristiques essentielles à leur capacité de fécondation : un noyau compacté pour protéger leur message génétique qui s'accompagne d'un arrêt de la transcription, un flagelle pour se déplacer à travers l'appareil génital féminin et un acrosome pour atteindre l'ovule.

Post-meiotic sex chromatin (PMSC)

A la fin de la méiose, les marqueurs des cassures double brin et de la répression transcriptionnelle (BRCA1, ATR, TOPBP1, MDC1 et γ H2AX) disparaissent des chromosomes X et Y [73, 77]. Dans les spermatides rondes haploïdes formées, les chromosomes sexuels forment une structure accolée au chromocentre et visible au DAPI (**Figure 12a**) suggérant que la chromatine sexuelle serait plus condensée et transcriptionnellement réprimée. Les chromosomes X et Y conservent la plupart des protéines associées à l'hétérochromatine et des marques épigénétiques répressives (telles que H3K9me3, CBX1 et CBX3) mises en place pendant le stade pachytène (**Figure 9** et **Figure 12b-e**) [73, 77]. D'autres marques épigénétiques corrélées à une répression de la transcription apparaissent également : les histones H3 et H4 sont intensivement déacétylées après la méiose [72].

En 2006, l'étude transcriptomique menée par Namekawa et al. révèle que la répression transcriptionnelle des chromosomes sexuels initiée pendant la méiose est maintenue dans les

spermatides rondes : d'après leurs résultats, 87% des gènes portés par le chromosome X sont réprimés après la méiose [73]. La même année, Turner et al. utilisent un modèle d'insertion d'une portion du chromosome 7 à l'intérieur du chromosome X et découvrent que ce segment du chromosome 7 subit les effets du MSUC : ce segment est enrichi en H3K9me3 et aucune activité transcriptionnelle n'a pu être détectée pendant et après la méiose [76].

Cependant, de nombreux gènes nécessaires à la spermiogenèse sont activés dans les spermatides rondes, après la méiose [78, 79]. La présence de variants d'histones ainsi que de PTMS d'histones, positivement associés à l'expression génique, sur la chromatine des chromosomes sexuels pourrait être responsable de l'activation de ces gènes.

- Modifications post-traductionnelles des histones de la PMSC

Par immunofluorescence (IF), il a été rapporté que des **marques épigénétiques** activatrices comme H3K4me3 ne sont pas systématiquement exclues de la chromatine sexuelle, contrairement à la marque épigénétique H3K27me3, importante pour l'inactivation du chromosome X et associée à une répression de la transcription (**Figure 12h-i**) [72, 73, 80]. Certaines marques activatrices (Kcr, H4K8Ac, H4K12Ac, H4K8hib et H3K4me2) semblent être enrichies sur la chromatine sexuelle par IF (**Figure 12j-m**) [67, 72, 81-83]. La crotonylation (Kcr) et la 2-hydroxyisobutyrylation (Khib) sont deux formes d'acylation post-traductionnelles de la lysine récemment identifiées (**Figure 10**) [81, 84, 85].

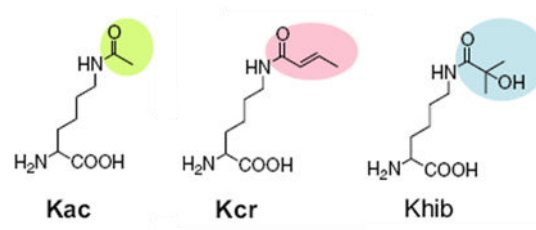


Figure 10. Formules semi-développées des différentes acylations de la lysine. Le groupe acyle est indiqué par un ovale de couleur. Kac, acétylation de la lysine ; Kcr, crotonylation de la lysine ; Khib, 2-hydroxyisobutyrylation de la lysine. Extrait de [86].

Ces deux marques (Kcr et Khib) ainsi que l'acétylation (Kac) sont globalement enrichies sur les sites d'initiation de la transcription (TSS pour *Transcription Start Site*) de gènes fortement exprimés et sont donc associées à une expression génique importante [81, 84]. La comparaison des jeux de données générés par immunoprécipitation de la chromatine combinée à du séquençage haut-débit (ChIP-Seq pour *Chromatin Immunoprecipitation-*

Sequencing) a permis d'appréhender avec plus de finesse la dynamique de ces marques sur la chromatine sexuelle lors de la méiose et la spermiogenèse. Peu présentes sur la chromatine sexuelle des spermatocytes, les marques épigénétiques activatrices Kcr et Khib sont enrichies sur les TSS des gènes portés par le chromosome X et exprimés dans les spermatides rondes (Spc<RS) (**Figure 11a et c**) [81, 84]. De manière surprenante, la marque Kac est retrouvée enrichie sur le chromosome X des spermatides rondes pour un nombre limité de promoteurs (**Figure 11b**) [87]. Cependant, plus que la quantité absolue de la marque Kcr sur la chromatine, il semblerait que le rapport Kcr/Kac soit essentiel pour favoriser ou, au contraire, réprimer l'activité transcriptionnelle. En effet, alors que les protéines à bromodomaine BET telles que BRDT ou BDR4 sont capables de reconnaître les résidus acétylés des histones et de promouvoir l'activité transcriptionnelle, la présence unique de Kcr n'est pas suffisante pour leur recrutement sur le TSS des gènes [86].

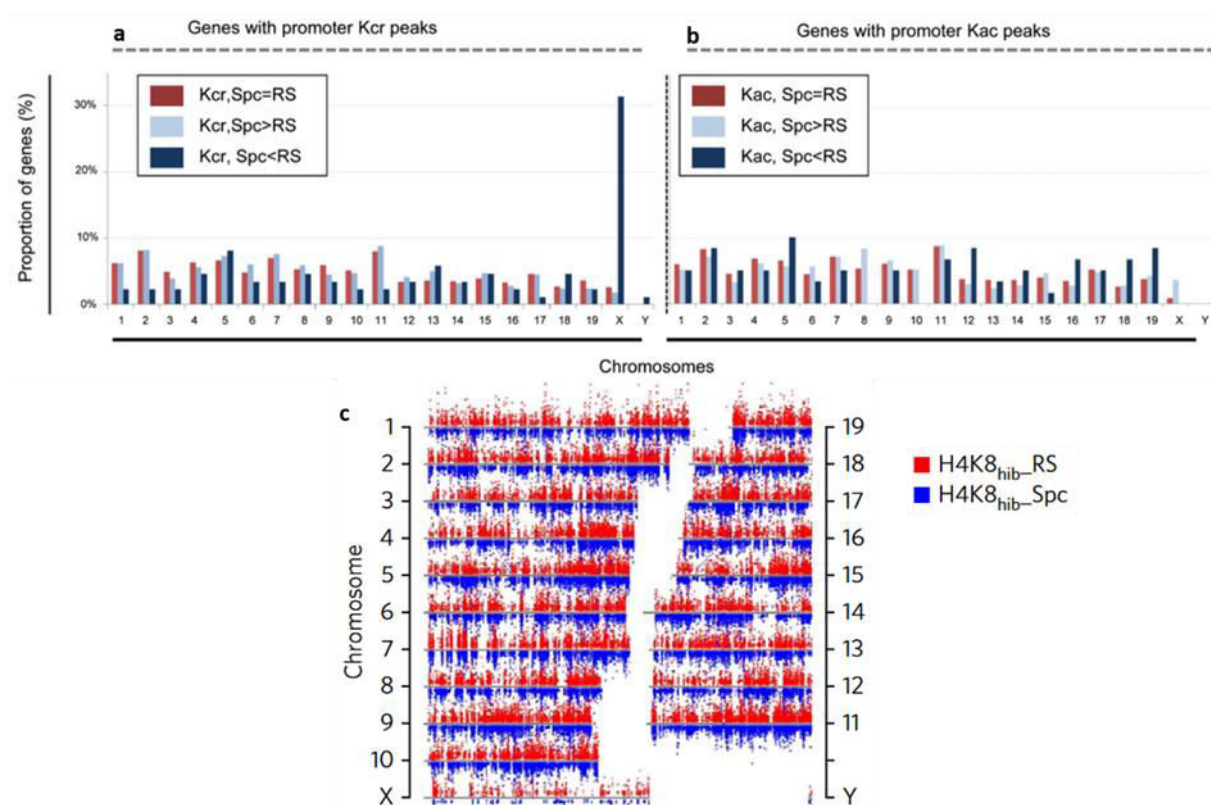


Figure 11. Les marques épigénétiques Kcr et Khib sont enrichies sur les promoteurs des gènes portés par les chromosomes X et Y et exprimés dans les spermatides ronds. a-b. Proportion de gènes dont le promoteur comprend un enrichissement significatif de Kcr et de Kac (Spc=RS, enrichissement équivalent de Kcr sur les promoteurs des spermatocytes par rapport à ceux des spermatides ronds ; Spc>RS, enrichissement supérieur de Kcr sur les promoteurs des spermatocytes par rapport à ceux des spermatides ronds ; Spc<RS, enrichissement inférieur de Kcr sur les promoteurs des spermatocytes par rapport à ceux des spermatides ronds). c. Distribution des pics obtenus après ChIP-Seq. Les pics obtenus dans les populations de spermatides ronds sont indiqués en rouge. Les pics obtenus dans les populations de spermatocytes sont indiqués en bleu. Extraits de [84, 87].

- Les variants d'histones de la PMSC

Les variants d'histones H2A.B3 (initialement appelé H2A.Lap1), H2AZ et H3.3 sont intégrés dans les nucléosomes de la chromatine sexuelle (**Figure 12j-k**) [72, 88, 89]. Différent de son correspondant canonique H3.1 par seulement quatre acides aminés chez la souris, le variant d'histone H3.3 est trouvé fortement enrichi sur le promoteur des gènes actifs et positivement corrélé à H3K4me3 et à des régions transcriptionnelles actives [90]. Contrairement à H3.3, la corrélation entre la présence de H2A.Z et l'activation de la transcription n'est pas aussi simple : de nombreuses modifications post-traductionnelles modulent son action et peuvent lui faire endosser les rôles *a priori* contradictoires d'activateurs et de répresseurs de l'activité transcriptionnelle [91]. Toutefois, il est à noter que la combinaison de H2A.Z et H3.3 produit des nucléosomes instables et labiles favorisant l'apparition de régions sans nucléosome et l'activation de la transcription [92]. Quant au variant H2A.B3 (exprimé spécifiquement dans le testicule et particulièrement enrichi dans les spermatides rondes), sa caractérisation par Soboleva et al. est relativement récente et démontre que l'incorporation de H2A.B3 dans le nucléosome est capable de provoquer un plus grand relâchement de la chromatine. H2A.B3, aussi appelé H2A.Lap1 pour '*lack of acidic patch 1*', n'autorise qu'un repliement partiel de la molécule d'ADN et ne protège que 120 bp par particule au lieu de 146 bp [88]. En menant des expériences de vitesse de sédimentation de nucléosomes assemblés *in vitro*, l'équipe de Tremethick a montré que dans des conditions permettant normalement l'organisation de la chromatine en fibre de 30nm, la chromatine ayant incorporée H2A.B3 n'atteignait jamais un niveau d'organisation plus compact qu'une fibre de 10nm. De plus, les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies de séquençage à haut débit (ChIP-Seq) faites sur des testicules de souris juvéniles indiquent que H2A.B3 est enrichi aux sites d'initiation de transcription des gènes activés pendant la spermiogenèse. Plus spécifiquement, en comparant leurs données de ChIP-Seq à l'analyse du microarray de Namekawa et al., ils découvrent que H2A.B3 est enrichi aux TSS des gènes encodés par le chromosome X et (ré)activés après la méiose [88].

Face à ces faisceaux de preuves contradictoires et au défi technique soulevé par le séquençage et la cartographie des gènes encodés par les chromosomes sexuels (tous deux riches en séquences répétées), le statut transcriptionnel des chromosomes sexuels après la méiose continue d'être une source de débats et de recherches.

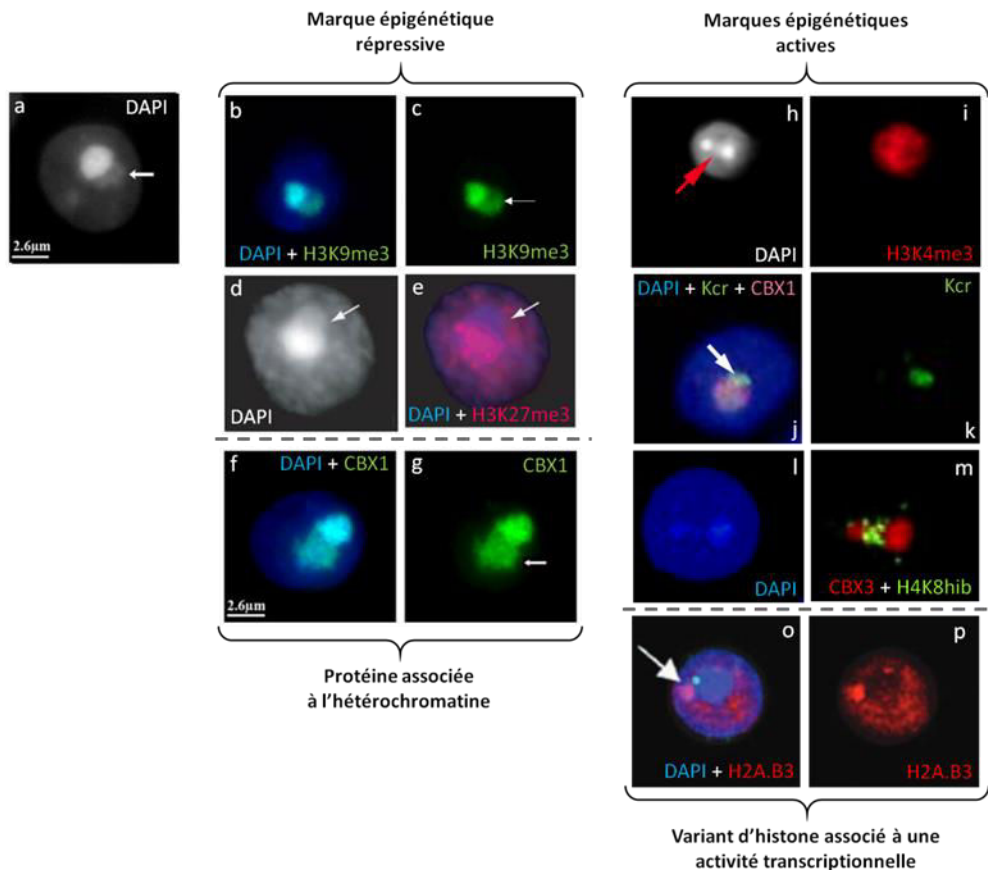


Figure 12. Localisation de CBX1 et H2A.B3 ainsi que des marques épigénétiques répressives et actives dans des spermatides rondes, après la méiose. La chromatine sexuelle est indiquée grâce à une flèche rouge ou blanche **a**. La chromatine sexuelle après la méiose forme une structure plus dense, accolée au chromocentre et visible en DAPI. **b-c**. Immunodétection de H3K9me3 (vert) qui colocalise avec la chromatine sexuelle. Extrait de [93]. **d-e**. Immunodétection de H3K27me3 (rouge) qui est exclue de la chromatine sexuelle. Extrait de [73]. **f-g**. Immunodétection de CBX1 (vert) colocalisant avec la chromatine sexuelle. Extrait de [94]. **h-i**. Immunodétection de H3K4me3 (rouge) présent dans tout le noyau de la cellule excepté au niveau du chromocentre. Images fournies par J. Cocquet. **j-k**. Immunodétection de Kcr (crotonylation de la lysine) qui est enrichie sur la chromatine sexuelle. Extrait de [81]. **l-m**. Immunodétection de H4K8hib (2-hydroxyisobutyrylation de la lysine) qui est enrichie sur la chromatine sexuelle. Extrait de [84]. **n-o**. Immunodétection du variant d'histone H2A.B3 enrichi au niveau de la chromatine sexuelle. Extrait de [88].

Compaction de l'ADN nucléaire

Chez la souris, le volume du noyau des spermatides rondes est réduit jusqu'à dix fois pour être contenu dans la tête allongée du spermatozoïde. Alors que la cellule s'allonge de plus en plus, la compaction extrême du noyau est rendue possible avec le remplacement des histones par des protamines, petites protéines extrêmement basiques qui interagissent et réorganisent la chromatine du spermatozoïde (**Figure 13**).

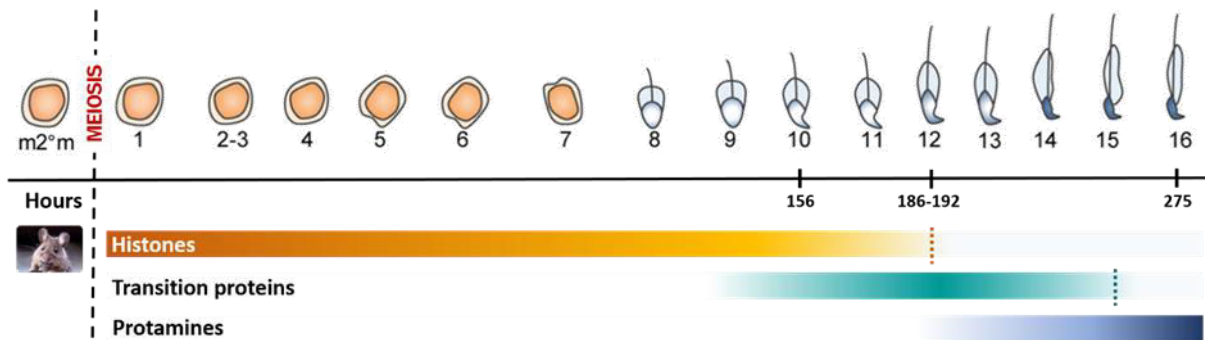


Figure 13. Dynamique au cours de la spermiogenèse de l'éviction et de l'incorporation des histones, protéines de transition et protamines. Après la méiose, les nucléosomes des spermatides des étapes 1 à 12 vont incorporer de nouveaux variants d'histone et porter de multiples modifications post-traductionnelles qui vont permettre l'intégration des protéines de transition et des protamines dans la chromatine du futur spermatozoïde. Adapté de [95] et [96].

De récentes et nombreuses études ont permis la découverte et la mise en évidence de trois mécanismes essentiels à la compaction nucléaire : 1) une déstabilisation des nucléosomes par l'incorporation de variants d'histone, 2) une vague d'hyperacétylation des histones H4, et finalement 3) l'incorporation des protéines de transition puis des protamines dans la chromatine [97].

- Incorporation des variants d'histones

Chez les mammifères, les nucléosomes sont composés de dimères de chacune des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Un brin d'ADN de 146 paires de base (bp) s'enroule autour de ces dimères d'histone et une histone de liaison H1 permet de lier l'ADN entrant et sortant au nucléosome. Contrairement aux histones canoniques qui sont synthétisées et intégrées aux nucléosomes lors de la réplication de l'ADN, les variants d'histone peuvent l'être à n'importe quel moment. La plupart du temps, les variants d'histone possèdent des propriétés d'hydrophobicité différentes de leur correspondant canonique et peuvent, de manière dynamique, induire d'importants changements de propriétés de la chromatine.

Presque tous les variants d'histones de la souris et de l'humain sont exprimés dans le testicule. Parmi ceux-ci comptent les variants de l'histone de liaison H1 **H1t**, **H1t2** et **HILS1**. Le variant d'histone **H1t**, spécifique du testicule, apparaît dans les spermatocytes pachytènes et cesse d'être exprimé dans les spermatides allongées (**Figure 14**) [98]. Des analyses *in vitro* ont démontré que son incorporation induit un plus grand relâchement et une structure plus

ouverte de la chromatine par rapport à l'histone de liaison canonique. Cependant, malgré cette propriété et le fait que H1t constitue plus de 28% des histones de liaison H1 des cellules germinales, l'absence d'expression de ce variant n'aboutit à aucun défaut de la spermatogenèse, ni à une infertilité masculine. Tout laisse à penser que son absence est compensée par la surexpression d'un (ou plusieurs) des sept autres membres de la famille H1 [99]. **H1t2** est un autre variant spécifique du testicule. Contrairement à H1t, son absence est remarquée lors de la spermatogenèse et conduit à une compaction anormale de la chromatine, une baisse de motilité et une incapacité des spermatozoïdes à féconder un ovocyte *in vitro* [100]. Le phénotype des souris déficientes en H1t2 et son expression concomitante à l'éviction des histones suggère que H1t2 joue un rôle essentiel dans la compaction de l'ADN. Le dernier variant de l'histone de liaison H1 spécifiquement exprimé dans les testicules est **HILS1**. Bien qu'aucune souris déficiente en HILS1 n'ait été encore générée, cette protéine semble être importante pour la compaction de l'ADN nucléaire car son expression est restreinte aux étapes 9 à 15 (**Figure 14**). De plus, l'identification de nouvelles modifications post-traductionnelles spécifiques suggère un rôle unique de ce variant durant la spermiogenèse [101, 102].

Alors que les variants de l'histone de liaison H1 sont soupçonnés d'être uniquement impliqués dans le remodelage de la chromatine et la transition histone-protamines, les variants de l'histone H2 présents lors de la spermatogenèse ont des rôles plus variés. En effet, les variants **H2A.X**, **H2A.Z** et **H2A.B3**, déjà présents pendant la méiose, maintiennent leur expression jusqu'à l'initiation de la réorganisation de la chromatine. Plutôt qu'une implication directe dans le processus de transition histone-protamines, ces variants d'histone sont essentiellement responsables de la régulation transcriptionnelle ou de la résolution des cassures double brin dans les spermatides rondes [88, 103]. A l'inverse, les variants **TH2A** et **TH2B** contribuent au bon déroulement de la transition histones-protamines. Ils sont spécifiquement exprimés dans le testicule et leur incorporation dans les nucléosomes diminue leur stabilité. Tandis que l'absence de TH2B est compensée par la surexpression et par l'apparition de plusieurs modifications post-traductionnelles sur l'histone H2B, la double absence de TH2A et TH2B aboutit à une forte baisse de la fertilité et à un niveau moindre d'incorporation de la protéine de transition 1 (TP1) et la protamine 2 (Prm2) qui s'accompagnent de problèmes au niveau de la compaction nucléaire [104]. De plus,

l'expression d'un dominant négatif (qui ne peut donc être compensé par H2B) provoque une baisse significative du nombre de spermatides allongées et une absence complète de spermatozoïdes chez les souris mâles [105]. En interagissant préférentiellement avec **H2AL1** et **H2AL2**, les nucléosomes générés sont plus instables et créent probablement un environnement chromatinien plus favorable à l'éviction des histones [106, 107]. En 1989, Moss et al. ont mis en évidence un autre variant de l'histone H2B, dont le transcrit est spécifiquement exprimé dans les spermatides ronds chez la souris, et l'ont baptisé **ssH2B** [108]. Sa séquence peptidique, très proche de l'histone H2B, contient 12 acides aminés (AA) supplémentaires à son extrémité C-terminale. Unni et al. développent, en 1995, un anticorps et confirme l'expression de cette protéine dans les spermatides ronds du rat [109]. Depuis, aucune étude n'a été effectuée et son potentiel rôle durant la spermiogenèse demeure un mystère.

Deux variants de l'histone H3 sont exprimés pendant la spermiogenèse. Le variant d'histone **H3.3**, dont nous avons déjà évoqué le rôle plus tôt dans la spermatogenèse, est codé par deux gènes *H3f3a* et *H3f3b*. Ces deux gènes produisent la même protéine H3.3 qui est exprimée en continu depuis les spermatogonies jusqu'à l'étape 11 de la spermiogenèse où le signal décroît pour disparaître complètement à l'étape 12 (**Figure 14**) [110]. L'inactivation du gène *H3f3a* donne lieu à des problèmes de motilité des spermatozoïdes accompagnés de malformation du flagelle et de la tête [111]. Deux souris transgéniques invalidées pour *H3f3b* ont été générées de façon indépendante. En 2014, l'inactivation du gène *H3f3b* par Yuen et al. provoque une réduction du nombre de spermatozoïdes ainsi que des malformations de la tête [110]. Plus particulièrement, la quantité de Prm1 est drastiquement diminuée pendant les étapes 11 à 16 et permet aux auteurs de postuler que H3.3 semble être essentiel dans la transition histone-protamine [110]. Contrairement aux précédents résultats, la souris transgénique déficiente en H3.3 produite par Tang et al. ne permet pas de tirer des conclusions sur le rôle H3.3 après la méiose car leurs animaux présentent systématiquement un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatides ronds [111]. Ces différences de phénotypes semblent être principalement imputables aux différentes souches de souris utilisées dans chaque étude. **H3t** est un autre variant de l'histone H3 fortement exprimé dans le testicule et il a été récemment montré qu'il était responsable d'une forte instabilité des

nucléosomes après incorporation [112], et pourrait à ce titre être important pour la compaction de l'ADN et la transition histone-protamine.

Chez les mammifères, l'histone **H4** est la seule histone canonique à n'avoir aucun variant d'histone. Cependant, au cours de la spermatogenèse, en plus de l'incorporation des variants d'histone pour déstabiliser les nucléosomes, les histones (dont l'histone H4) vont subir de nombreuses modifications post-traductionnelles.

- Hyperacétylation des histones H4

Un phénomène extrêmement conservé à travers les espèces est la vague d'hyperacétylation des histones H4 précédant l'éviction des histones et l'incorporation des protéines de transition et des protamines. Il est intéressant de noter que chez les espèces animales qui conservent la majorité de leurs histones dans la chromatine du spermatozoïde (comme la carpe ou la plie rouge), aucune vague d'hyperacétylation n'a pu être observée jusqu'à présent [113].

Dans un premier temps, en diminuant les charges positives nettes de l'histone H4, **l'acétylation déstabilise l'interaction entre l'ADN et le nucléosome, et favorise l'ouverture de la chromatine**. La dégradation des histones déacétylases (HDAC) dans les spermatides allongées participe à cette vague d'hyperacétylation [114]. Plusieurs études génétiques menées sur la souris ont identifié d'autres facteurs impliqués dans ce phénomène. Les spermatides allongées issues de souris déficientes en SirT1 ou en Chd5 présentent une baisse significative de l'acétylation. Les protéines de transition ainsi que les protamines ne sont pas intégrées à la chromatine et les spermatides allongées présentent des problèmes de compaction [115, 116].

Non seulement, l'hyperacétylation permet de relâcher la fibre chromatinienne mais elle est également fondamentale pour **le recrutement des facteurs essentiels pour l'éviction des histones**. Spécifiquement exprimée dans les spermatocytes et les cellules haploïdes du testicule, la protéine à bromodomaine **BRDT** est activée dès le début de la méiose où elle est essentielle pour la régulation transcriptionnelle des gènes. Au moment où la vague d'hyperacétylation apparaît, BRDT va spécifiquement reconnaître les résidus acétylés de l'histone H4 et permet l'évacuation de ces histones acétylées et l'incorporation des protéines

de transitions. La fixation de BRDT sur les résidus acétylés se fait *via* le premier bromodomaine de cette protéine qui en totalise deux. Chez la souris, l'expression d'une protéine BRDT tronquée de son premier bromodomaine entraîne une accumulation des protéines de transitions et des protamines dans le cytoplasme des spermatides allongées et débouche sur de graves défauts de compaction de la chromatine malgré l'apparition de la vague d'hyperacétylation [117]. Dans les spermatides allongées, l'acétylation des résidus K5 et K8 de l'histone H4 est fortement associée à la butyrylation (Kbu) de ces mêmes résidus. Goudarzi et al. ont récemment démontré par précipitation *in vitro* que la modification de la marque H4K5ac en H4K5bu inhibe fortement la fixation de BRDT sur H4K5bu. Considérant que les histones butyrylées résistent au remplacement des histones lors de la vague d'hyperacétylation avant de disparaître plus tard, les auteurs suggèrent que ces histones sont directement remplacées par les protamines, permettant ainsi localement une moins grande compaction de la chromatine. BRDT appartient à la famille des protéines BET (bromodomaine et domaine terminal) qui comprend trois autres membres : BRD2, BRD3 et BRD4. Jusqu'à présent, bien que tous soient exprimés dans le testicule, BRDT est le membre de cette famille le plus étudié dans le contexte de la spermatogenèse. BRD3 et BRD2 sont toutes les deux très fortement exprimées dans les spermatides rondes et peuvent interagir avec les résidus hyperacétylés K5-K8-K12 des histones H4 (**Figure 14**) [118]. Bien qu'aucune analyse de leur rôle dans le contexte de la transition histone-protamine n'ait été encore effectuée, il a été suggéré que BRD2 et BRD3 pourraient se comporter comme des protéines chaperonnes des histones, ce qui laisse présager un potentiel rôle de BRD2 et BRD3 dans la compaction de l'ADN [119]. Enfin, BRD4 est localisée au niveau de l'acroosome en formation dans les spermatides allongées et serait, selon les auteurs de l'étude, indirectement reliée à la compaction de la chromatine *via* l'acroplaxome (qui se trouve entre l'acroosome et la membrane nucléaire) qui faciliterait l'exportation des nucléosomes en dehors du noyau et dans le corps cytoplasmique résiduel [82]. De plus, BRD4 serait capable, par l'acétylation du résidu K122 de l'histone H3, de déstabiliser les nucléosomes et de favoriser leur éviction de la chromatine.

Bien que de multiples études démontrent l'importance capitale de l'hyperacétylation des histones H4 dans le processus de compaction de l'ADN, **de nombreuses autres modifications post-traductionnelles des histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) et de leurs variants** peuvent également servir à déstabiliser les nucléosomes et à recruter des protéines

de remodelage de la chromatine (**Figure 14**). Nous citerons, à titre d'exemples, l'étude menée en 2015 par Mishra et al. sur le variant HILS qui a identifié une quinzaine de nouvelles modifications post-traductionnelles chez le rat dont certaines sont spécifiquement présentes dans les spermatides allongées, concomitantes avec le remodelage de la chromatine (**Figure 14**) [102]. Tout aussi récemment, Dottermusch-Heidel et al. ont montré que la tri- et diméthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (**H3K79me2/3**) est enrichie du stade 6 à 10 des spermatides et précède l'hyperacétylation de l'histone H4 (**Figure 14**) [120]. Contrairement à la plupart des modifications post-traductionnelles des histones, une seule et unique enzyme est responsable de cette marque et des différents niveaux de méthylation de K79 : **DOT1L** [121]. Cette enzyme est très conservée à travers le règne animal et est impliquée dans de nombreuses voies de régulations telles que la régulation de la transcription, l'initiation de la réplication et la réponse aux dommages à l'ADN [122]. Etant donné que les souris déficientes en DOT1L meurent à l'âge embryonnaire, et dans l'attente d'un modèle d'inactivation ciblée de cette enzyme dans les spermatides, Dottermusch-Heidel et al. ont utilisé un modèle d'infection bactérienne du tractus génital de rats et ont observé une perturbation au niveau de l'organisation de la chromatine des spermatides allongées qui s'accompagne d'une apparition prématurée de H3K79me2/3 et de l'hyperacétylation de l'histone H4 concomitantes avec les protéines de transition [120]. Les auteurs émettent l'hypothèse que DOT1L est directement impliquée dans le remodelage de la chromatine dans le contexte de la spermiogenèse. Une étude récente vient étayer cette hypothèse et propose un modèle de fonctionnement interdépendant entre DOT1L et BRD4 : l'apparition de H3K79me2/3 sur la chromatine provoquerait son ouverture facilitant le recrutement de EP300 qui à son tour catalyserait l'acétylation du résidu K5 de l'histone H4 et le recrutement de BRD4 sur cette marque épigénétique [123].

Bien que la présente énumération des remodeleurs de la chromatine, des variants d'histones et des modifications post-traductionnelles ne prétende pas à l'exhaustivité, elle nous laisse facilement entrevoir la complexité et l'interdépendance des processus mis en jeu dans les spermatides rondes et allongées afin de faciliter l'éviction des histones et l'incorporation des protéines de transitions (**Figure 14**).

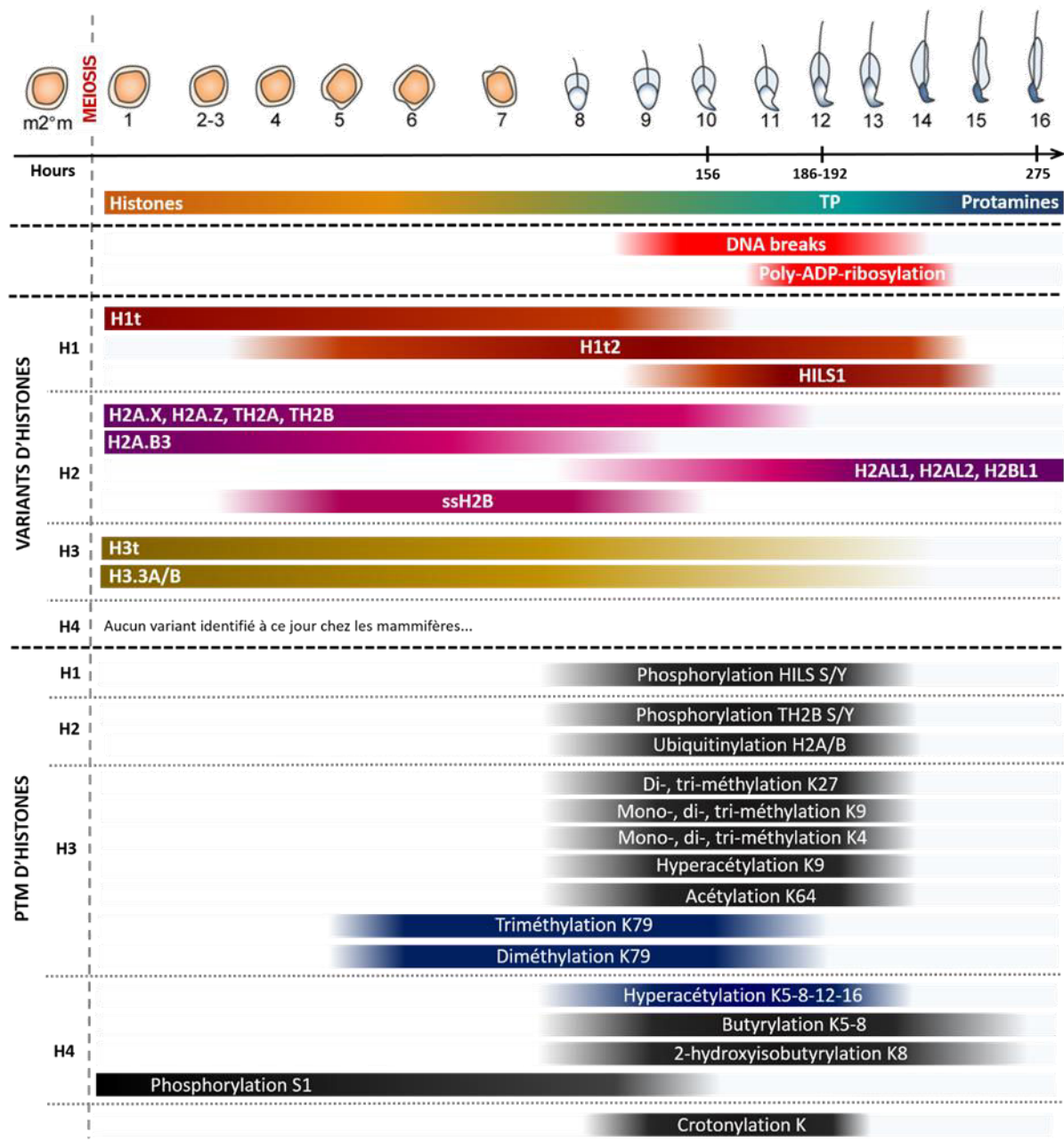


Figure 14. Récapitulatif de l'apparition et de la disparition des différents variants d'histone et des modifications post-traductionnelles des histones au cours de la spermiogenèse.

- Remplacement des histones par les protéines de transition

Les protéines de transition 1 et 2 (TP1 et TP2) sont des petites protéines (6,2 et 13 kDa respectivement) plus basiques que les histones. TP1 est composée de 20% d'arginine et 20% de lysine. Son expression est forte dans les spermatides allongées (**Figure 13**) et sa séquence fortement conservée chez les mammifères. Les souris déficientes en TP1, bien que fertiles, produisent un nombre réduit de descendants. L'intégrité de l'acrosome, la compaction de

l'ADN et la forme de la tête des spermatozoïdes sont également compromises [124]. L'apparition des protamines ne semble pas être perturbée dans les testicules des souris transgéniques, toutefois TP2 est retenue beaucoup plus longtemps sur la chromatine des souris transgéniques que sur celle des souris contrôles. *In vitro*, l'incorporation de TP1 à la chromatine aboutit à une déstabilisation de l'interaction ADN-nucléosome [125] ; à l'inverse, TP2 condense la chromatine [126]. L'invalidation du gène *Tnp2* chez la souris ne rend pas les mâles infertiles mais génère des portées plus petites et une rétention plus longue de TP1 sur la chromatine [124]. Ces phénotypes relativement discrets s'expliquent par une redondance partielle entre les fonctions des protéines de transition. En effet, une double invalidation de *Tnp1* et *Tnp2* aboutit à une stérilité totale des souris mâles : le nombre de spermatozoïdes épидидymaires est drastiquement réduit avec d'importants problèmes de compaction de la chromatine [124].

Genotype		Theoretical levels of protein			Mean fertility index	Prominent morphological defects	Progressive motility (%)
<i>Tnp1</i>	<i>Tnp2</i>	TP1 (%)	TP2 (%)	Total TP (%)			
(+/+)	(+/+)	70	30	100	14.4	Normal	62
(+/+)	(-/-)	70	0	70	7.8	Unraveled	35
(-/-)	(+/+)	0	30	30	1.1	Heads bent back	13
(-/-)	(-/-)	0	0	0	0	Coiled, clumped	1

Tableau 1. Comparaison des phénotypes en fonction du niveau d'expression des deux protéines de transitions 1 et 2. Ce tableau permet d'appréhender à la fois la redondance et les fonctions uniques remplies par TP1 et TP2. Adapté de [124].

Concomitamment à l'incorporation des protéines de transition, des cassures double brin de l'ADN apparaissent dans les spermatides allongées. Lors de l'éviction des histones, l'ADN qui se retrouve dans une conformation super-enroulée ne pourra être correctement compacté qu'une fois les super-enroulements éliminés : les cassures double brin seraient là pour relâcher la chromatine et permettre une incorporation efficace des protéines de transition, selon le modèle proposé par Leduc et al. [127]. Les cassures double brin de l'ADN sont reconnues par deux protéines PARP1 et PARP2 et génèrent des polymères de ribose-ADP qui marquent leur activation et l'initiation de la réparation des cassures (**Figure 14**) [128].

Les protéines de transition possèdent aussi une palette de modifications post-traductionnelles qui s'est récemment élargie grâce aux travaux de Gupta et al. qui ont identifié plus d'une quinzaine de PTM pour TP1 et TP2. Au même titre que les histones, ces PTMs pourraient servir de plateforme et permettre l'activation de voies signalisations importantes pour l'incorporation des protamines [129].

- Protamine et compaction de la chromatine

Les protamines sont des protéines plus basiques que les protéines de transitions et sont enrichies en arginine et en cystéine. Chez la souris, Prm1 est une protéine de 51 AA. L'extrémité N-terminale contient 2 résidus de sérine dont la phosphorylation va permettre la liaison de la protéine à l'ADN et sa compaction [130]. Prm2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 107 AA qui sera clivé plusieurs fois pour obtenir une protéine mature de 63 AA [131] et représente approximativement 70% des protamines dans le spermatozoïde mature. L'inactivation d'une seule des deux protamines est capable de provoquer l'arrêt de la condensation nucléaire, bloquer la maturation du précurseur Prm2 et aboutit à l'infertilité des souris transgéniques [132]. Prm1 n'est stable qu'une fois fixée à l'ADN : des ponts disulfures intra-moléculaires se mettent d'abord en place ; les fibres formées vont ensuite interagir entre elles pour former des liaisons inter-moléculaires et aboutir à une compaction plus forte de la chromatine [133]. Contrairement à Prm1, il semblerait que Prm2 coordonne son interaction à l'ADN grâce à un ion zinc Zn^{+} [134].

En 1993, l'équipe de Balhorn identifie pour la première fois, à l'aide de la microscopie de force atomique, les structures en toroïdes qui organisent l'ADN à l'intérieur des spermatozoïdes [135]. Il s'agit d'une structure en forme de beignet formée par les protamines, et autour de laquelle l'ADN s'enroule par tour de 360-370 bp. Chaque toroïde peut contenir jusqu'à 50kb d'ADN. (**Figure 15a**).

L'extrémité des toroïdes est fixée sur une matrice nucléaire grâce aux séquences d'ADN qui relient chaque toroïde les uns avec les autres (*nuclear matrix attachment regions* ou MARs) (**Figure 15b**). Shaman et al. ont démontré que la matrice nucléaire des spermatozoïdes était nécessaire pour l'initiation de la réplication de l'ADN paternel et de la formation du pronucléus [136]. Une autre particularité des MARs se trouve dans la composition de sa chromatine : les protamines n'étant pas incorporées dans ces séquences, ces régions chromatiniennes sont riches en histones [137]. Des structures solénoïdes pouvant contenir jusqu'à 100 kb d'ADN qui entrecoupent régulièrement les toroïdes contiennent également des histones (**Figure 15b**). La proportion d'histones persistantes dans les spermatozoïdes varie de 1 à 2% chez la souris contre 10% chez l'homme [134]. Les histones persistantes ne sont *a priori* pas distribuées au hasard et des études ont démontré qu'elles étaient associées à des promoteurs ou des gènes impliqués dans le développement embryonnaire, comme les gènes *Hox* [138, 139].

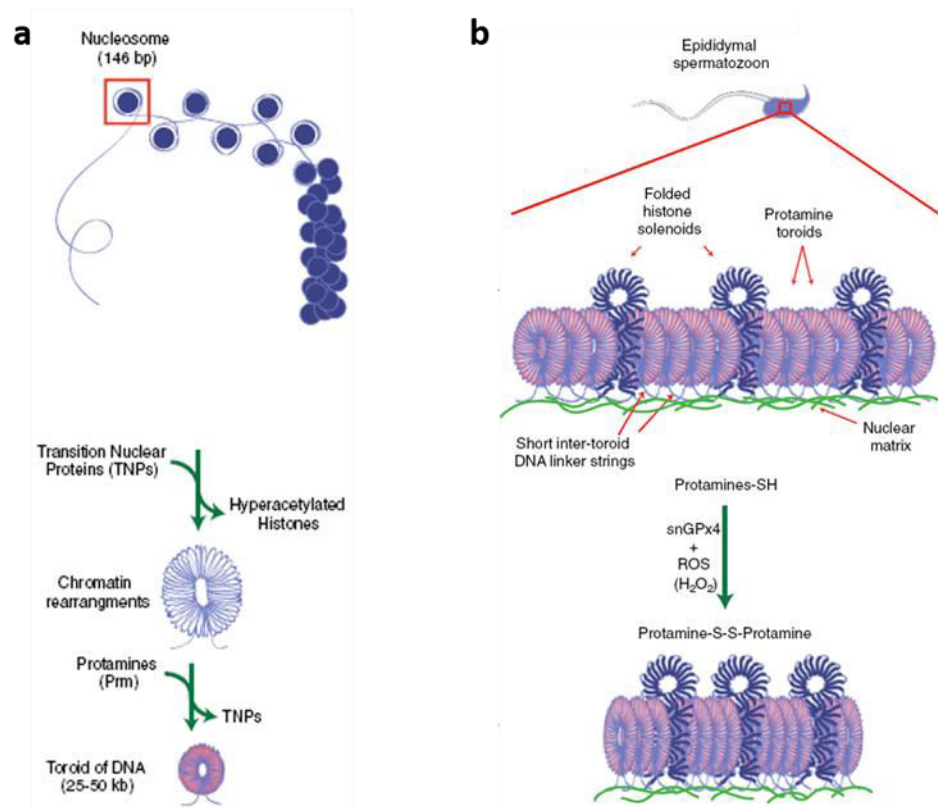


Figure 15. Compaction de l'ADN de spermatozoïdes par les protamines en toroïdes. a. Dans les cellules somatiques, l'ADN (146bp) est enroulé autour des nucléosomes. Lors de la compaction de l'ADN et de l'incorporation des protamines, la chromatine des cellules adopte une conformation en toroïdes qui comprend jusqu'à 50kb d'ADN. **b.** Le passage dans l'épididyme permet d'augmenter le niveau de compaction de l'ADN en générant la production de nouveaux ponts disulfures entre les protamines et les toroïdes. Des structures solénoïdes composées d'histones sont régulièrement trouvées entre les toroïdes dans les spermatozoïdes. Adapté de [134].

- Pourquoi le spermatozoïde possède-t-il un ADN compacté ?

Une fois la spermatogenèse achevée, le spermatozoïde va traverser l'épididyme pour poursuivre sa maturation et être stocké entre deux éjaculations avant d'atteindre le canal déférent. Au cours de cet itinéraire, l'environnement pro-oxydant de l'épididyme va lui permettre de poursuivre sa maturation grâce à la production de ponts disulfures entre les protéines de la chromatine augmentant le niveau de compaction de la chromatine (**Figure 15b**) [134]. Une fois sorti de l'épididyme, lors de la fécondation, le spermatozoïde va être à nouveau exposé à des environnements pro-oxydants qui peuvent générer l'apparition de bases oxydées telles que la 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdg). Ces altérations de l'ADN peuvent compromettre les chances de fécondation associées à des problèmes de préimplantation de l'embryon, mais peuvent également être à l'origine de cancers ou de

maladies génétiques chez l'enfant : la compaction de l'ADN est une protection par rapport à ses risques [140].

L'acquisition d'une forme aérodynamique parfaitement adaptée pour une cellule mobile est aussi une autre raison d'être de la compaction de l'ADN dans le spermatozoïde.

Formation du flagelle

La formation du flagelle, élément indispensable pour la mobilité du spermatozoïde, est initiée dès les premières phases de la spermiogenèse.

Un échafaudage microtubulaire transitoire appelée **manchette** participe activement à la mise en place de l'axonème, composant principal du flagelle. Simultanément à la compaction de l'ADN, le noyau des spermatides se polarise : la manchette et l'acrosome participent de concert à cette orientation des cellules. A l'étape 8 de la spermiogenèse, la manchette apparaît autour des spermatides [141]. Des microtubules émanent de cet anneau, plongent dans le cytoplasme et forment une structure en forme de "jupe" caractéristique de la manchette. Au cours de l'élongation des spermatides, la manchette se déplace selon un axe céphalo-caudal. Les microtubules permettant le déplacement de la manchette sont extrêmement stables et forment une plateforme rigide. Ces microtubules sont aussi importants pour transporter les composants essentiels à l'assemblage du flagelle. A l'étape 14, la manchette est désassemblée par un mécanisme non-identifié [142].

L'origine du flagelle est à chercher du côté des centrioles. Dans les spermatides rondes, le centriole distal va rentrer en contact avec la membrane nucléaire, Il va se placer sur le côté nucléaire opposé à l'acrosome. A partir de ce centriole distal, l'**axonème** va s'assembler et s'allonger au fur et à mesure de la spermiogenèse. L'axonème est composé de neuf paires périphériques et d'une paire centrale de microtubules (**Figure 16b**). Les doublets extérieurs et leurs bras de dynéine sont responsables du mouvement du spermatozoïde. L'axonème est entouré de plusieurs structures accessoires au niveau de la pièce intermédiaire et de la pièce principale. Des fibres denses extérieures, une gaine fibreuse et des mitochondries sont assemblées durant la phase d'élongation du flagelle (**Figure 16a**). Ces structures pourraient servir de matrice pour le recrutement d'enzymes nécessaires à la production d'énergie et

permettre d'améliorer les mouvements du flagelle à l'origine de la motilité de ces cellules [143].

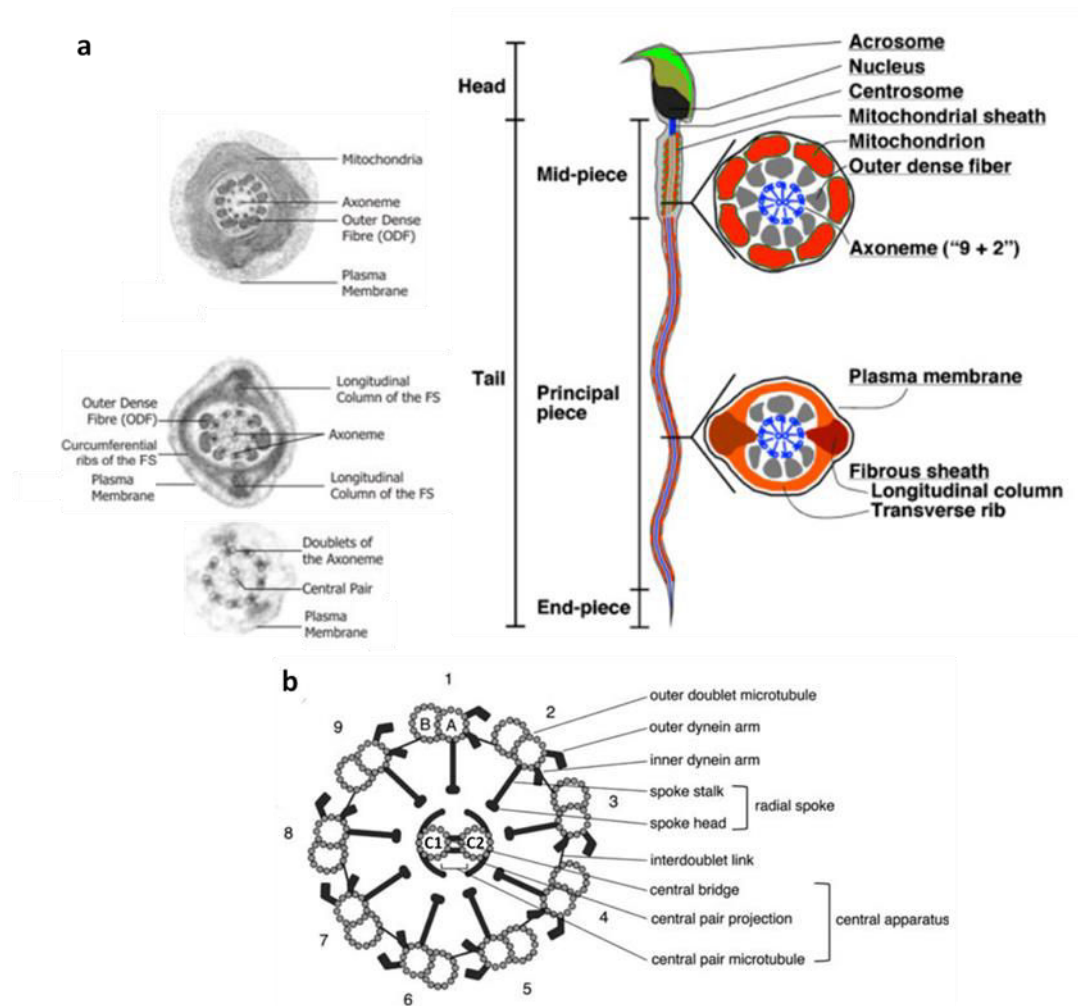


Figure 16. Structure générale du spermatozoïde de souris et vue détaillée du flagelle. a. A droite, schéma représentant un spermatozoïde de souris et des coupes transversales le long de son flagelle. A gauche, coupes transversales en microscopie électronique du flagelle de souris. **b.** Schéma détaillé de l'organisation en microtubules du flagelle de souris. Adaptés de [143-145].

Formation de l'acrosome

L'acrosome, essentiel pour la réaction acrosomique et la reconnaissance des deux gamètes, est formé dès les premières phases de la spermiogenèse. Dès le stade 2, l'appareil de Golgi produit des vésicules qui sont remplies de granules très denses. Ces vésicules vont fusionner les unes avec les autres pour ne former qu'une seule et grosse vésicule qui s'aplatira au fur et à mesure de la spermiogenèse. Au stade 4, cette vésicule unique va rentrer en contact avec le noyau et va s'étirer progressivement. Comme nous l'avons évoqué plus haut avec la manchette, la spermatide se polarise au stade 8 et l'acrosome s'aplatit et se condense [146].

A la fin de la spermiogenèse, l'acrosome enveloppe une partie de la tête du spermatozoïde (**Figure 16a**) et contient toutes les enzymes nécessaires au spermatozoïde pour atteindre l'ovocyte et le féconder.

e. Le cycle séminifère

Nous l'avons vu : nombre d'événements extrêmement variés ont lieu pendant la spermiogenèse. Si nous reprenons les chiffres donnés en introduction - entre 1000 et 3000 spermatozoïdes produits par secondes chez l'homme - il devient relativement évident que plusieurs vagues de spermatogénèse (prolifération cellulaire, méiose et spermiogenèse) ont lieu simultanément pour permettre l'approvisionnement constant en cellules chez l'individu mâle. Cela signifie donc qu'à un même niveau dans les tubes séminifères, plusieurs types cellulaires cohabitent ensemble. Cette organisation cellulaire particulière a donné lieu à une classification précise pour définir les différents stades d'un tube séminifère : ces stades sont résumés sur la Figure 17 et seront utilisés tout au long de ce manuscrit pour définir les populations de cellules présentes sur les coupes de tubes séminifères.

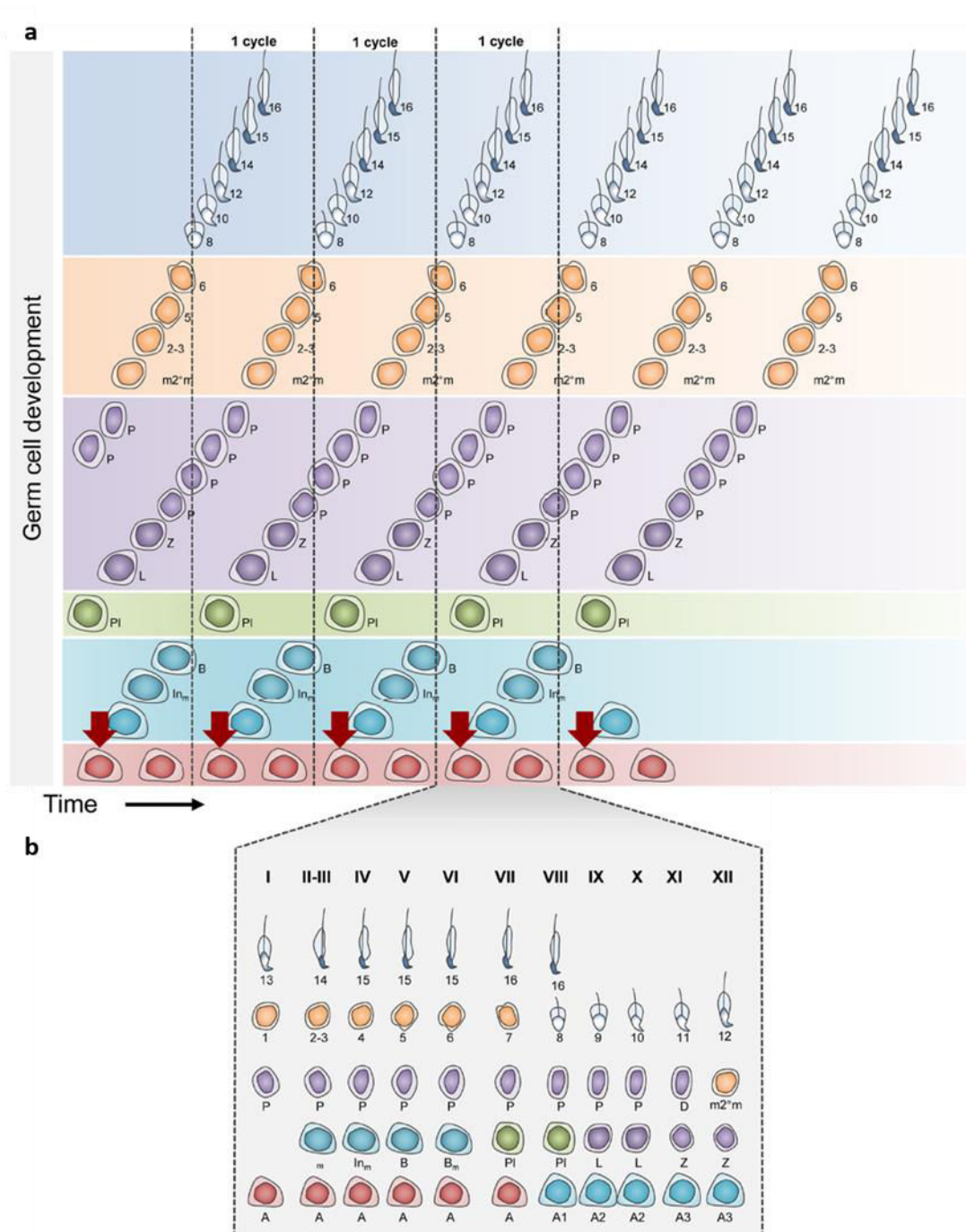


Figure 17. Vue générale des cycles séminifères chez la souris. Les flèches rouges indiquent l'initiation de la différenciation des spermatogonies et l'entrée dans le cycle séminifère. Chez la souris, 8,6 heures séparent chaque entrée en méiose. **a.** Vue d'ensemble du développement des cellules germinales. **b.** Vue détaillée des différents stades cellulaires de la prolifération et différenciation spermatogoniales, de la méiose et de la spermiogenèse. En chiffres romains sont indiqués les différents stades possibles des tubes séminifères. A, spermatogonia A ; A1, A2, A3 spermatogonie de type A1-A3 ; Int, spermatogonie intermédiaire ; B, spermatogonie B ; Pl, pré-leptotène ; L, leptotène ; Z, zygotène ; P, pachytène ; 1-7, spermatides rondes aux stades 1 à 7 ; 8-16, spermatides allongées et condensées aux stades 8 à 16. Extrait de [95]

2. Les chromosomes sexuels

Les chromosomes sexuels sont extrêmement importants pour la spermatogenèse. Un premier argument simple pour s'en convaincre est le gène *Sry* : porté par le chromosome Y, il est indispensable pour le développement des testicules chez les individus mâles et par conséquent pour la spermatogenèse. Le bon déroulement de la spermatogenèse est également tributaire du nombre de chromosomes X : les individus possédant un caryotype XXY présentent des défauts de la spermatogenèse et sont infertiles [147]. De plus, grâce à l'analyse systématique des gènes spécifiques de la spermatogenèse et également par l'analyse transcriptomique de souris transgéniques *Spo11*^{-/-}, les équipes de Page et Camerini-Otero ont montré que les chromosomes sexuels (plus particulièrement le chromosome X) sont enrichis en gènes exprimés dans les spermatogonies [148]. Cette particularité génétique s'explique par l'histoire évolutive des chromosomes sexuels.

a. L'évolution des chromosomes sexuels

Chez les mammifères, il est communément admis que les chromosomes sexuels proviennent d'une paire d'autosomes homologues qui aurait graduellement perdu leur capacité à recombinaison lors de la méiose des individus devenus hétérogamétiques. L'apparition d'un gène responsable du déterminisme sexuel mâle sur un des deux chromosomes est la première étape essentielle vers l'arrêt de la recombinaison homologue (**Figure 18b**). Il s'ensuit une accumulation de facteurs spécifiques contribuant positivement au sexe hétérogamétique en devenir. Ces gènes n'étant bénéfiques que pour un seul sexe, une sélection positive permettant de maintenir de façon cohésive cette cassette de gènes favorise l'apparition d'événements d'inversions chromosomiques. Ces inversions chromosomiques vont contribuer à étendre les régions exclues des recombinaisons homologues entre les deux futurs chromosomes sexuels (**Figure 18c-d**) [149].

L'absence prolongée de recombinaison sur le proto-chromosome Y tolère l'apparition de mutations délétères. La dérive génétique engendrée peut provoquer un raccourcissement et une perte importante de matériel génétique qui aboutit à la très grande différence de taille des chromosomes X et Y que les mammifères possèdent aujourd'hui.

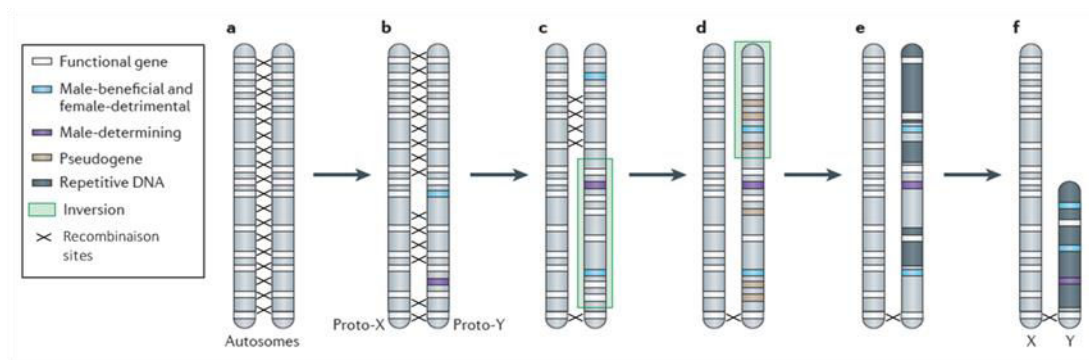


Figure 18. Modèle d'apparition des chromosomes sexuels X et Y chez les mammifères. Les chromosomes sexuels X et Y proviendraient d'une paire d'autosomes qui aurait progressivement perdu la possibilité de pouvoir recombinaison lors de la méiose des individus hétérogamétiques. L'apparition d'un gène responsable du déterminisme sexuel ainsi que des gènes contribuant à améliorer la *fitness* des individus s'accumulent sur le chromosome. L'absence de recombinaison est renforcée lors d'événements d'inversions chromosomiques qui marquent le début de la dégénération du chromosome Y. Adapté de [149].

Evolution du chromosome Y

Le chromosome Y (tout comme le chromosome X) est composé de strates qui sont les stigmates de l'arrêt de recombinaison homologue entre les chromosomes sexuels. Plutôt qu'un arrêt complet et simultané de la recombinaison, ce sont des segments d'ADN du chromosome qui, par inversion, ont perdu l'un après l'autre leur capacité recombinante.

En 2014, l'équipe de Grützner et Kaessmann ont mené une grande étude sur l'évolution du chromosome Y chez les eutheriens, les marsupiaux et les monotrèmes. Selon leurs travaux, la première strate est apparue avant la séparation entre les marsupiaux et les eutheriens mais après la séparation entre les thériens et les monotrèmes (**Figure 19**) [150]. Contrairement à ce qui avait pu être affirmé auparavant, il n'y a pas eu de chromosomes sexuels ancestraux en commun entre ces deux derniers clades. Cette première strate, apparue il y a 181 million d'années, comporte le gène essentiel au déterminisme sexuel mâle *Sry* et quatre autres gènes plus ou moins bien conservés chez les eutheriens (**Figure 19**). Un million d'années plus tard, la séparation entre les eutheriens et les marsupiaux a lieu. Chez les eutheriens, la strate 2 et la strate 3 se succèdent en peu de temps et restent communes aux eutheriens. La strate 3 du chromosome Y est marquée par l'addition de portions d'autosomes. Finalement, les strates 4 et 5 sont apparues chez l'ancêtre commun des singes de l'Ancien Monde et des grands singes après la séparation entre les rongeurs et les primates qui a eu lieu il y a 90 millions d'années (**Figure 19**) [150].

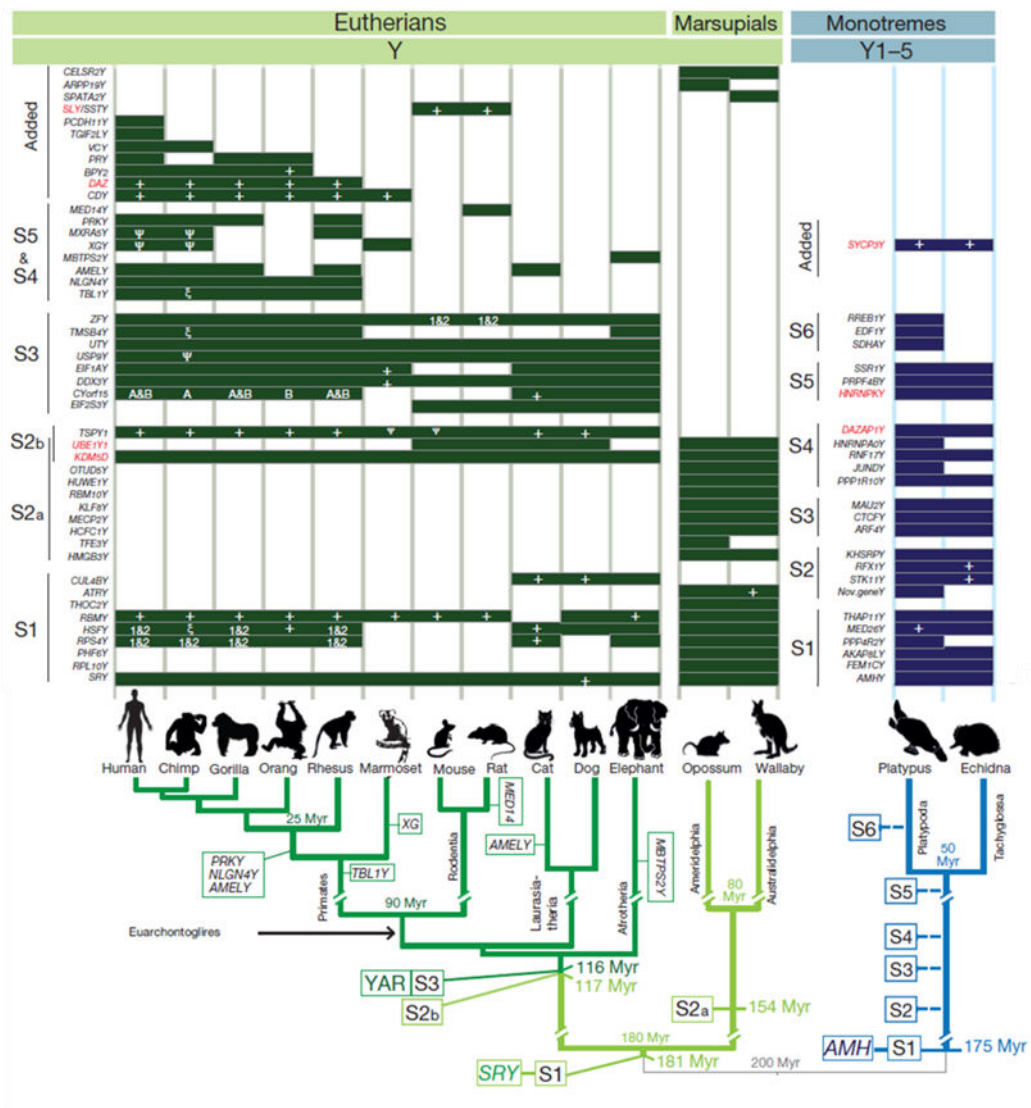


Figure 19. Conservation et apparition des gènes sur le chromosome Y des euthériens, des marsupiaux et des monotrèmes. À gauche de la figure sont disposés les gènes apparus soit dans les différentes strates, soit de façon indépendante sur les chromosomes sexuels différenciés ("Added"). En bas, un arbre phylogénétique de 15 espèces. Le nom des lignages, les dates d'apparition des strates et l'apparition de gènes indépendamment des strates est indiqué. Extrait de [150].

Le chromosome Y des souris est composé d'une petite région pseudo-autosomale (**PAR**) permettant la recombinaison avec le chromosome X lors de la méiose, et d'une région spécifique des individus mâles (**MSY**) non-recombinante. Chez l'homme et la souris, le chromosome Y est extrêmement enrichi en séquences répétées et en palindromes. Cette caractéristique du chromosome Y a entravé pendant de longues années la possibilité d'effectuer son séquençage et l'alignement de ses séquences. En 2014, grâce aux travaux de l'équipe de Page, la séquence du chromosome Y de la souris est enfin disponible [151]. Cette étude a apporté des résultats inattendus : contrairement aux attentes, le chromosome Y de la souris est composé de plus de 99,9% d'euchromatine et contient un peu plus de 700 séquences codant pour des protéines.

Contrairement à ce que l'on pourrait attendre entre l'homme et la souris, le degré de conservation entre leur chromosome Y respectif est très faible : seulement 2,2% de la séquence du chromosome murin partage une homologie avec son correspondant humain. Le chromosome Y de la souris est enrichi en gènes multicopies et en séquences ampliconiques qui composent pas moins de 96,5% du contenu total du chromosome (Figure 20). Ces séquences ont été acquises récemment par le chromosome Y de la souris qui a, au contraire, perdu quasiment l'intégralité de ces gènes ancestraux [151].



Figure 20. Composition des chromosomes Y de la souris et de l'humain. Contrairement aux hypothèses, le chromosome murin est extrêmement enrichi en euchromatine. Adapté de [151].

En l'absence de recombinaison homologue, la pression de sélection ne peut s'exercer individuellement sur chaque gène porté par le chromosome Y mais s'effectue sur le chromosome Y dans sa totalité. Par conséquent, le processus d'élimination des mutations délétères est nettement moins efficace par rapport aux autosomes ou aux chromosomes X chez les femelles. Cela peut éventuellement conduire à la fixation de mutations délétères chez les mâles (Muller's ratchet) (Figure 21) [149]. De même, si une mutation favorable à l'individu masculin apparaît sur le chromosome Y et qu'elle est adjacente à une mutation délétère, alors la fixation des mutations délétères sera indirectement favorisée (Genetic hitchhiking) (Figure 21) [149]. Cette sélection sur le chromosome Y en tant qu'unité cohésive engendre une dégénération des séquences codantes, comme nous l'avons déjà évoqué plus haut. Or, contrairement à l'idée que le chromosome Y serait voué à complètement disparaître [152, 153], deux propriétés du chromosome Y ont permis la conservation des gènes.

D'une part, le chromosome Y comprend une population de gènes simple copie qui sont exprimés dans tous les tissus de l'organisme. Bellott et al. ont démontré que ces gènes simple copie sont impliqués dans le processus de **compensation de dosage** du chromosome X. Ces paires de gènes ancestraux et homologues entre le chromosome X et le chromosome Y sont essentiels à la viabilité des individus et l'absence de l'un ou de l'autre chromosome est létale à plus de 99% chez l'humain (les embryons survivants sont, de plus, le plus souvent mosaïque

avec la présence d'un deuxième chromosome sexuel) [154]. Une très forte pression de sélection garantit donc une fixation et une certaine stabilité de ces gènes.

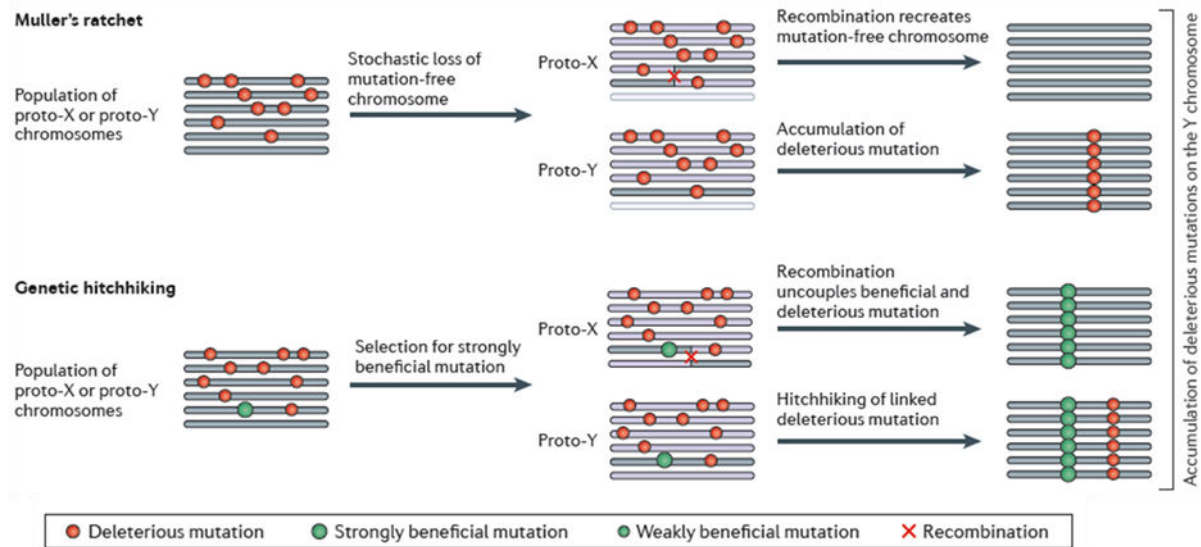


Figure 21. Synthèse des différents processus de sélection inefficace du chromosome Y par rapport au chromosome X capable de recombinaison homologue. La sélection naturelle ne s'exerce pas individuellement sur les gènes du chromosome Y, mais sur le chromosome Y comme une unité cohésive. Le *Muller's ratchet* représente l'accumulation de mutations délétères qui découlent de cette sélection inefficace. Le *genetic hitchhiking* explique comment des mutations délétères peuvent persister sur le chromosome grâce à l'apparition concomitante de mutations avec un effet bénéfique fort sur les individus mâles. Adapté de [149].

D'autre part, le chromosome Y des souris et des humains encode plusieurs familles de gènes multicopies. Contrairement aux gènes simple copie, ces gènes multicopies ont une expression testiculaire spécifique. Toujours selon Bellott et al., il s'agirait d'une stratégie évolutive pour permettre le maintien de l'expression de gènes essentiels à la spermatogenèse. Des **conversions géniques intrachromosomiques** à l'origine de l'**amplification massive des gènes** permettraient à ces gènes spécifiques du testicule d'obtenir une plus grande longévité dans le temps [154] et de maintenir leur expression pendant la spermatogenèse malgré l'apparition de mutations délétères.

L'absence de recombinaison homologue du chromosome Y a façonné son architecture génétique au fur et à mesure du temps. Qu'en est-il pour le chromosome X qui passe plus de temps chez les individus femelles que chez les individus mâles et qui conserve la possibilité de se recombiner chez les femelles pendant la méiose ? Les chromosomes X sont-ils façonnés de la même manière que les autosomes ? Sont-ils enrichis en gènes importants pour les femelles ou pour les mâles ?

Evolution du chromosome X

Lahn et Page ont démontré en 1999 que le chromosome X humain présente quatre strates évolutives. Ses strates sont conservées chez la souris [155, 156]. Une étude plus poussée sur l'âge d'apparition des gènes sur le chromosome X montre que, chez la souris comme chez l'humain, il y a eu deux vagues d'apparitions de gènes [157].

Après avoir effectué la datation des gènes présents chez la souris et l'homme grâce à des analyses génomiques comparatives, Zhang et al. ont montré que la première grosse apparition de gènes liés au chromosome X a eu lieu après la séparation des euthériens et des marsupiaux. Cet ensemble de gènes plus ancestraux comprend une proportion importante de gènes **favorables au développement des femelles**. À noter que cet ensemble de gènes ancestraux comporte également des gènes dont l'expression est favorable aux individus mâles : ces gènes ancestraux sont **majoritairement exprimés avant la méiose**, dans les spermatogonies A et B.

Respectivement pour l'homme et la souris, la deuxième vague d'apparition de gènes sur le chromosome X eu a lieu avant la séparation de l'homme et du chimpanzé, et de la souris et du rat. Dans ce deuxième ensemble de gènes apparus plus récemment, **la proportion de gènes favorables aux mâles est significativement plus importante** au sein de ce groupe par rapport aux gènes apparus en même temps sur les autosomes (**Figure 22**). En d'autres termes et pour résumer les résultats obtenus par Zhang et al., les gènes favorables aux mâles apparus récemment (*i.e* moins de 50 millions d'années) sont enrichis sur le chromosome X, tandis que les gènes apparus il y a plus longtemps sont retrouvés majoritairement sur les autosomes (**Figure 22**) [157].

Cette étude résume et confirme parfaitement les différentes pressions de sélection qui s'exercent sur le chromosome X et qui peuvent se résumer principalement à **l'antagonisme sexuel** entre les individus mâles et femelles (ou l'hypothèse de Rice) et à **la loi d'Ohno**.

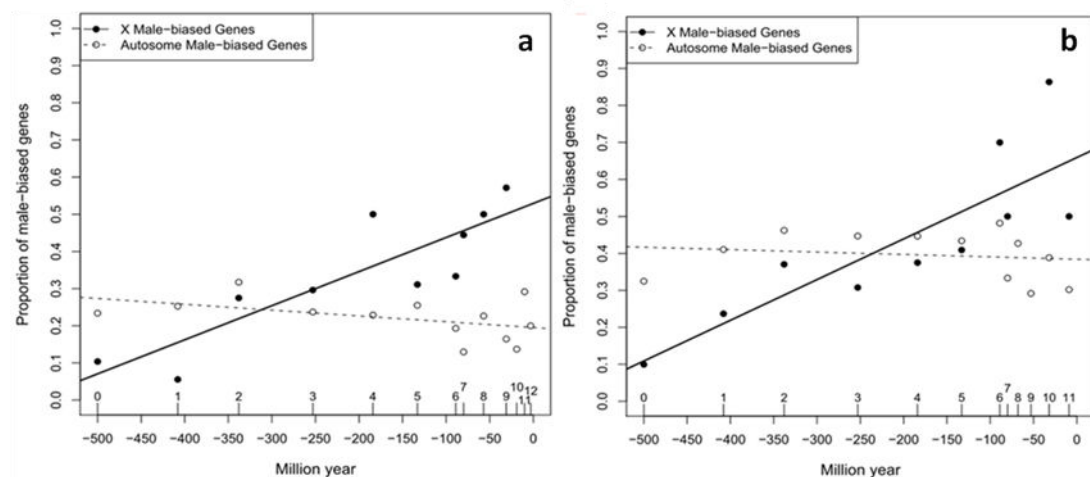


Figure 22. Proportion de gènes favorables aux mâles sur le chromosome X et sur les autosomes en fonction du temps. a) correspond à l'homme et b) à la souris. Sur l'axe des ordonnées apparaît la proportion de gènes favorables aux mâles et sur l'axe des abscisses figure l'échelle de temps en million d'années. Les gènes apparus il y a plus de 300 millions d'années sont enrichis sur les autosomes. Tout au contraire, les jeunes gènes apparus il y a moins de 130 million d'années sont plus favorablement enrichis sur le chromosome X. Extrait de [157].

- Hypothèse de Rice

En raison de l'antagonisme sexuel entre les individus mâles et femelles, si une mutation préjudiciable à un sexe apparaît sur un autosome, elle ne pourra être fixée que si les avantages pour un sexe compensent les dommages générés pour l'autre sexe. Cependant, cette règle théorique se voit mise à mal quand il s'agit des chromosomes sexuels. Parce que le chromosome X passe plus de temps chez le sexe homogamétique, une mutation dominante délétère pour le sexe hétérogamétique aura plus de chance d'être fixée sur le chromosome X. D'un autre côté, Rice a émis l'hypothèse que la fixation d'une mutation récessive sur le chromosome X accordant un avantage au sexe hétérogamétique sera favorisée car masquée par l'hétérozygotie des individus féminins (Rice WR, 1984). Hypothèse à nuancer au cours du temps, car la fixation de cette mutation récessive sera contre-sélectionnée à son tour lorsque sa fréquence atteindra un seuil limite lui permettant d'être retrouvée à l'état homozygote chez les femelles. Le résultat de cette cohabitation des chromosomes sexuels chez les individus mâles aboutit à une **composition du chromosome X enrichi en gènes favorables à la fois à la femelle et au mâle** par rapport à la composition des autosomes [158].

Cependant chez les mammifères, l'histoire évolutive ne s'arrête pas là. Pendant la spermatogenèse et plus précisément pendant la méiose, les chromosomes sexuels sont inactivés (cf. [Meiotic Sex Chromosome Silencing](#)). Les gènes favorables aux mâles portés par

le chromosome X n'échappent pas à cette règle, exception faite des gènes les plus récents. Au fur et à mesure des millions d'années, les gènes exprimés et importants pour la méiose des mâles présents sur le chromosome X ont subi un mouvement de rétrotransposition du chromosome sexuel vers les autosomes afin de permettre leur expression pendant la méiose. On assiste alors à **une démasculinisation progressive du chromosome X (Figure 22)** [157]. Toutefois, cette démasculinisation du chromosome X se limite aux gènes exprimés pendant la méiose et ne s'étend pas aux gènes exprimés plus tôt lors de la spermatogenèse.

- Loi d'Ohno

Les gènes exprimés avant la méiose sont relativement conservés entre espèces. L'équipe de Namekawa suggère que ce groupe de gènes plus ancestraux répond entièrement à la loi d'Ohno. Cette loi prédit une forte conservation du chromosome X en réponse à la compensation de dosage nécessaire chez les mammifères placentaires [159]. Il propose un modèle d'opposition entre deux forces évolutives pour expliquer le contenu génétique du chromosome X : d'une part, l'antagonisme sexuel (et l'hypothèse de Rice) favorise l'apparition rapide de gènes très divergents exprimés pendant et après la méiose ; d'autre part, la pression de maintien envers les gènes respectant la loi d'Ohno et exprimés avant la méiose (**Figure 23**) [160].

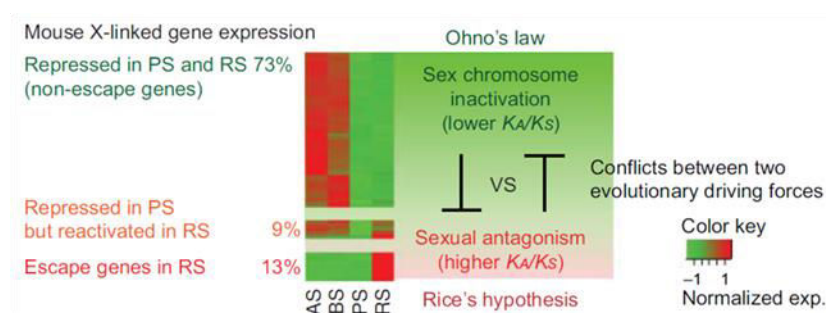


Figure 23. Le chromosome X est soumis à deux forces évolutives antagonistes. Les gènes exprimés avant la méiose sont très conservés entre les espèces et sous l'action du MSCI sont soumis à une forte pression de sélection. Au contraire des gènes exprimés après la méiose qui, selon l'hypothèse de Rice, apparaissent rapidement sur le chromosome X et montrent une très grande divergence entre espèces. AS, spermatogonie A ; BS, spermatogonie B ; PS, spermatocyte au stade pachytène ; RS, spermatide ronde. Extrait de [160].

- Les gènes multicopies du chromosome X

En 2013, Mueller et al. ont mené une grande enquête sur les chromosomes X de l'homme et de la souris afin de déterminer la proportion de gènes qui respecte ou au contraire transgresse la loi d'Ohno [161]. Ils ont mis à jour un modèle d'évolution bimodale du chromosome X. Le premier groupe comporte les gènes simples copies qui, à 94% chez la souris et 95% chez l'homme, se conforment à la loi d'Ohno et possèdent des orthologues dans d'autres espèces. Quant à la plupart des gènes qui composent le deuxième groupe, ils sont ampliconiques ou multicopies et transgressent la loi d'Ohno. Conformément au modèle de Namekawa, ces gènes sont plus jeunes que les gènes simple copie et sont exprimés dans les spermatides ronds après la méiose. Mueller et al. proposent que l'amplification et l'acquisition de multicopies pour un gène permet de contourner la répression de la transcription imposée par la chromatine sexuelle après la méiose (**Figure 24**) [161].

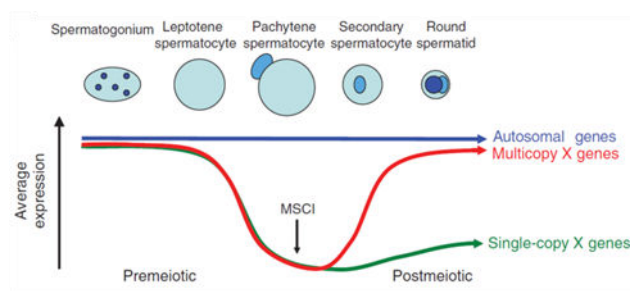


Figure 24. Niveau d'expression des gènes simples copies et multicopies du chromosome X comparés au niveau moyen d'expression des gènes portés par les chromosomes autosomaux. Alors que les gènes du chromosome X sont éteints lors du MSCI au stade pachytène, les gènes multicopies du chromosome X retrouvent leur niveau d'expression initial identique aux gènes portés par les autosomes, contrairement aux gènes simples copies du chromosome X. Extrait de [161].

Cependant, l'amplification massive des gènes multicopies pourrait s'expliquer autrement [162]. Les chromosomes sexuels sont le terrain de jeu favori de ce que l'on appelle les éléments génétiques égoïstes (SGEs pour *Selfish Genetic Elements*) à l'origine de conflits intragénomiques. Comme décrit par Soh et al., la proportion surprenante de gènes multicopies sur le chromosome Y [151] et l'apparition convergente de gènes multicopies homologues sur le chromosome X [161] pourraient être le symptôme d'un conflit intragénomique entre le chromosome X et le chromosome Y, chez la souris et l'Homme.

L'empreinte des conflits intragénomiques sur les chromosomes sexuels

Les SGEs sont des éléments génétiques favorisant leur propre transmission en dépit des proportions de transmission mendéliennes attendues. Ils peuvent être trouvés sous différentes formes : des éléments transposables, des distorateurs de ségrégations (*meiotic*

drive ou *transmission distorter*) ou encore des distorateurs post-ségrégation qui empêchent le développement des embryons. Les **distorateurs de ségrégation** peuvent agir au niveau de la géométrie de la division méiotique et de la distribution des chromosomes au sein des gamètes, ou bien sur la viabilité des gamètes porteurs de l'allèle alternatif. Les distorateurs de ségrégation sont *a priori* préférentiellement situés sur les chromosomes sexuels [163]. Le distorateur de ségrégation effectuant son action sur le locus d'un chromosome homologue, l'absence de recombinaison homologue entre les chromosomes sexuels évite la génération d'un chromosome "suicidaire" qui porterait à la fois le distorateur de ségrégation et l'allèle sensible à son action après un événement de recombinaison.

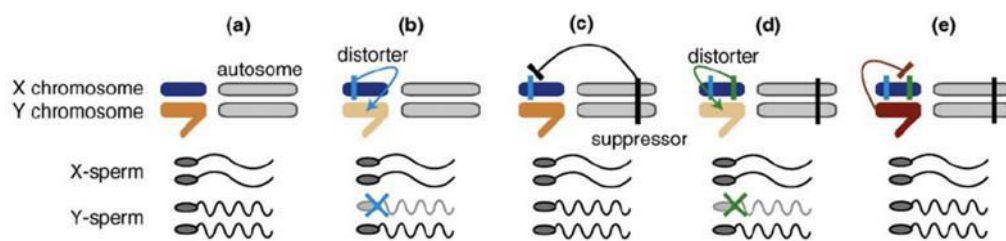


Figure 25. Modèle proposé par Meiklejohn et Tao concernant l'évolution rapide des biais de ségrégation au sein des chromosomes sexuels par des cycles récurrents d'apparition de distorateurs et de supresseurs. Extrait de [163].

L'apparition d'un distorateur de ségrégation sur l'un ou l'autre des chromosomes sexuels d'un individu hétérogamétique provoque un biais du sexe-ratio dans la progéniture de celui-ci (**Figure 25b**). Dans une population où un biais du sexe-ratio est établi, la sélection naturelle favorisera l'allèle permettant à des parents de produire un plus grand nombre de descendants du sexe rare. La sélection naturelle favorise donc l'apparition et la fixation d'un supresseur de la distorsion du sexe-ratio et permet de retrouver un équilibre entre le nombre de représentants mâles et femelles (**Figure 25c**). Dans l'hypothèse de conflits intragénomiques successifs entre les chromosomes sexuels, un deuxième distorateur de ségrégation peut apparaître et conférer un futur avantage sélectif à un chromosome Y capable de résister à l'action du distorateur de ségrégation (**Figure 25d-e**). Chacune des copies des gènes multicopies codée par le chromosome X et Y pourrait donc être autant de répétitions d'un cycle "acquisition d'un distorateur/acquisition de la résistance". Il est intéressant de noter que ces gènes multicopies sont spécifiques d'une espèce : ceci est dû à la prolifération rapide des distorateurs et des supresseurs qui de ce fait jouent un rôle central dans la spéciation des espèces.

Lahn et Page ont suggéré que les gènes *VCX* et *VCY*, spécifiques des simiens (sous-ordre des primates incluant l'humain), pourraient être impliqués dans un conflit intragénomique [164]. Chez la souris, l'existence d'un tel conflit intragénomique a été démontré entre les gènes *S/y* et *S/x* portés respectivement par le chromosome Y et le chromosome X. L'état actuel des connaissances concernant ces deux gènes sera décrit en détail dans la troisième section de ce manuscrit.

b. Infertilité masculine humaine & chromosomes sexuels

Les forces de sélection qui se sont exercées au cours des millions d'années qui composent l'histoire des chromosomes sexuels laissent entrevoir l'importance de ces chromosomes pour la spermatogenèse. Pour autant, nos connaissances sur les rôles précis des différents gènes portés par les chromosomes X et Y sont encore loin d'être exhaustives.

En France, 18 à 24% des couples ne parviennent pas à concevoir d'enfants après deux ans de rapports sans contraception (Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire, INSERM, 2012). D'après une étude menée dans trois régions de France, l'infertilité est d'origine masculine dans 20% et provient des deux membres du couple dans 39% des cas [165]. Des anomalies génétiques sont responsables de plus de 15% des cas d'infertilité masculine [166]. Malgré le nombre élevé de gènes impliqués dans la spermatogenèse sur le chromosome X, son implication dans les cas d'infertilité masculine humaine est longtemps restée ambiguë, et en dehors de modèles transgéniques murins infertiles, une seule mutation génétique (détectée dans le gène *TEX11*) chez l'homme a démontré la responsabilité du chromosome X dans les cas d'infertilité masculine [167-169]. A l'inverse, en 1976, Tiepolo et Zuffardi ont été les premiers à mettre en évidence le lien entre des anomalies du chromosome Y et l'infertilité masculine dont on sait maintenant qu'elles sont responsables de plus de 10% des cas d'azoospermie [170, 171].

Les anomalies du chromosome Y à l'origine d'une infertilité masculine peuvent être classées en deux catégories. La première catégorie est constituée **des anomalies de caryotype** qui sont le syndrome de Turner (XO), le syndrome de Klinefelter (XXY) et le syndrome du double Y (XYY). Ces syndromes et leur phénotype sont résumés dans le Tableau 2 [171].

Tableau 2. Altérations du caryotype et du nombre de chromosomes sexuels chez les individus infertiles. La prévalence et l'impact sur les paramètres reproductifs sont décrits. Extrait de [171].

Syndrome	Karyotype	Prevalence	Somatic features	Reproductive impact
Turner	XO ^a	0.04%	Growth retardation Congenital heart disease Horseshoe kidney Visual impairment	Humans: sterile Mice: fertile but reduced oocyte pool and reproductive lifespan
Klinefelter	XXY ^b	0.1%	Variable Tall stature Gynecomastia Mild developmental and behavioral problems	Humans and mice sterile unless spontaneous X chromosome loss
Double Y	XXY	0.1%	Tall stature	Humans: commonly fertile because of high incidence of Y chromosome loss Mice: sterile because of low probability of Y chromosome loss

^aTurner females are likely to be XX/XO or XY/XO mosaics; furthermore, some Turner females are partially monosomic.

^bSome Klinefelter men have more than two X chromosomes.

Les anomalies chromosomiques générées par **des micro-délétions du chromosome Y** composent la deuxième catégorie d'infertilités liées au chromosome Y. Trois régions du chromosome Y sont principalement retrouvées avec des délétions chez les hommes infertiles : *AZF_a*, *AZF_b* et *AZF_c* [171]. Ces trois événements ont lieu sur le bras long du chromosome Y (Yq) et empêchent l'expression de gènes essentiels pour le bon déroulement de la spermatogenèse. L'étude de ces infertilités génétiques humaines a permis de grandes avancées au regard de la fonction des gènes du chromosome Y chez l'homme (consulter [172] pour une revue complète des gènes du chromosome Y impliqués dans la fertilité masculine des mammifères).

Ces progressions sont toutefois à nuancer car l'absence de modèles de cultures cellulaires *in vitro* satisfaisants entrave considérablement la progression des études menées sur la spermatogenèse. Dans ce contexte, le développement de modèles de souris transgéniques a abondamment contribué à la caractérisation des gènes essentiels à la spermatogenèse et, plus particulièrement, à la spermiogenèse.

c. Rôle des chromosomes sexuels murins pendant la spermiogenèse

Longtemps, le chromosome Y (murin comme humain) a été qualifié de « friche génétique » ou de « désert génétique ». Sa structure génétique extrêmement redondante a représenté un véritable défi de séquençage jusqu'en 2010 où l'équipe de Page est parvenue à séquencer les chromosomes Y de l'homme, du chimpanzé, du macaque et de la souris [151, 173, 174].

Structure du chromosome Y murin

Soh et al. ont réussi à séquencer plus de 99.1% du chromosome Y de la souris, ou plus précisément du MSY (pour *Male-Specific region of the Y chromosome*) qui représente les séquences spécifiques du mâle. Comme nous l'avons déjà évoqué dans une section précédente, ce chromosome Y est composé de plus 99.9% d'euchromatine, ce qui représente 89.5 Mb, dont 98% de séquences ampliconiques (**Figure 20**).

Le bras court du chromosome Y abrite les gènes ancestraux communs aux mammifères qui émanent des ancêtres autosomaux des chromosomes sexuels (**Figure 20** et **Figure 26a**). Ils composent 2.2% du chromosome, soit 2 Mb. Ce groupe comprend 7 gènes simples copies, un gène dupliqué (*Zfy1* et *Zfy2*) et une famille de gènes ampliconiques *Rbmx*. Entremêlés avec les gènes ancestraux, 1 Mb de séquences ampliconiques spécifiques de la souris est également retrouvée sur le bras court du chromosome Y (**Tableau 3**) [151].

Tableau 3. Répertoire génétique du chromosome Y. Le chromosome Y comprend un groupe de gènes ancestraux localisés sur le bras court du chromosome et un groupe de gènes acquis principalement localisé sur le bras long du chromosome. Le nombre de copies ainsi que l'existence d'un homologue sur le chromosome X est indiqué pour chaque gène. Extrait de [151].

^a Estimations faites dans cet article. ^b Estimations provenant de [161].

Sequence Class	Y Gene	Copy Number	X-Homolog	Copy Number
Ancestral	<i>Zfy1, Zfy2</i>	2	<i>Zfx</i>	1
	<i>Ube1y1</i>	1	<i>Ube1x</i>	1
	<i>Kdm5d</i>	1	<i>Kdm5c</i>	1
	<i>Eif2s3y</i>	1	<i>Eif2s3x</i>	1
	<i>Uty</i>	1	<i>Utx</i>	1
	<i>Ddx3y</i>	1	<i>Ddx3x</i>	1
	<i>Usp9y</i>	1	<i>Usp9x</i>	1
	<i>Sry</i>	1	<i>Sox3</i>	1
	<i>Rbmy</i>	30 ^a	<i>Rbmx</i>	1
Acquired	<i>H2al2y</i>	2	<i>H2al1</i>	14 ^b
	<i>Rbm31y</i>	2	<i>Rbm31x</i>	1
	<i>Sly</i>	126	<i>Slx</i>	25 ^b
			<i>Slx1</i>	14 ^b
	<i>Ssty1</i>	85	<i>Sstx</i>	11 ^b
	<i>Ssty2</i>	221		
	<i>Srsy</i>	197	<i>Srsx</i>	14 ^b
	<i>Prssly</i>	1 ^a		
	<i>Teyorf1</i>	1 ^a		

Les éléments ampliconiques récemment apparus et spécifiques de la souris, composent la totalité du **bras long du chromosome Y**. Ces gènes ampliconiques représentent 86.4 Mb. Ils sont le résultat d'une répétition intensive d'un motif composé de 500 kb le long du chromosome Y (**Figure 26b**). Ce motif est composé de 3 blocs différents à l'intérieur

desquels on retrouve trois familles de gènes : *Sly*, *Ssty* et *Srsy*. Ces motifs peuvent être répétés de manière extrêmement régulière en tandem (**Figure 26c**) ou selon une organisation palindromique (**Figure 26d**). Ces répétitions ont lieu tout le long du bras long du chromosome Y (**Figure 26e**) et génèrent au total pas moins de 126 copies de *Sly*, 197 copies de *Srsy* et 306 copies de *Ssty* avec des phases ouvertes de lecture conservées (**Tableau 3**) [151].

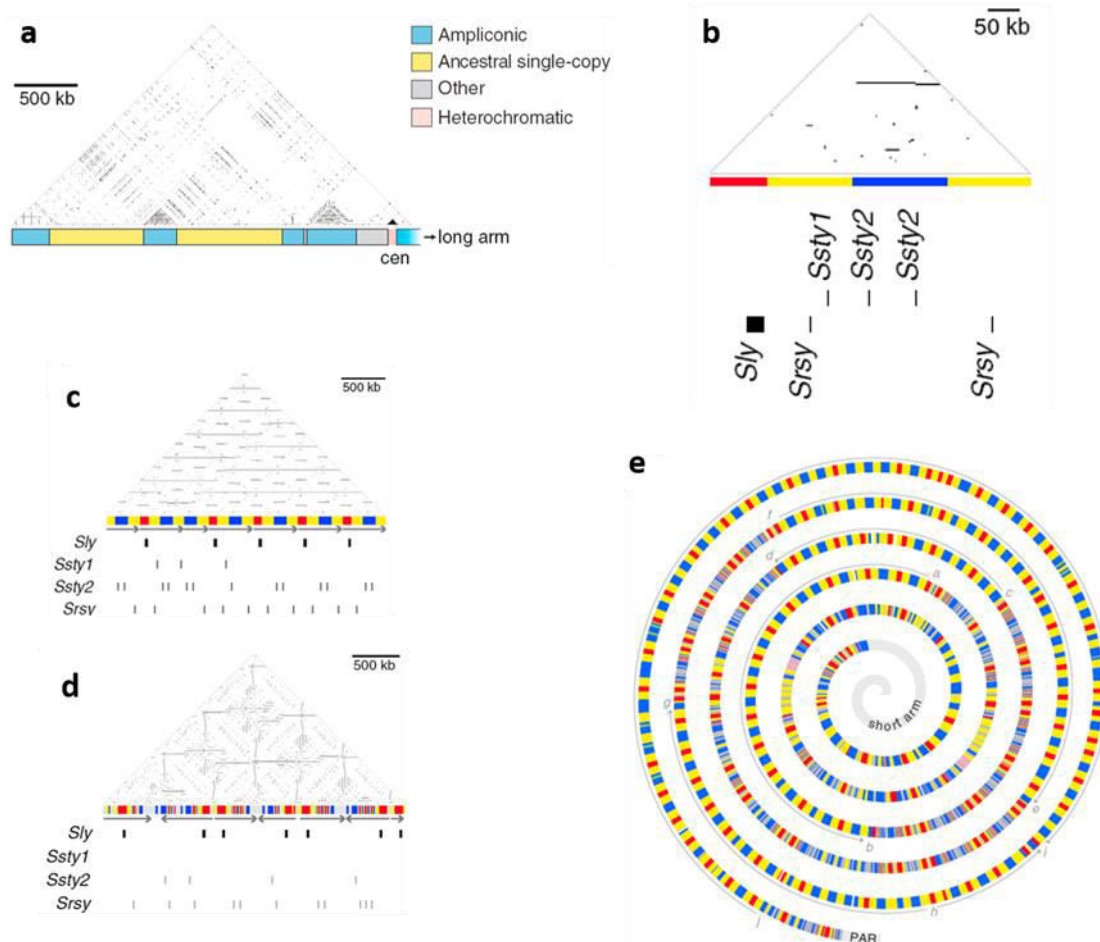


Figure 26. Organisation génomique du chromosome Y. a. Représentation du bras court du chromosome Y et de l'homologie intrachromosomique des séquences avec un graphique à points. Chaque point représente une homologie de 100% sur des séquences de 100 bp. Les traits horizontaux représentent deux segments homologues tandis que les lignes verticales représentent des inversions parfaites de séquences. b. Motif de 500 kb retrouvé le long du bras long du chromosome Y et contenant les familles de gènes *Sly*, *Ssty* et *Srsy*. c-d. Organisation régulière en tandem (c) ou palindromique (d) du motif de 500kb. e. Organisation du bras long entier du chromosome Y et des répétitions des motifs. Extraits de [151].

L'amplification massive des gènes du bras long du chromosome Y serait *a priori* le résultat de nombreuses recombinaisons intrachromosomiques. Il est intéressant de noter que les gènes multicopies portés par le chromosome Y possèdent absolument tous des homologues sur le chromosome X et pourraient être le résultat des pressions de sélection générées par un conflit intragénomique entre ces deux chromosomes, comme expliqué précédemment dans la section [Evolution des chromosomes sexuels](#).

Enfin, le chromosome Y possède **une région pseudo-autosomale** à sa partie distale qui lui permet de s'apparier avec le chromosome X lors de la méiose (cf. [La méiose](#)) et de permettre une ségrégation normale des chromosomes sexuels dans les spermatides.

La cartographie complète du bras long chromosome Y n'ayant été achevée qu'en 2014, l'étude de ces gènes et de leur rôle pendant la spermatogenèse s'est longtemps heurtée à l'impossibilité de générer des recombinaisons homologues et de cibler l'inactivation des gènes sur ce chromosome. De plus, pour des raisons encore inexpliquées, l'inactivation de gènes sur le bras court n'a jamais été réalisée avec succès. Néanmoins, les chercheurs ont su composer avec des modèles de souris disponibles alors, présentant différents variants du chromosome Y. Ces variants du chromosome Y proviennent de recombinaisons homologues inégales entre segments qui aboutissent à une perte plus ou moins étendue de matériel génétique. La caractérisation de la spermatogenèse en l'absence des gènes contenus dans les segments supprimés ainsi que les techniques de transgénèse additive ont permis des avancées considérables pour la caractérisation de ces gènes. La délétion du bras court du chromosome provoque un arrêt de la prolifération spermatogoniale, tandis que la délétion du bras long du chromosome Y est associée avec des anomalies après la méiose et compromettant la motilité, la morphologie et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes.

Délétion du bras court du chromosome Y

- Délétion Sxr^b (Δ^{Sxrb})

La délétion Sxr^b (Δ^{Sxrb}) a initialement été détectée chez des souris XX présentant une réversion sexuelle. Cette délétion a pour origine première un événement de duplication suivie d'une translocation d'une partie du bras court du chromosome Y, qui produit un chromosome $YSxr^a$ (**Figure 27b**). La recombinaison homologue entre les PAR des chromosomes X et $YSxr^a$ génère à son tour un chromosome $XSxr^a$, responsable de réversion sexuelle chez les souris XX car il comprend le gène *Sry* (**Figure 27c**). Lors de la méiose de souris mâles $XSxr^a$ $YSxr^a$, une recombinaison inégale entre les gènes *Zfy1* et *Zfy2* va engendrer un chromosome $XSxr^b$ avec une délétion de 1,38 Mb (comprenant 6 gènes) et une protéine de fusion *Zfy2/1* [175]. Les souris $XSxr^b$ O sont mâles (le gène *Sry* étant présent dans l'intervalle Sxr^b) mais présentent un

arrêt de la prolifération spermatogoniale. En 2001, Mazeyrat et al ont démontré que la restauration de l'expression du gène *Eif2s3y* ($X^{Eif2s3y}Sxr^{bO}$) par transgène additive sur le chromosome X est suffisante pour restaurer la prolifération spermatogoniale et permettre aux spermatocytes d'effectuer une première division méiotique [176]. Par ailleurs, la présence d'un chromosome homologue Y^{*x} (région PAR comprenant une courte portion de chromosome X et son centromère) permet la poursuite de la spermatogenèse se poursuivra jusqu'à la deuxième division méiotique [177].

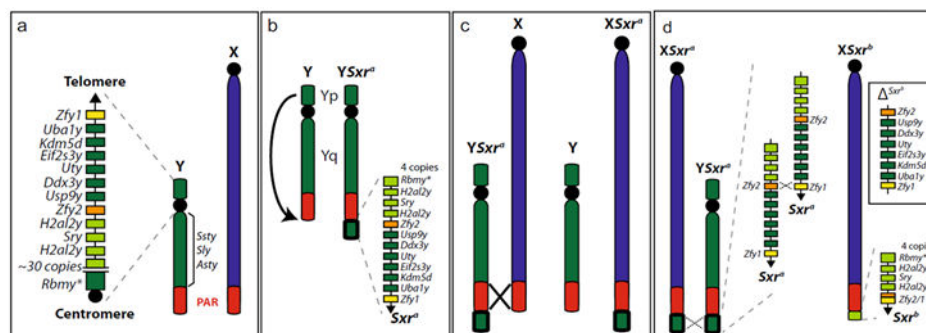


Figure 27. Origine du chromosome $XSxr^a$. Le chromosome Y est représenté en vert, le chromosome X en bleu et la région pseudo-autosomale (PAR) en rouge. En vert plus clair figurent les gènes conservés dans le chromosome $XSxr^a$. La délétion Δ^{Sxrb} comprend 6 gènes et produit un gène de fusion entre *Zfy1* (en jaune) et *Zfy2* (en orange). Extrait de [175].

D'autres études plus récentes, menées également par des approches de transgénèses additives des gènes *Zfy1* et *Zfy2*, ont démontré que *Zfy2* était impliqué dans l'initiation et la progression de la deuxième division méiotique ainsi que dans le remodelage de la tête du spermatozoïde et le développement du flagelle [177-179].

Le segment supprimé Δ^{Sxrb} comprend cinq autres gènes en plus des gènes *Eif2s3y* et *Zfy1/2*. Le développement des nouvelles techniques d'inactivation de gènes telles que CRISPR-Cas9 ou TALENS permettra certainement de compléter nos connaissances quant à leurs rôles respectifs pendant la spermatogenèse et leur possible implication dans les cas d'infertilité masculine (notamment dans les cas de microdélétions du chromosome Y chez l'homme). Récemment, l'inactivation chez la souris du gène *Eif2s3y* grâce à la technique d'édition du génome par la nucléase TALENS a confirmé l'importance de ce gène pour la prolifération spermatogoniale [180].

- Délétion Y^{d1}

La délétion Y^{d1}, responsable de l'élimination de la quasi-totalité des copies du gène *Rbmy*, a eu lieu lors d'une recombinaison inégale entre les chromosomes sexuels chez des mâles XSx^rY (**Figure 28a-b**). L'expression d'un transgène *Sry* est nécessaire pour la production de mâles car la délétion du fragment d'ADN Y^{d1} provoque une extinction de son expression. Bien que les résultats des études menées sur le phénotype de ces souris et l'expression de RBMY pendant la spermatogenèse soient en partie contradictoires, l'expression de cette protéine est élevée dans les spermatogonies chez la souris [181, 182]. En effet, Mahadevaiah et al. ont initialement montré que les souris mâles XY^{d1}*Sry* présentait une augmentation significative du nombre de spermatozoïdes malformés [181]. Cependant, l'expression d'un transgène *Rbmy* ne permet pas de récupérer un phénotype sauvage [182]. Alternativement, de même que pour le gène *Sry*, le gène *H2a12* pourrait être réprimé et également responsable du phénotype observé chez les souris XY^{d1}*Sry*.

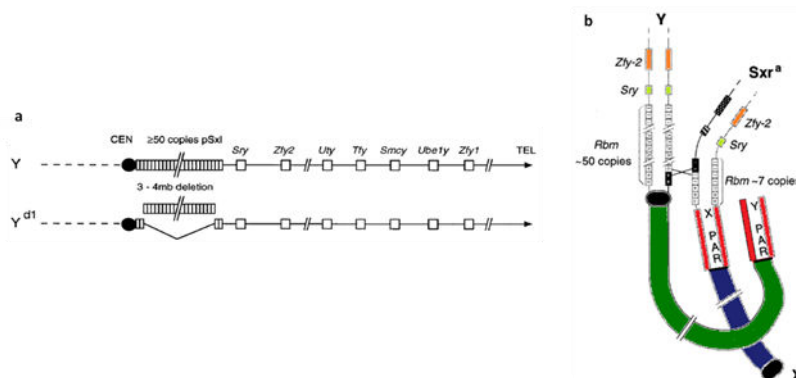


Figure 28. Origine du chromosome Y^{d1}. a. La délétion Y^{d1} provoque une délétion de 3-4 Mb au sein des multiples copies de *Rbmy*. b. Une recombinaison inégale entre les copies de *Rbmy* du chromosome X et Y génère la délétion Y^{d1} sur le chromosome Y. Le chromosome Y est représenté en vert, le chromosome X en bleu et la région pseudo-autosomale (PAR) en rouge. En vert plus clair est représenté *Sry* et en orange *Zfy2*. Adapté de [181].

Malgré la non-concordance des résultats obtenus chez la souris, des études complémentaires menées sur des hommes infertiles présentant des microdélétions (incluant le gène RBMY) suggèrent que RBMY aurait un rôle à jouer pour le potentiel fécondant du spermatozoïde et notamment pour leur mobilité [183].

Délétion du bras long du chromosome Y (MSYq)

Plusieurs modèles de souris présentant des délétions plus ou moins importantes du bras long du chromosome Y (MSYq) ont été mis à jour. Considérant l'extraordinaire amplification des gènes localisés sur le MSYq et l'impossibilité d'adopter les techniques classiques de transgénèse et de recombinaison homologues pour l'étude de ces gènes, ces modèles murins ont longtemps représenté un précieux outil au service des études, majoritairement menées par l'équipe de Burgoyne, sur le rôle des gènes du MSYq pendant la spermiogenèse.

- Trois modèles d'étude du MSYq chez la souris

En 1992, à la suite d'une longue succession de croisements, des souris mâles $XSxr^aY^{*X}$ sont générées (**Figure 29**). Le segment MSYq est totalement absent chez les souris $XSxr^aY^{*X}$ (ou **MSYq-**) mais les gènes du bras court de l'Y (notamment *Sry*, *Eif2s3y*, *Zfy1* et *Zfy2*) sont présents. La présence du chromosome Y^{*X} est essentiel pour contourner le blocage de la méiose qui apparaît en cas de problème d'appariement entre des bivalents et qui provoque inévitablement l'apoptose des cellules germinales méiotiques. Le phénotype mâle des souris $XSxr^aY^{*X}$ est produit par l'expression du gène *Sry* naturellement présent sur le segment Sxr^a . Ces souris sont stériles et la totalité de leurs spermatozoïdes développent d'importantes anomalies morphologiques (**Figure 29**) suggérant la présence d'un ou de plusieurs gènes nécessaires à la spermiogenèse sur le segment MSYq [184].

En 1994, au cours de différents croisements générés pour l'étude des souris $XSxr^aY^{*X}$, Conway et al. ont découvert des souris avec un chromosome Y possédant moins de la moitié du matériel génétique normalement porté par le MSYq sauvage (**Figure 29**). Cette délétion $Y^{RIII}qdel$ (ou **2/3MSYq-**) est responsable d'une hypofertilité des souris mâles. La proportion plus importante de spermatozoïdes malformés est certainement à l'origine de l'hypofertilité des souris 2/3MSYq-. De plus, les portées issues d'un croisement avec un mâle 2/3MSYq- présentent une distorsion du sexe-ratio (40 % de mâles pour 60% de femelles) [185]. La distorsion du sexe-ratio peut provenir soit d'une sous-production de gamètes contenant le chromosome Y, soit d'une baisse du pouvoir fécondant de ces gamètes. La production d'une descendance par ICSI (pour *IntraCytoplasmic Sperm Injection*) en utilisant aléatoirement les

spermatozoïdes épидидymaires des mâles 2/3MSYq⁻ corrige la distorsion du sexe-ratio normalement obtenue par accouplements [186]. Ces résultats suggèrent qu'une baisse du potentiel reproducteur des gamètes comportant le chromosome Y^{Rlll}qdel est à l'origine de la distorsion du sexe-ratio des progénitures des souris 2/3MSYq⁻. Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette baisse de fertilité des gamètes comprenant le chromosome Y est encore inconnu.

En 2004, Touré et al. ont identifié des souris XXY^{Tdym1}Sry porteuses d'un chromosome Y^{Tdym1} avec une délétion inhabituelle représentant 9/10^{ème} du bras long du chromosome Y (**Figure 29**). L'expression d'un transgène autosomal Sry est nécessaire pour générer un phénotype mâle chez ces souris dont le gène Sry est supprimé sur le chromosome Y^{Tdym1} (**Figure 29**). Les souris **XY^{Tdym1}qdelSry** (ou **9/10MSYq⁻**) sont infertiles [187]. Des anomalies de la spermiogenèse ont lieu ; notamment, les spermatides condensées (stade 16) sont retenues plus longtemps dans le testicule et sont retrouvées dans des stades séminifères IX et au-delà. Les spermatozoïdes présentent également de sévères malformations de la tête (**Figure 29**) [187].

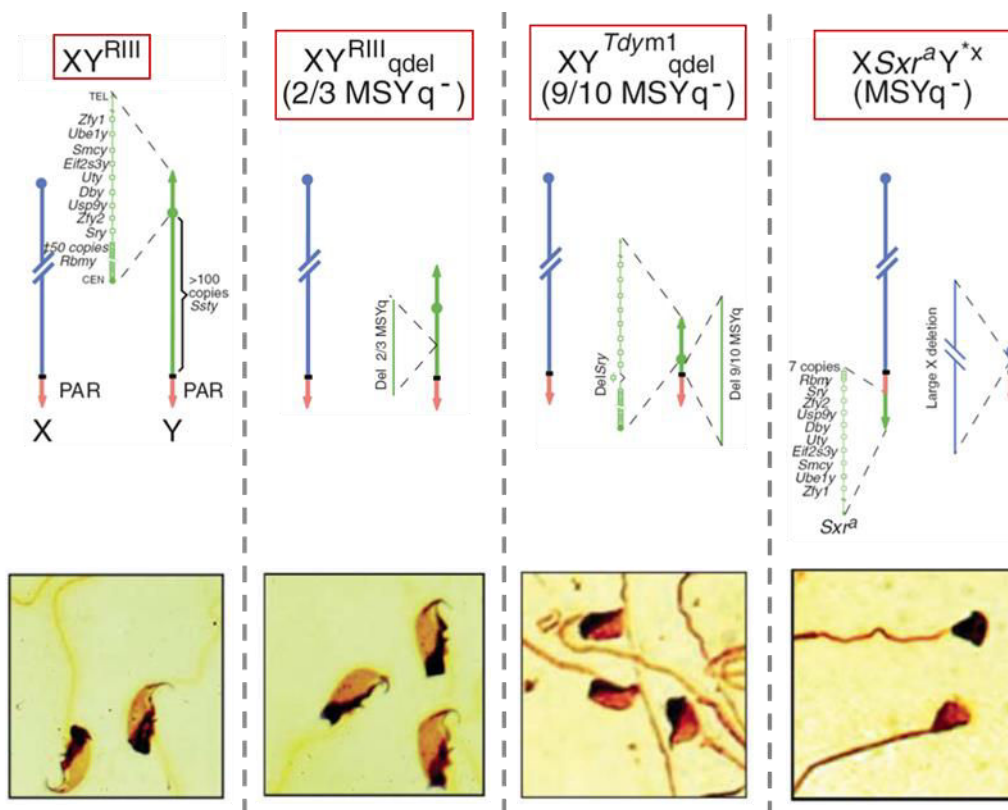


Figure 29. Présentation des trois modèles de délétion du MSYq chez la souris. Les chromosomes X (en bleu) et Y (en vert) sont représentés (panel du haut). Une coloration en argent des spermatozoïdes épидидymaires pour chaque phénotype permet d'appréhender les anomalies de morphologie des spermatozoïdes produits par les différentes souris mâles (panel du bas). Extraits de [188, 189].

- Rôle du MSYq au cours de la spermiogenèse

L'analyse des différents modèles mutants de souris indique que plus la portion du MSYq présente chez les souris mâles est réduite, plus l'infertilité (*in vivo* et *in vitro*) est sévère. Une analyse du nombre, de la mobilité et de la morphologie des spermatozoïdes corroborent ce fait (**Tableau 4**). La reproduction des mâles par ICSI est possible quel que soit le génotype, cependant les rendements concernant l'activation de l'ovocyte sont moins bons quand les spermatozoïdes proviennent des mâles 9/10MSYq- et MSYq-. De même, l'activation de l'ovocyte et le développement du zygote au-delà du stade deux cellules sont moins efficaces et altérés en ICSI avec les spermatozoïdes issus des mâles 9/10MSYq- et MSYq- [186].

L'équipe de Ward a étudié un peu plus en détail le phénotype des spermatozoïdes issus des trois génotypes : 2/3MSYq-, 9/10MSYq- et MSYq-. Par microscopie électronique à transmission, ils ont découvert que plus la délétion du chromosome Y est importante, plus les spermatozoïdes présentent une moindre compaction de la chromatine (**Tableau 4**) [190]. Après coloration au CMA3 (Chromomycin A3) des spermatozoïdes, ils ont confirmé que les spermatozoïdes issus des mâles 9/10MSYq- et MSYq- présentent des **problèmes de compaction et de protamination de la chromatine** (**Tableau 4**) [191, 192]. De plus, des tests des comètes (ou *Comet Assay*) ont mis en évidence la présence de nombreuses cassures de l'ADN dans les spermatozoïdes testiculaires et épидидymaires (**Tableau 4**) [191].

Tableau 4. Récapitulatif des phénotypes des spermatozoïdes et des résultats d'ICSI effectués avec les spermatozoïdes épидидymaires des trois types de mutants 2/3MSYq-, 9/10MSYq- et MSYq-. = pas de changement entre les contrôles et le génotype testé ; * légère altération ; ** altération modérée ; *** altération sévère ; **** altération extrêmement sévère. NPY correspond au segment non-apparié du chromosome Y (ou *Non-Pairing Y chromosome long arm*), équivalent du MSYq. Extrait de [191].

Phenotypic effects	2/3NPYq-	9/10NPYq-	NPYq-
Sex chromosome gene upregulation	**	***	****
<i>In vivo</i> fertility	*	****	****
<i>In vitro</i> fertility	**	****	****
Sperm number	=	**	**
Sperm motility	*	**	**
Sperm head morphology	*	***	****
Chromatin fragmentation in comet assay	=	***	****
Oocyte activation in ICSI	=	***	****
Oocyte arrest in ICSI	=	***	****
Paternal chromosome breaks in zygotes after ICSI	=	***	****
Chromatin condensation in TEM	*	**	***
Chromatin packaging in CMA3 staining	=	***	****

- Rôle du MSYq dans la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels

Une autre conséquence systématiquement liée à l'absence de tout ou portion du MSYq est la **surexpression de gènes portés par les chromosomes sexuels**, dans les spermatides rondes. De la même manière que pour les autres phénotypes, la dérégulation des gènes est proportionnelle à la taille du segment absent du chromosome Y. Il est important de souligner qu'il ne s'agit pas de l'expression ectopique de gènes normalement éteints, mais de l'augmentation du niveau d'expression des gènes physiologiquement exprimés dans les spermatides rondes [93, 94, 189].

En 2009, grâce à la technique d'hybridation à des ARNm de sondes fluorescentes (FISH ARN pour *Fluorescent In Situ Fluorescence of RNA*) et à l'utilisation de transgènes GFP sur le chromosome X, Reynard et Turner ont confirmé la surexpression des gènes portés par le chromosome X dans les trois modèles de souris 2/3MSYq-, 9/10MSYq- et MSYq-. Le niveau d'expression des gènes autosomaux exprimés dans les spermatides rondes demeure inchangé, quel que soit le génotype des souris. Ils confirment cette donnée au niveau protéique et observent 50% d'augmentation de la quantité de protéines SLX (codées par des gènes multicopies du chromosome X) par Western Blot sur des extraits protéiques de spermatides rondes 2/3MSYq- ; la localisation intracellulaire de la protéine n'est pas affectée par sa surabondance [94].

Afin de mieux comprendre l'origine de cette surexpression des gènes portés par les chromosomes sexuels, une étude est menée sur les marques épigénétiques répressives et activatrices arborées par les chromosomes X et Y dans les spermatides rondes. Une diminution des marques répressives H3K9me2/3 et de la protéine CBX1 (associée à l'hétérochromatine) est observée dans les trois génotypes (**Figure 30b-d**). La disparition de ces marques répressives est spécifique de la chromatine sexuelle car l'intensité du signal détecté sur le chromocentre est inchangée entre chacun des phénotypes. La diminution globale de marques épigénétiques associées à une répression de la transcription propose une explication simple et directe pour la surexpression des gènes du chromosome X et Y dans les spermatides rondes. Cependant, d'autres observations suggèrent que les bouleversements épigénétiques générés par l'absence du MSYq sont plus complexes et contradictoires que cela. En effet, Reynard et al. ont également observé une diminution des marques activatrices H4K8Ac et H4K12Ac sur la chromatine sexuelle (**Figure 30a, d**). Une hypothèse avancée concerne le potentiel rôle de

relais que pourrait éventuellement jouer ces marques épigénétiques dans l'incorporation de variants d'histones tel que macroH2A et H2A.Z. Toutefois, l'observation de H4K12Ac est déroutante car, contrairement aux autres marques étudiées, la localisation de cette marque sur le chromocentre semble affectée par l'absence d'une grande portion du MSYq (**Figure 30d**) [94]. Cette dernière donnée suggère qu'il existe un lien entre le chromocentre et le paysage épigénétique de la chromatine sexuelle.

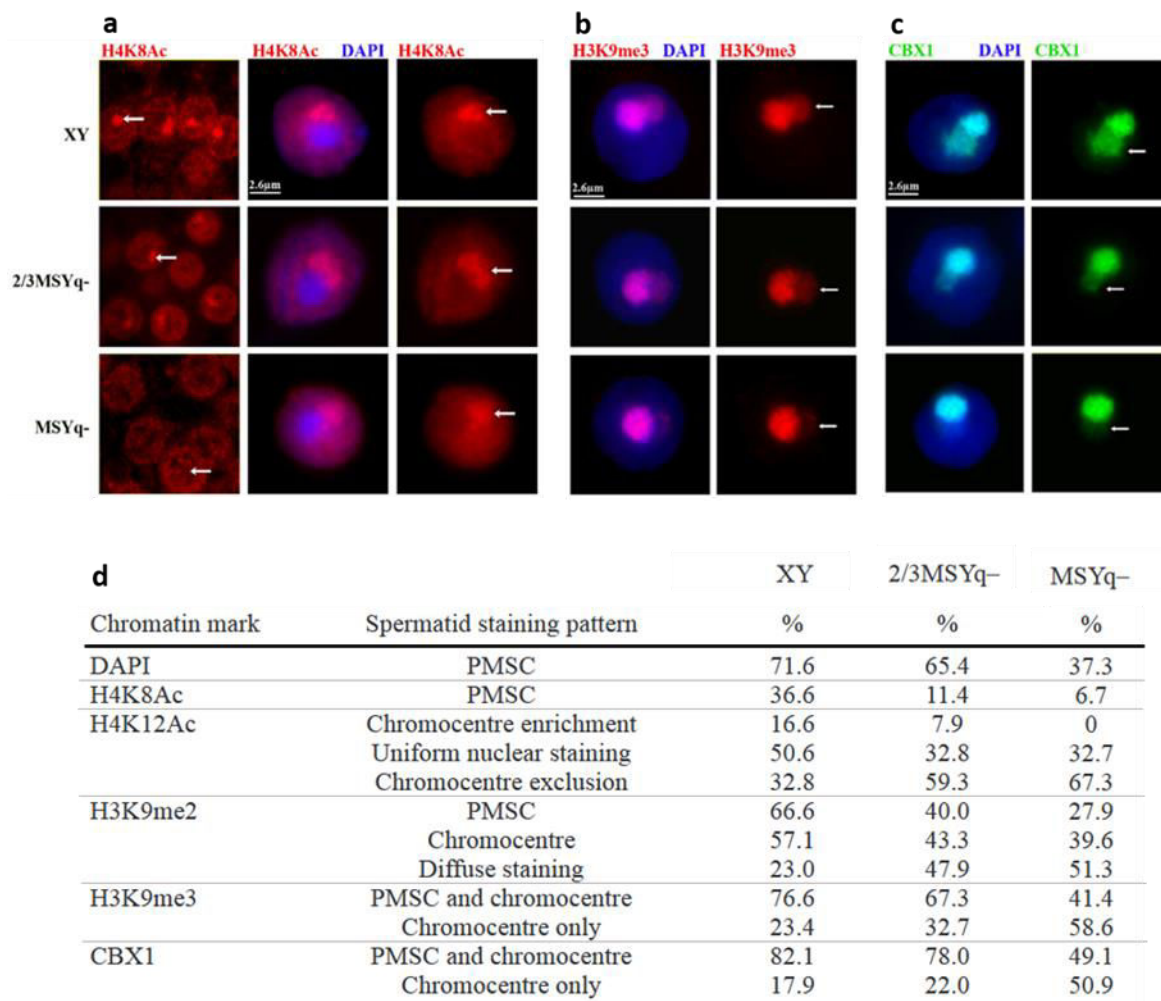


Figure 30. Anomalies épigénétiques des chromosomes sexuels dans les modèles murins 2/3MSYq- et 9/10MSYq-. a-c. Marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) de l'ADN. La chromatine sexuelle est indiquée par une flèche. **a.** Détection par immunofluorescence de H4K8Ac dans les spermatides rondes. **b.** Détection par immunofluorescence de H3K9me3 dans les spermatides rondes. **c.** Détection par immunofluorescence de CBX1 dans les spermatides rondes. **d.** Tableau récapitulatif de la présence des marques épigénétiques sur la chromatine sexuelle (PMSC), sur le chromocentre ou dans le noyau des spermatides rondes en fonction du génotype des souris. Extrait de [94].

Les études menées sur les différents modèles murins MSYq- attestent de l'importance de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse. En effet, la dérégulation épigénétique des chromosomes sexuels entraînent une surexpression des gènes liés aux chromosomes X et Y qui pourrait être à l'origine des défauts de compaction et de protamination de la chromatine des spermatozoïdes issus des souris MSYq-. La sévérité du phénotype des spermatozoïdes étant proportionnelle à la taille croissante du fragment MSYq absent, il est possible que le facteur responsable de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels soit un gène présent en multicopies sur le chromosome Y.

3. Etude des protéines impliquées dans la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse

Le bras long du chromosome Y de la souris abrite potentiellement cinq famille de gènes multicopies qui sont *Asty*, *Ssty1/2*, *Orly*, *Srsy* et *Sly*. Aucune protéine n'a encore été mise à jour pour *Orly* et la famille de gène multicopies *Asty* n'a conservé aucune ORF intacte. Bien qu'un potentiel rôle des ARN non-codants du gène *Orly* ne puisse être exclu, ces deux gènes multicopies ne sont pas mentionnés par Soh et al. comme faisant partie du bras long du chromosome Y. Les deux familles spécifiques des spermatides rondes *Ssty1/2* et *Sly* sont deux candidats prometteurs au titre de régulateurs de la transcription des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse.

a. SLY est une protéine clé pour la régulation de la chromatine sexuelle après la méiose (PMSC)

Le bras long du chromosome Y contient 126 copies de *Sly* qui ont toutes conservé une ORF intacte. Ces gènes codent pour deux variants d'épissage respectivement appelés SLY1 et SLY2 dont les exons 5 et 6 sont absents de l'ARNm (**Figure 32**). La structure des protéines SLY (ou *Sycp3-Like Y-linked*) comprend un domaine COR1 qui permet théoriquement une liaison à la chromatine et un signal d'adressage au noyau NLS (pour *Nuclear Localisation Signal*). La séquence NLS est mutée et donc la localisation nucléaire de SLY dépendrait probablement d'un autre facteur. Il semble très probable que ces deux variants endossent des rôles

identiques dans la cellule : en effet, les exons 5 et 6 partagent 79% de similarité avec les exons 3 et 4. Les protéines SLY1 et SLY2 diffèrent l'une de l'autre de 34 AA. Jusqu'à présent, seul un anticorps capable de reconnaître SLY1 a pu être produit et, sauf précision, la désignation SLY signalera SLY1 dans la suite de ce manuscrit.

La protéine SLY est spécifique des spermatides rondes et est localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau de ces cellules [193]. Plus spécifiquement, SLY est enrichie sur la chromatine sexuelle des spermatides et dans d'autres régions du noyau, notamment sur le cluster de gènes *Speer* porté par le chromosome 5 (**Figure 31b-c**) [93, 194]. Les spermatides rondes étant reliées par des ponts cytoplasmiques, SLY est retrouvée aussi bien sur la chromatine sexuelle des spermatides (PMSC) portant un chromosome Y que celles portant un chromosome X.

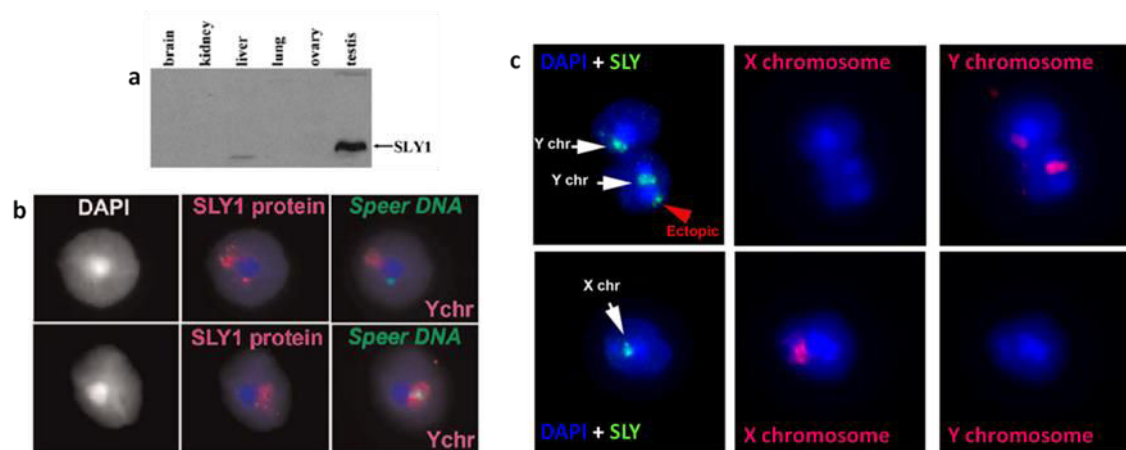


Figure 31. SLY est enrichie sur la chromatine sexuelle et sur le cluster de gènes *Speer* des spermatides rondes. a. Détection en Western Blot de la protéine SLY dans différents tissus murins. SLY est spécifique du testicule. b. Détection par immunofluorescence de SLY (en rose) et par peinture chromosomique des gènes *Speer* (en vert). Le noyau des spermatides rondes est marqué grâce au DAPI. c. Détection par immunofluorescence de SLY (en vert) et par peinture chromosomique des chromosomes X et Y (en rose). Le noyau des spermatides rondes est marqué grâce au DAPI. Extrait de [93, 194].

La mise en place d'une expérience de double hybride chez la levure a permis l'identification de trois partenaires potentiels pour la protéine SLY : APPBP2, DKKL1 et KAT5. DKKL1 est une protéine acrosomale facilitant le passage de la zone pellucide par le spermatozoïde [195]. La protéine cytoplasmique APPBP2 est associée aux microtubules et au transport intracellulaire des protéines précurseurs de l'amyloïde [196]. Enfin, il est peu probable que SLY et KAT5 soient de réels partenaires dans le contexte de la spermiogenèse car KAT5 est faiblement exprimée dans les spermatides rondes [93]. Cependant, SLY pourrait

être susceptible d'interagir avec un autre membre de la famille des KAT, dont la séquence serait relativement conservée avec KAT5.

Caractérisation du rôle de SLY : utilisation de souris déficientes en SLY

En 2009 et en 2012, deux modèles de souris déficientes en SLY1 et SLY1/2 ont été produits grâce à l'expression de petits ARNs interférents (siRNA pour *small interfering RNAs*) [93, 190]. Le transgène contenant les différentes séquences shSLY (*short hairpin SLY*) sont sous le contrôle du promoteur U6 de la polymérase III garantissant une expression forte et ubiquitaire de ce transgène (**Figure 32a**). Etant donné que les protéines SLY1 et SLY2 ne sont présentes que dans les spermatides, les transgènes shSLY ubiquitaires n'ont aucune conséquence sur les autres tissus [93].

Les souris déficientes en SLY1 (souris sh344) présentent une diminution significative de plus de 60% des transcrits et de la protéine SLY1 (**Figure 32b**). Les souris déficientes en SLY1 et SLY2 (souris sh367) ont une diminution d'au moins 60% des transcrits *Sly1* et *Sly2* (**Figure 32b**). Alors que la protéine SLY1 (bien que très fortement diminuée) est encore présente chez les souris sh344, elle n'est plus détectable en Western Blot dans les échantillons des souris sh367 (**Figure 32c**).

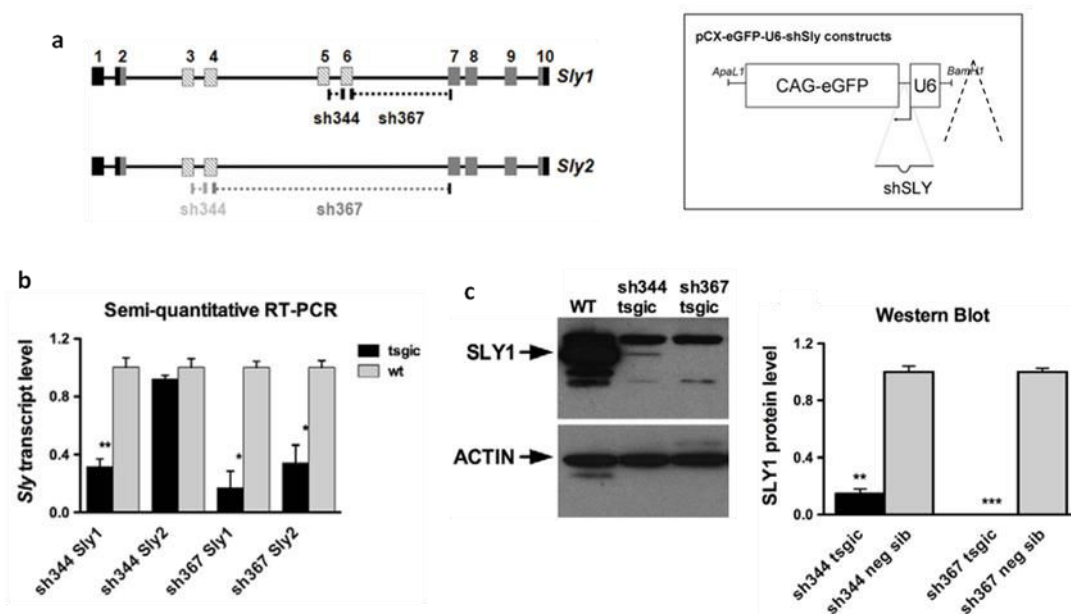


Figure 32. Production de souris déficientes en SLY1 et en SLY1/2. **a.** Structure du gène *Sly* et du transgène shSLY. **b.** Le niveau d'expression du transcrit *Sly1* est significativement diminué dans les souris sh344. L'expression du transgène sh367 entraîne une baisse significative de *Sly1* et *Sly2*. **c.** Quantification de la diminution des protéines SLY1 dans les souris sh344 et sh367 par Western Blot. L'expression du transgène sh344 provoque une baisse significative de la quantité de protéine SLY. La protéine SLY n'est pas détectée dans les souris sh367. Extrait de [190].

- Rôle de SLY pendant la spermiogenèse

Le phénotype des souris sh344 est très léger par rapport aux souris sh367. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que SLY1 et SLY2 puisse endosser des fonctions différentes. Cependant, cette hypothèse n'est pas la plus vraisemblable. En effet, considérant la forte similarité structurale entre SLY1 et SLY2, la différence phénotypique des souris sh344 et sh367 s'explique plus probablement par la persistance plus importante de la protéine SLY1 dans les souris sh344 par rapport aux souris sh367, ou la nécessité d'une certaine dose de SLY1 et SLY2 cumulées. Compte tenu de ses caractéristiques, la plupart des analyses suivantes se concentreront principalement sur les souris sh367, qui seront désignées Sly-KD (ou shSLY) dans la suite de ce manuscrit.

Une vaste majorité (92%) des spermatozoïdes produits par les souris Sly-KD présente des anomalies importantes de la tête récapitulées sur la **Figure 33**. Ces anomalies morphologiques sont accompagnées d'une mobilité altérée des spermatozoïdes. Le phénomène de rétention des spermatides condensées matures au-delà du stade VIII présents chez les différentes souris MSYq- a également lieu dans les testicules Sly-KD.

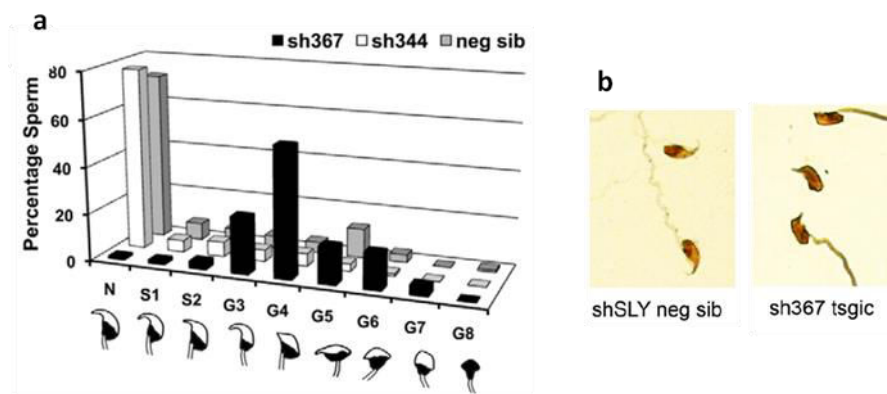


Figure 33. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes produits par les souris shSLY (sh344). **a.** Analyse des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. 300 spermatozoïdes ont été étudiés par mâles, avec 3 mâles pour sh367 et sh344 et 5 mâles pour le contrôle négatif (neg sib). **b.** Coloration en argent des spermatozoïdes épидидymaires issus du contrôle négatif (neg sib) ou des souris sh367. Extrait de [93, 190].

Les souris Sly-KD, contrairement aux souris sh344, sont hypofertiles *in vivo* et ne génèrent que très peu de descendance lors d'accouplements par rapport aux contrôles (11 individus contre 70 chez les souris WT) [93]. De même, aucun ovocyte parvenu au stade 2-cellules n'a pu être obtenu en FIV [93]. Bien que les souris soient hypofertiles, Cocquet et al. ont mis en évidence l'existence d'une tendance à la distorsion du sexe-ratio en faveur des femelles chez les portées issues des souris Sly-KD. En effet, 55.5% (79 sur 142) des portées

sont composées de femelles contre 47.8% (176 sur 368) (p -value=0.0569). Le phénotype généré par l'absence de SLY reproduit en partie celui obtenu lors d'une délétion du MSYq, aussi bien sur le plan de la baisse de fertilité des souris, sur la distorsion du sexe-ratio que sur les problèmes de motilité, morphologie, et compaction de la chromatine dans les spermatozoïdes.

- Implication de SLY dans le remodelage de la chromatine

De la même manière que pour les souris MSYq-, Riel et al. ont effectué sur les souris Sly-KD (et également sur les souris sh344) des tests de comètes, ainsi que des observations au microscope électroniques et l'analyse de l'incorporation du composant CMA3 dans la chromatine afin évaluer l'état de compaction de la chromatine ainsi que la prévalence des cassures de l'ADN (**Figure 34a-c**) [190]. Les souris sh344 présentent un phénotype similaire au souris 2/3MSYq-, alors que les souris Sly-KD (sh367) ont un phénotype intermédiaire entre les souris 2/3MSYq- et 9/10MSYq-. L'intensité des problèmes de compaction de la chromatine et de l'apparition de cassures double brin de l'ADN est fortement corrélée à la sévérité de l'hypofertilité des souris.

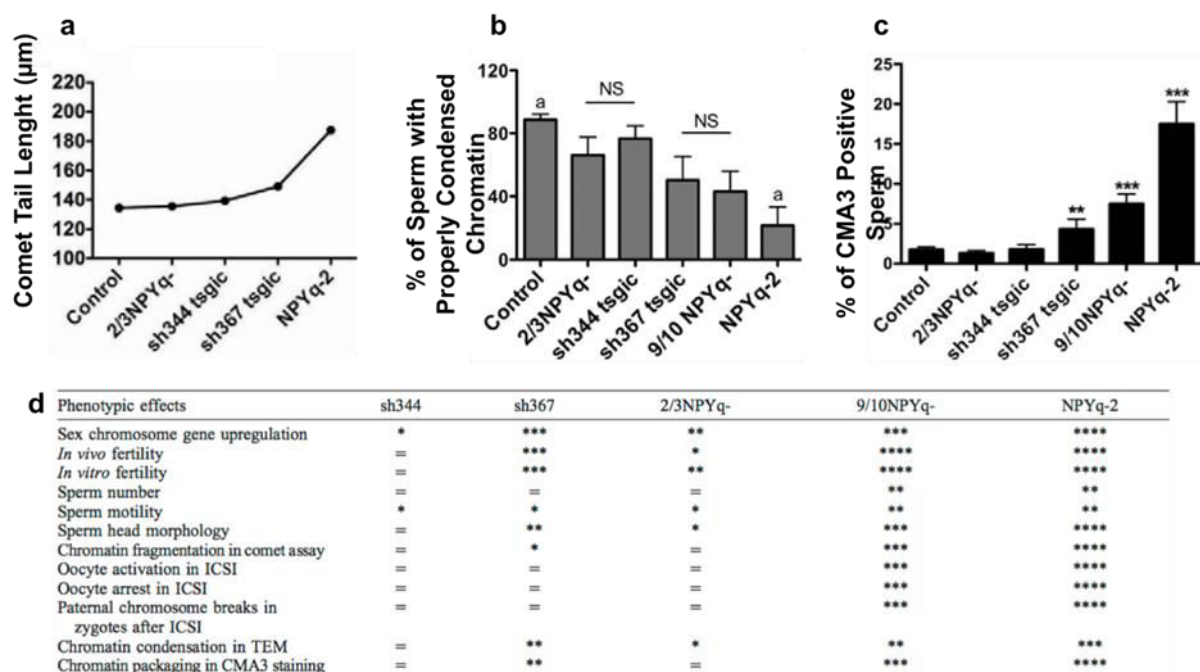


Figure 34. Etat de la compaction de la chromatine et recensement des cassures double brin sur les souris 2/3MSYq-, sh344, sh367 (Sly-KD), 9/10MSYq- et MSYq-. a. Tests des comètes sur les spermatozoïdes provenant des différents génotypes. La longueur de la comète générée est indiquée en ordonnée. **b.** Observation en microscopie électronique à transmission de l'état de compaction de la chromatine. Le pourcentage de spermatozoïdes présentant une compaction normale de la

chromatine est indiqué en ordonnée. **c.** Analyse du nombre de spermatozoïdes ayant intégré le composant CMA3. Le pourcentage de spermatozoïdes présentant une compaction normale de la chromatine est indiqué en ordonnée. Extrait de [190]. **d. Récapitulatif des phénotypes des spermatozoïdes et des résultats d'ICSI effectués avec les spermatozoïdes épидидymaires des cinq types de mutants sh344, Sly-KD (sh367), 2/3MSYq-, 9/10MYq- et MSYq-** = pas de changement entre les contrôles et le génotype testé ; * légère altération ; ** altération modérée ; *** altération sévère ; **** altération extrêmement sévère. NPY correspond au segment non-apparié du chromosome Y (ou *Non-Pairing Y chromosome long arm*), équivalent du MSYq. Extrait de [191].

- Rôle de SLY dans la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels

Afin de déterminer si l'absence de SLY entraîne les mêmes effets que la délétion du MSYq chez la souris, une analyse de l'expression des gènes en présence ou en l'absence de cette protéine a été menée sur les souris sh367. L'étude transcriptomique menée par Cocquet et al. révèlent que 230 gènes sont différentiellement exprimés dans le testicule en l'absence de SLY, majoritairement liés aux chromosomes X et Y [93]. De façon très marquée, les gènes liés aux chromosomes sexuels sont surexprimés et les gènes autosomaux sont réprimés (**Tableau 5**).

Tableau 5. Distribution chromosomique et nombre de gènes dérégulés dans les testicules des souris Sly-KD. *All* désigne l'intégralité des gènes dérégulés sans valeur seuil imposée. **>1.5 fold** représente le nombre de gènes surexprimés ou réprimés dont les valeurs d'expression sont multipliées par au moins 1,5. Extrait de [93].

		up-regulated	down-regulated	Total
All				
	Total	171	59	230
	X-linked	86 (50.3%)	0	86 (37.4%)
	Y-linked	27 (15.8%)	1 (1.7%)	28 (12.2%)
	Autosomal	58 (33.9%)	58 (98.3%)	116 (50.4%)
>1.5 fold				
	Total	118	14	132
	X-linked	68 (57.6%)	0	68 (51.5%)
	Y-linked	27 (22.9%)	0	27 (20.5%)
	Autosomal	23 (19.5%)	14 (100%)	37 (28%)

Certains des gènes simple copie localisés sur le chromosome X sont impliqués dans des processus essentiels de la spermiogenèse tels que la formation de l'acrosome (*Actrt1* et *Spaca5*) ou la compaction de la chromatine (les variants d'histone *H2a1* et *H2a2y*, ou le facteur d'assemblage de la chromatine *Chaf1b*). Ainsi, leur dérégulation pourrait expliquer l'émergence des malformations importantes des spermatozoïdes des souris Sly-KD et MSYq- [93].

La plupart des gènes multicopies du chromosome X et Y, ainsi qu'un cluster de gènes sur le chromosome 5 (gènes *Speer*) sont également surexprimés dans les spermatides. Aucun changement d'expression et une surexpression faible sont observés respectivement pour *Asty*

et *Orly*, suggérant que ces gènes ne sont pas impliqués dans le phénotype hypofertile des souris Sly-KD et MSYq⁻. La surexpression de SSTY1/2 et des deux homologues du chromosome X de SLY, SLX et SLXL1, sont confirmés au niveau protéique [93].

Une diminution des marques épigénétiques répressives H3K9me3 et CBX1 de la PMSC pourrait être à l'origine de la levée de la répression transcriptionnelle et de la surexpression des gènes des chromosomes sexuels (Figure 33).

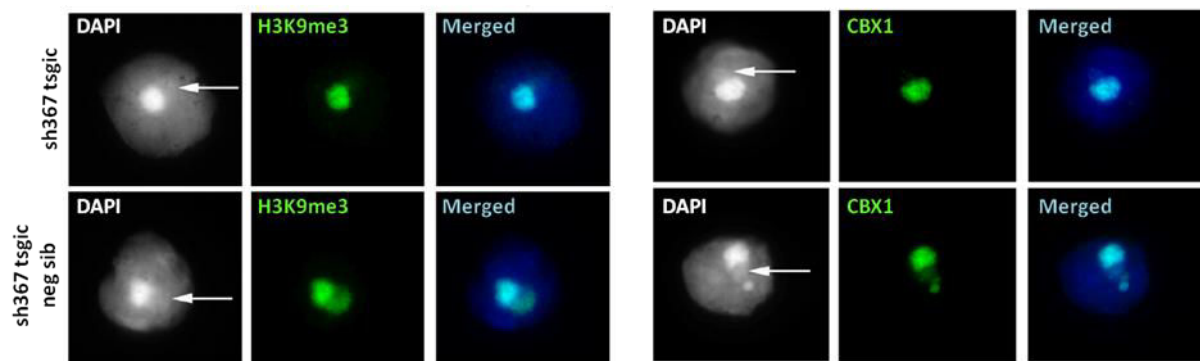


Figure 35. Anomalies épigénétiques des chromosomes sexuels dans les souris Sly-KD. a-c. Marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) de l'ADN de spermatides rondes. La chromatine sexuelle est indiquée par une flèche. **Panel de gauche.** Détection par immunofluorescence de H3K9me3 dans les spermatides rondes. **b.** Détection par immunofluorescence de CBX1 dans les spermatides rondes. Extrait de [93].

La génération de souris déficientes en SLY par Cocquet et al. démontre que cette protéine est essentielle à la régulation épigénétique et transcriptionnelle des chromosomes sexuels [93]. Le mécanisme moléculaire par lequel SLY est capable seul de réguler l'expression de plus d'une centaine de gènes est une *terra incognita*. La recherche de partenaires ainsi que l'identification des sites de fixation à l'ADN de SLY permettraient de lever le voile mais également d'alimenter nos connaissances sur les réseaux de régulation mis en action pour le contrôle (épi)génétique des chromosomes sexuels dans les spermatides.

L'étude menée sur SLY a été initialement motivée par la recherche du "facteur MSYq" responsable du phénotype des souris 2/3MYq⁻ et MSYq⁻. Toutefois, bien que le phénotype obtenu en l'absence de la protéine SLY récapitule en grande partie celui des souris 2/3MYq⁻ et MSYq⁻ (**Tableau 4** et **Figure 34**), les souris Sly-KD présentent une altération des capacités fécondantes des spermatozoïdes plus bénignes que les souris MSYq⁻, notamment par rapport à l'intensité des phénotypes obtenus et les taux de succès de l'ICSI en fonction des phénotypes. A partir de cette constatation, deux hypothèses peuvent être énoncées. Premièrement, dans le modèle Sly-KD la suppression de l'expression de SLY n'est pas complète et, la faible quantité de protéine produite pourrait permettre de corriger partiellement le

phénotype des souris Sly-KD. Deuxièmement, le bras long du chromosome n'abritant pas uniquement le gène *Sly*, le phénotype obtenu par la délétion du MSYq pourrait provenir de l'absence d'un ou plusieurs autres gènes contenus dans cette portion de chromosome.

b. SSTY : un candidat prometteur pour la régulation de la PMSC dans les spermatides rondes

Les gènes multicopies *Ssty1/2* sont les candidats les plus prometteurs pour prétendre au rôle du "facteur MSYq" manquant. En effet, alors que le gène *Asty* ne possède aucune ORF intacte et que les gènes *Orly* ne sont pas dérégulés en l'absence de SLY, et que le niveau d'expression de *Srsy* n'est pas détectable dans les testicules [151], les protéines SSTY sont spécifiquement retrouvées dans les spermatides rondes et sont également surexprimées chez les souris shSLY [93].

Les protéines SSTY appartiennent à la famille des SSTY/SPIN protéines qui comprend 3 autres membres (*Spin1*, *Spin2d* ou *Sstx*, et *Spin4*). Les gènes *Ssty1* et *Ssty2* produisent deux protéines SSTY1 et SSTY2 et possèdent 85 et 221 copies respectivement [151]. SSTY1 et SSTY2 sont fortement similaires entre elles (76.65%) et avec SPIN1 (respectivement 57.52% et 54.42%). SPIN1 est le membre de la famille SSTY/SPIN le mieux caractérisé jusqu'à présent. Cette protéine possède trois domaines Tudor et interagit spécifiquement avec H3K4me3 et H3R8me2a [197]. Il est intéressant de souligner que les résidus nécessaires à la reconnaissance de H3K4me3 sont tous conservés chez les protéines SSTY1 et SSTY2 (**Figure 36**) [197]. De plus, une analyse protéomique menée sur différents tissus murins a détecté la présence de SPIN1 et SSTY sur les résidus H3K4me3 [198]. Bien que ces récents résultats doivent être confirmés *in vitro*, il est fort probable que SSTY1 et SSTY2 soient capable de lier directement la chromatine et d'interagir avec les résidus H3K4me3.

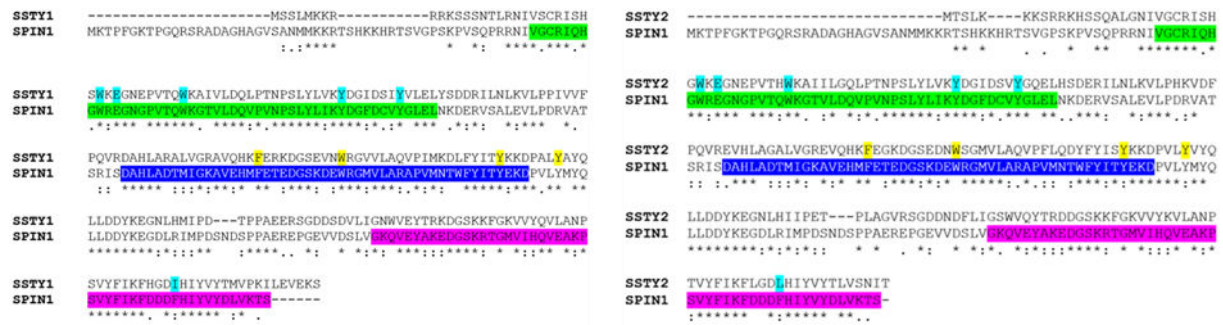


Figure 36. Alignement des séquences de SSTY1 et 2 avec SPIN1. Trois domaines Ssty/Spin sont conservés et présents chez les membres de la famille Ssty/Spin. Les résidus surlignés en bleu clair correspondent aux résidus essentiels pour l'interaction entre SPIN1 et H3R8me2a et en jaune correspondent les résidus essentiels pour l'interaction entre SPIN1 et H3K4me3.

Ces gènes, dont la fonction reste aujourd'hui inconnue, possède un gène multicopies homologue sur le chromosome X. Le gène *Spin2d* (également appelé *Sstx*) possède 11 copies sur le chromosome X. La séquence prédite de la protéine possède 50.88% et 48.23% d'homologie avec SSTY1 et SSTY2, et 55.51% de similarité avec SPIN1. Les différentes copies de *Spin2d* sont fortement conservées (plus de 90% similarité) et conservent pour la plupart les résidus essentiels à l'interaction avec H3K4me3. Les transcrits *Spin2d* sont spécifiquement exprimés dans le testicule et la localisation de la protéine dans le noyau des cellules *in vitro* en transition transitoire laisse à penser que SPIN2D est nucléaire (données non-présentées).

Cette dernière particularité de SSTY de posséder un homologue sur le chromosome X est partagée avec la plupart des gènes multicopies du chromosome Y. SLY ne fait pas exception à cette règle et possède deux protéines homologues appelées SLX et SLXL1. En 2010, Cocquet et al. ont démontré que ces protéines étaient également impliquées dans la régulation des chromosomes sexuels lors de la spermiogenèse.

c. Deux autres membres de la famille SYCP3-like : SLX et SLXL1

SLX et SLXL1 sont des protéines homologues à SLY

Les protéines SLX et SLXL1 similaires à 70.14%, sont spécifiquement exprimées dans les spermatides rondes. Plus spécifiquement, les protéines SLX et SLXL1 sont principalement localisées dans le cytoplasme des cellules (**Figure 37**) [199]. Les deux protéines possèdent un domaine COR1 et, contrairement à SLY, elles ne possèdent pas de signal NLS dans leur séquence protéique.

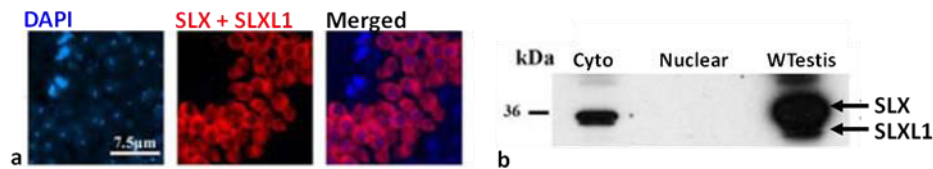


Figure 37. SLX et SLXL1 sont spécifiquement exprimées dans le cytoplasme des spermatides ronds. a. Détection par immunofluorescence de SLX et SLXL1 (en rouge) sur une section de tubule séminifère. Le noyau des spermatides ronds est marqué au DAPI. b. Extraction nucléaire et cytoplasmique de spermatides ronds ainsi qu'un extrait protéique de testicule entier. Détection des protéines SLX et SLXL1. Extrait de [199].

Caractérisation du rôle de SLX et SLXL1 : utilisation de souris déficientes

- Production de souris *Slx*/*Slxl1*-KD

De la même manière que pour l'étude de *SLY*, un transgène shRNA a été intégré chez des souris afin de générer une diminution de la quantité de protéines *SLX* et *SLXL1* dans les spermatides. Deux lignées, appelées *Slx1*-KD (ou shSLX1) et *Slx2*-KD (ou shSLX2), ont été générées. Les souris *Slx1*-KD présentent une diminution des transcrits *SLX* et *SLXL1* d'au moins 60% et cette baisse est confirmée au niveau protéique (**Figure 38**). Les souris *Slx2*-KD n'expriment quasiment plus le transcrit correspondant à *SLX* mais présente une efficacité très faible concernant *SLXL1* (**Figure 38**). La co-expression des deux transgènes provoque à la fois une baisse drastique de *SLX* et *SLXL1*, tant au niveau de la quantité d'ARNm que protéique (**Figure 38**).

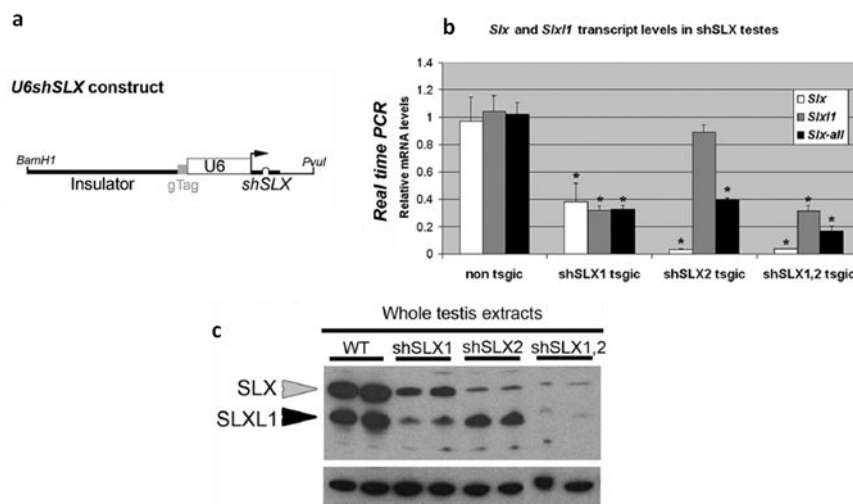


Figure 38. Production de souris déficientes en *SLX* et en *SLXL1*. a. Structure du transgène shSLX. b. Le niveau d'expression des transcrits *Slx* et *Slxl1* sont significativement diminués dans les souris *Slx1*-KD (shSLX1) et *Slx1,2*-KD (shSLX1,2). L'expression du transgène shSLX2 entraîne une baisse significative de *Slx*. c. Quantification de la diminution des protéines *SLX* et *SLXL1* dans les souris *Slx1*-KD (shSLX1), *Slx2*-KD (shSLX2) et *Slx1,2*-KD (shSLX1,2) par Western Blot. Extrait de [199].

- Rôle de SLX/SLXL1 pendant la spermiogenèse

Les souris Slx1,2-KD sont infertiles et les souris Slx1-KD et Slx2-KD ont une forte baisse de leur capacité reproductrice *in vivo* et *in vitro*. Un nombre limité de progéniture est issu d'accouplements avec les souris mâles Slx1-KD et Slx2-KD (respectivement 9,83 et 18,83 par rapport à 70,17 chez des souris WT) [199]. Cette différence se situe tant au niveau du nombre de portées que du nombre de progénitures par portée. De même, le pourcentage d'ovocytes fécondés est extrêmement faible concernant les trois modèles de souris transgéniques (entre 0 et 5% contre 54,5% pour des souris sauvages). Les spermatozoïdes présentent des anomalies de la tête (**Figure 39**) ainsi que des anomalies de la jonction flagelle-tête qui sont plus fréquemment observées parmi les deux phénotypes Slx1-KD et Slx2-KD que dans les souris WT. Ces anomalies sont accompagnés par une baisse de moitié de la proportion de spermatozoïdes mobiles. Malgré l'hypofertilité des souris Slx1-KD, une distorsion du sexe-ratio en faveur des mâles est observée dans les portées : 40% (74/187) des progénitures sont des femelles contre 51% (234/461) chez les souris WT. Ces valeurs correspondent exactement à celles rapportées pour les portées issus des croisements des souris 2/3MSYq- [200].

Comme les différentes souris MSYq- et Sly-KD, une rétention des spermatides de stade 16 a lieu et les spermatides sont retrouvées au-delà des stades VIII dans les tubules séminifères [93, 201]. Toutefois, ces spermatides condensées matures sont regroupées le plus souvent en grappes localisées à proximité de la membrane basale du tubules séminifères et sont apoptotiques.

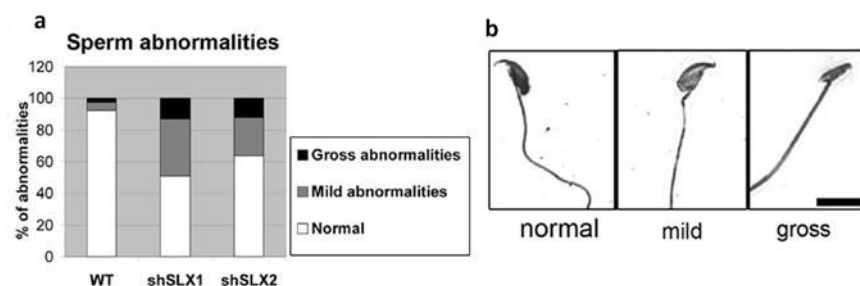


Figure 39. Anomalies morphologiques des spermatozoïdes produits par les souris Slx1-KD (shSLX1) et Slx2-KD (shSLX2). a. Analyse des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. b. Coloration en argent des spermatozoïdes épидидymaires issus du des souris transgéniques et illustrant les différentes anomalies de la tête. Extrait de [199].

- Rôle de SLX/SLXL1 dans la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels ?

Afin de mieux comprendre le rôle de SLX et SLXL1 dans les spermatides, une analyse transcriptomique sur puce à ADN a été effectuée sur une population purifiée de spermatides rondes issues de souris *Slx1-KD* [199]. Contrairement aux souris *Sly-KD* dont la majorité des gènes dérégulés sont liés aux chromosomes sexuels, l'absence de SLX/SLXL1 provoque la dérégulation d'une centaine de gènes principalement autosomaux.

Les gènes dérégulés en l'absence de SLX/SLXL1 peuvent être classés selon leur variation d'expression. Le groupe principal est composé des gènes autosomaux surexprimés dans les spermatides *Slx1-KD*. On y trouve des enzymes du métabolisme énergétique (*Nqo2*, *Atp6v1h*), des protéines appartenant à la voie de l'ubiquitination (*Usp3* et *Ube2g2*) ou encore des protéines du cytosquelette et de la matrice extracellulaire. Ce groupe a principalement une action cytoplasmique. Le deuxième ensemble de gènes est composé de gènes liés aux chromosomes sexuels. Ces gènes sont tous réprimés dans les spermatides rondes *Slx1-KD*. Les gènes appartenant au chromosome Y ont été identifiés après la publication de l'article dont la **Figure 40** est extrait et ne figurent donc pas dessus.

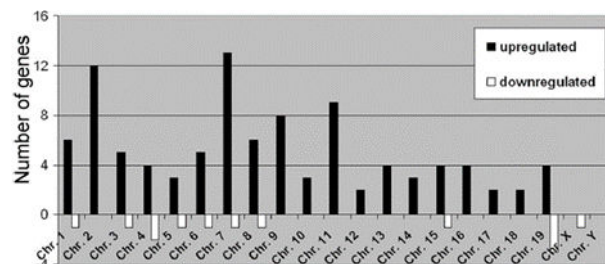


Figure 40. Distribution chromosomique des gènes dérégulés dans les souris *Slx1-KD*. Le nombre de gènes dérégulés est représenté en ordonnée. Ultérieurement à la publication de l'article dont est issu la figure, un petit groupe de gènes réprimés et liés au chromosome Y a été mis en évidence. Extrait de [199].

Les protéines SLX/SLXL1 possèdent une fonction cytoplasmique importante, non seulement du fait qu'elles contrôlent l'expression de gènes cytoplasmiques engagés dans des processus nécessaires à la viabilité des cellules, mais également parce que leur absence génère des malformations spécifiques aux souris *Slx1-KD* (problèmes de jonctions tête-flagelle et cellules apoptotiques) qui ne sont pas présentes sur les spermatozoïdes issus des souris *Sly-KD*. De plus, des expériences de co-immunoprécipitations ont montré une interaction entre SLX/SLXL1 et DKKL1 quand ils sont co-transfectés dans une même cellule. Bien que cette interaction nécessite une confirmation *in vivo*, DKKL1 est une protéine cytoplasmique acrosomale qui pourrait permettre la localisation cytoplasmique de SLX/SLXL1 et/ou servir de

relai pour l'action cytoplasmique de SLX/SLXL1. Considérant la localisation principalement cytoplasmique de SLX/SLXL1 observée en Western Blot et en immunofluorescence, la dérégulation de centaine de gènes dans les souris *Slx1-KD* peut paraître déconcertante. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce sujet. Premièrement, la perturbation des processus cytoplasmiques impliqués dans la compaction de l'ADN et l'élongation des spermatides pourrait aboutir indirectement à la sur-expression des gènes. Deuxièmement, un partenaire (non-identifié) pourrait permettre de relier la localisation cytoplasmique de SLX/SLXL1 à son rôle de régulateur de transcription (*e.g* ce partenaire pourrait être séquestré par SLX/SLXL1 dans le cytoplasme et l'absence de SLX/SLXL1 conduirait inéluctablement à son transfert vers le noyau et à la dérégulation des gènes qu'il contrôle).

d. SLY et SLX/SLXL1 : le *yin* et le *yang* de la régulation transcriptionnelle des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse

Force est de constater que les phénotypes produits par l'absence de SLY ou de SLX/SLXL1 produisent des résultats antagonistes. A titre d'illustration, nous pouvons citer la distorsion du sexe-ratio en faveur des mâles lors d'accouplements en présence de souris mâles *Slx-KD1* et inversement un sexe-ratio en faveur des femelles dans les portées issus de croisements avec des mâles *Sly-KD* [93, 199]. Cette tendance pour un chromosome sexuel de favoriser sa propre transmission à sa descendance témoigne très vraisemblablement d'un conflit intragénomique impliquant *Sly* et *Slx/Slxl1*.

SLX/SLXL1 : des protéines activatrices de la PMSC ?

Dans les souris *Sly-KD*, la localisation de SLX/SLXL1 bascule du cytoplasme vers le noyau (76% des spermatides rondes *Sly-KD* présentent un signal SLX/SLXL1 nucléaire, 280/369) [194]. La vaste majorité du signal est alors localisée sur les chromosomes sexuels (96,5%, 82/85) et avec le cluster de gènes *Speer*. Alors que l'expression de *Sly* est inchangée dans les spermatides *Slx1-KD*, les transcrits *Slx* et *Slxl1* sont surexprimés dans les spermatides *Sly-KD* (**Figure 41a-b**). Cependant, la relocalisation n'est que peu probablement due à la surexpression de SLX et SLXL1. Des modèles transgéniques de surexpression de protéines taguées Myc-SLX/SLXL1 n'arborent aucun signal SLX/SLXL1 dans les spermatides rondes

(données non publiées de J. Cocquet). L'absence de SLY permet donc aux protéines SLX/SLXL1 d'accéder au noyau et d'adopter à l'identique le patron d'expression de SLY. La surexpression des gènes liés aux chromosomes sexuels pourrait donc être une conséquence directe des protéines SLX/SLXL1 fixées sur la chromatine.

Afin d'étudier plus en détails le potentiel conflit génomique entre ces deux gènes, Cocquet et al. ont généré des souris double transgéniques exprimant à la fois les transgènes shSLX1 et shSLY et empêchant la traduction des protéines SLY et SLX/SLXL1 (**Figure 41a-b**) [194].

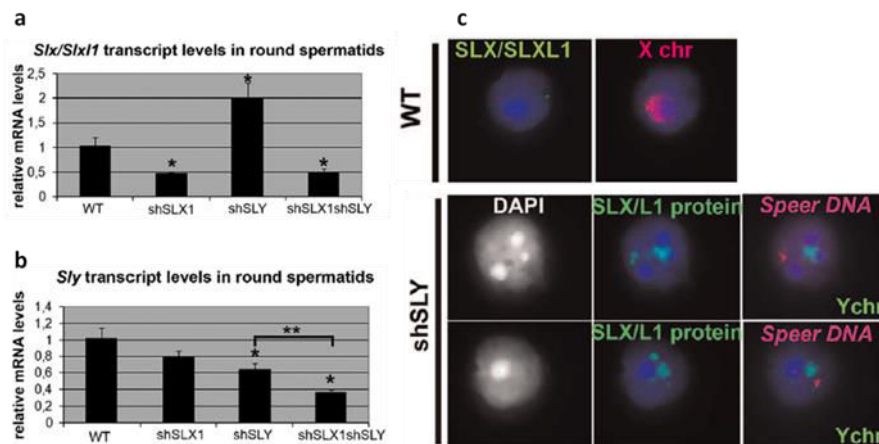


Figure 41. Les protéines SLX et SLXL1 sont enrichies sur les chromosomes sexuels et sur le cluster de gènes *Speer*. a-b. Niveau d'expression des transcrits *Sly* et *Slx/Slx1* dans les spermatides rondes des souris Sly-KD (shSLY), Slx1-KD (shSLX1) et Sly/Slx1-KD (shSLX1shSLY). c. Détection par immunofluorescence des protéines SLX et SLXL1. Localisation des chromosomes sexuels et du cluster de gènes *Speer* par peinture chromosomique. Le noyau des spermatides rondes est marqué au DAPI. Extrait de [199].

SLY et SLX/SLXL1 ont des effets antagonistes nucléaires et cytoplasmiques

Les mâles Sly/Slx1-KD présentent plusieurs caractéristiques remarquables. Tout d'abord, leur fertilité est étonnamment améliorée. Du point de vue du nombre de spermatozoïdes que du nombre de portées, les valeurs obtenues pour les mâles Sly/Slx1-KD sont proches de celles des souris WT. La rétention des spermatides et leur entrée en apoptose observée chez les souris Slx1-KD ne sont également plus visibles sur les souris Sly/Slx1-KD [194]. Toutefois, des différences persistent concernant la morphologie des spermatozoïdes et la taille des portées.

Non seulement les souris Sly-KD et Slx1-KD présentent une forte dégradation de leurs paramètres reproductifs, mais leur phénotype est également marqué par une forte

dérégulation génique. Or, la disparition concomitante de SLX/SLXL1 et SLY diminue significativement le niveau d'expression des gènes liés aux chromosomes sexuels régulés par SLY ainsi que les gènes autosomaux régulés par SLX/SLXL1 (**Figure 42**). De plus, les marques épigénétiques répressives H3K9me3 et CBX1, habituellement diminuées sur la PMSC des spermatides Sly-KD sont, dans les spermatides Sly/Slx1-KD, à un niveau proche de celui des spermatides WT [194].

Ces résultats confirment que SLY et SLX/SLXL1 ont un effet antagoniste. Alors que SLY est responsable de la répression des gènes liés aux chromosomes sexuels, SLX/SLXL1 jouent le rôle d'activateur sur ce même ensemble de gènes (révélés dans les spermatides Sly-KD) (**Figure 42**). L'inverse est potentiellement vrai pour l'ensemble de gènes autosomaux régulés par SLX/SLXL1. Si la régulation de ces gènes par SLX nécessite une interaction avec un partenaire cytoplasmique, alors, en l'absence de SLX/SLXL1, SLY pourrait jouer un rôle cytoplasmique en interagissant avec le partenaire cytoplasmique et être à l'origine de la dérégulation des gènes autosomaux (**Figure 42**). Toutefois, l'hypothèse la plus probable est que la dérégulation des gènes autosomaux soit indirectement liée aux anomalies de la spermiogenèse dans les spermatides Slx1-KD : la suppression de ces défauts de la spermiogenèse dans les souris Sly/Slx1-KD provoquerait naturellement un retour à la normale.

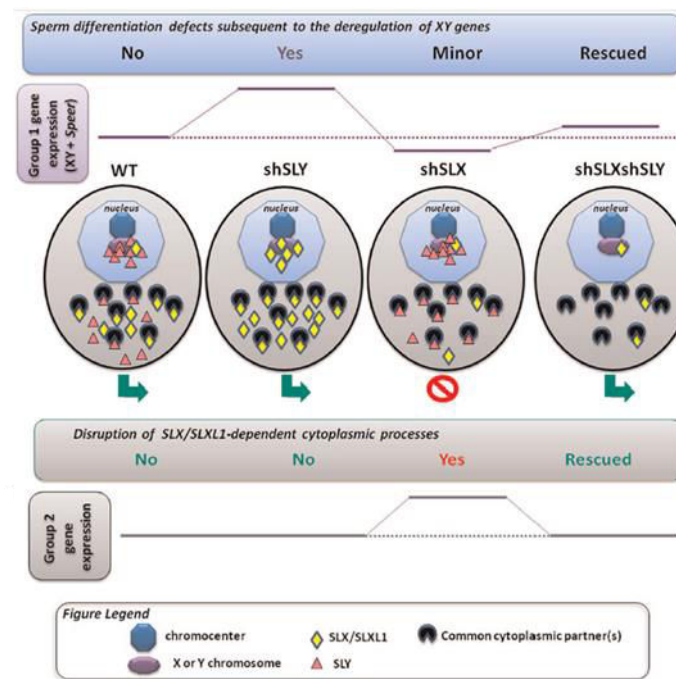


Figure 42. Cohabitation et effets antagonistes des protéines SLY et SLX/SLXL1. Group 1 gene représente les gènes liés aux chromosomes sexuels et surexprimés dans les spermatides Sly-KD (shSLY). Group 2 gene représente les gènes autosomaux surexprimés dans les spermatides Slx1-KD (shSLX1). Les protéines SLY et SLX/SLXL1 ont des effets antagonistes dans le noyau et le cytoplasme. Extrait de [194].

De l'importance des conflits génomiques dans la spéciation des espèces

Un premier constat se dessine à partir des observations précédentes : la distorsion du sexe-ratio et la baisse du pouvoir fécondant des gamètes en fonction du chromosome qu'elles renferment et du génotype des souris dont elles sont issues sont la conséquence d'un déséquilibre entre le nombre de copies de *Sly* et *Slx/Slx1*, et non d'une quantité absolue de protéines SLY et SLX/SLXL1 présentes dans les spermatozoïdes. L'extrême amplification des gènes *Sly* et *Slx/Slx1* malgré leur apparition relativement récente laisse entrevoir la place importante que représente la course aux armements (*Evolutionary Arms Race*) dans l'évolution des gènes *Sly* et *Slx/Slx1*.

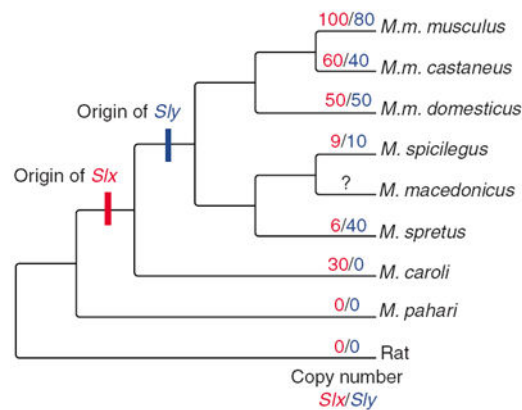


Figure 43. Distribution des copies de *Sly* et *Slx* à travers les différentes lignées de rongeurs. La longueur des branches ne sont pas proportionnelles au temps. *Slx1* n'est pas représentée sur cet arbre. Le nombre de copies pour *Slx* et *Sly* est indiqué sur la branche de chaque espèce. Extrait de [202].

Un croisement entre des souris femelles *M. m. musculus* et des souris mâles *M. m. domesticus* donne naissance à des mâles dont la fertilité est fortement affectée (on parle de mâles hybrides F1 stériles) ; ces mâles possèdent le chromosome X de *M. m. musculus* et le chromosome Y de *M. m. domesticus* et présentent une surexpression des gènes liés au chromosome X accompagnée de défauts de la spermiogenèse (**Figure 44**) [203]. Ces souris mâles possédant un excès de copies *Slx/Slx1* par rapport à *Sly*, le conflit intragénomique qui sévit entre ces deux gènes pourrait contribuer à l'émergence de la stérilité chez les souris F1. Curieusement, le croisement inverse produit une descendance fertile (**Figure 44**) [204]. Cependant, dans les souris *Slx1-KD*, une déficience partielle de SLX/SLXL1 entraîne un phénotype intermédiaire plutôt qu'une infertilité complète. De plus, cette situation rejoint les conditions des croisements effectués en laboratoire pour toutes les études de SLY et

SLX/SLXL1 : le chromosome Y des souris est un chromosome Y^{Ril} (≈ 100 copies de *Sly*) les chromosomes X des souris proviennent des souris *M. m. domesticus* (≈ 50 copies de *Slx*).

Bien que le conflit intragénomique participe vraisemblablement à la spéciation, JM Good nous rappelle que la spéciation est un phénomène extrêmement complexe qui n'est pas exclusivement l'apanage des chromosomes X et Y [204].

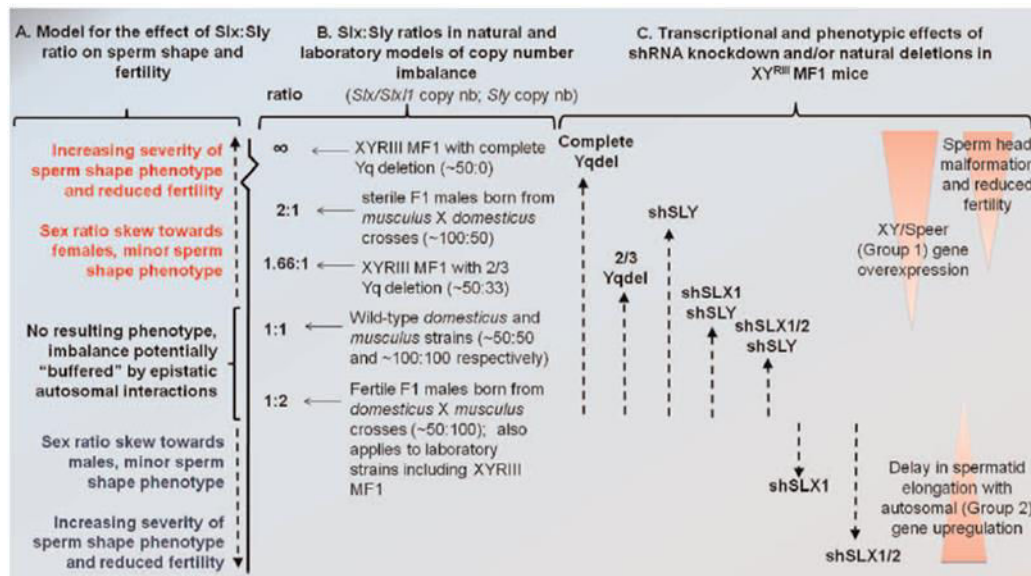


Figure 44. Récapitulatif des effets de balance entre les copies de *Sly* et *Slx/Slxl1*. A. Description des phénotypes obtenus en fonction du nombre de copies de *Sly* et *Slx/Slxl1*. B. Nombre de copies de *Sly* et *Slx/Slxl1* présentes dans différentes souches de laboratoire ou des souches sauvages. C. Phénotype des souris 2/3MSYq- et MSYq- ainsi que des souris transgéniques *Sly*-KD (shSLY), *Slx1*-KD (shSLX1) et *Sly/Slx1*-KD (shSLYshSLX1). Extrait de [194].

Un deuxième constat peut-être également souligné concernant les résultats des études des souris *Sly*-KD, *Slx1*-KD et *Sly/Slx1*-KD. Nous l'avons déjà précisé, l'émergence d'un biais du sexe-ratio est la conséquence d'une baisse du pouvoir fécondant des spermatozoïdes porteurs de l'un ou l'autre chromosome sexuel en fonction des génotypes. Bien que les acteurs du conflit soient clairement identifiés, le mécanisme à l'origine de cette baisse de pouvoir fécondant n'est pas encore déterminé. Les spermatides partageant la plupart de leur contenu à travers les ponts cytoplasmiques présents chez la souris, il faut que le *responder* (ou *gamete killer*) qui engendre un biais du sexe-ratio ne soit pas commun entre les spermatides, sous peine de produire des gamètes suicidaires. La question reste ouverte mais il est probable que l'étude des nombreux gènes multicopies portés par les chromosomes X et Y apportera des données supplémentaires.

e. Régulateurs autosomaux des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse

La découverte de l'implication de SLY et SLX/SLXL1 pendant la spermiogenèse a été possible grâce à la mise en évidence de délétions naturelles du chromosome Y. Bien que ces études aient apporté des éléments importants concernant la régulation épigénétique et transcriptionnelle des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse, il ne faudrait pas omettre de signaler que d'autres protéines impliquées dans la régulation de la PMSC ont été précédemment mises à jour. Et nous ne pouvons conclure cette introduction sans mentionner les régulateurs autosomaux des chromosomes sexuels que sont l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine B et l'ubiquitine-ligase RNF8.

UBE2B est essentielle pour la répression du chromosome X dans les spermatides

Rad6 est une protéine homologue de UBE2B chez la levure qui est une enzyme de conjugaison d'ubiquitine pour l'histone H2B. Chez la souris, UBE2A est également une protéine homologue à UBE2B : elles diffèrent l'une de l'autre de 8 acides aminés. Alors que UBE2A est abondante dans l'ovocyte, UBE2B est fortement exprimée dans les spermatides. Les souris mâles invalidées pour UBE2B (*Ube2b*^{-/-}) sont infertiles, contrairement aux femelles [205]. Alors que le niveau d'ubiquitination des histones H2A et H2B est étonnamment inchangé dans les spermatocytes et les spermatides des souris *Ube2b*^{-/-}, une augmentation du signal H3K4me2 est observée sur la chromatine sexuelle de ces deux types cellulaires. Afin de déterminer si cette dérégulation épigénétique est associée à une perturbation transcriptionnelle, l'équipe de Baarends a mené une analyse transcriptionnelle sur les spermatocytes et les spermatides rondes issus de souris sauvages et *Ube2b*^{-/-} [205]. Ils ont d'abord mis en évidence que la protéine UBE2B empêche l'expression précoce des gènes multicopies portés par le chromosome X dans les spermatocytes de gènes normalement exprimés dans les spermatides rondes (**Figure 45a**). Cet effet est particulièrement significatif pour la famille des gènes *Spin2d* [205].

Alors que la dérégulation transcriptionnelle engendrée par l'absence de UBE2B est modérée au regard du niveau d'expression des gènes normalement exprimés dans les spermatocytes, de nombreux gènes sont fortement dérégulés dans les spermatides rondes.

Les chromosomes sexuels se démarquent des autosomes au niveau du profil de dérégulation des gènes : la vaste majorité des gènes portés par les chromosomes X et Y sont **surexprimés** contrairement aux autosomes qui sont tout autant surexprimés que réprimés dans les spermatides *Ube2b*^{-/-} (**Figure 45b**) [205]. UBE2B agit donc comme un répresseur des gènes liés aux chromosomes X et Y dans les spermatides rondes.

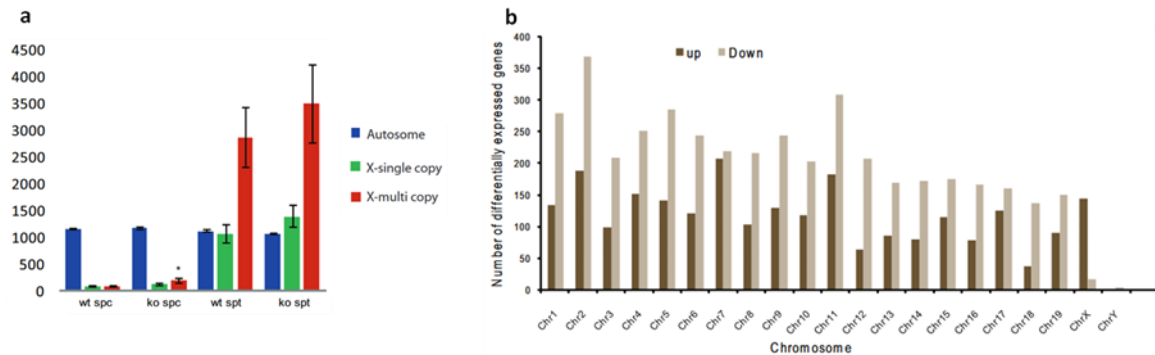


Figure 45. Dérégulation transcriptionnelle dans les spermatocytes et les spermatides issues de souris *UBE2B*^{-/-}. a. Expression moyenne des gènes portés par les autosomes ainsi que des gènes simple copie et multicopies portés par le chromosome X. Une augmentation significative de l'expression des gènes multicopies est observée dans les spermatocytes *UBE2B*^{-/-} (ko). b. Nombre de gènes surexprimés ou réprimés dans les spermatides rondes issues de souris *UBE2B*^{-/-}. La majorité des gènes dérégulés porté par le chromosome X sont surexprimés. Extrait de [20537150].

Contrairement au souris Sly-KD, aucune diminution du signal H3K9me3 n'est observée et le transcrit *UBE2B* n'est pas dérégulé dans les spermatides déficientes en SLY [93, 205]. Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation empruntées par SLY et UBE2B sont très probablement indépendantes. Il est important de noter cependant que, bien que faiblement exprimé, *Ube2a* (dû à sa localisation sur le chromosome X) est surexprimé en l'absence de SLY.

RNF8 régule les marques épigénétiques activatrices de la PMSC

RNF8 est une protéine de 485 AA comprenant un domaine RING C-terminal responsable de son activité enzymatique E3 de conjugaison de l'ubiquitine. Cette protéine est capable d'interagir avec MDC1, et sur les lieux de cassures double brin elle entraîne l'ubiquitination des histones. Des souris transgéniques exprimant uniquement une protéine RNF8 tronquée de son domaine RING ont été générées afin d'étudier le rôle de cette protéine pendant la spermatogenèse.

Une première étude menée en 2010 par Lu et al. révélait que la protéine RNF8 joue un rôle essentiel pour la transition histones-protamines observée normalement dans les spermatides allongées [206]. En effet, bien que l'absence d'ubiquitination des chromosomes

sexuels dans les spermatocytes n'entraîne pas de phénotype particulier pendant la méiose, les spermatozoïdes présentent une tête anormalement arrondie ainsi que des anomalies de la compaction. De plus, aucune protamine (Prm1 ou Prm2) n'est détectée par les auteurs de cette étude dans les spermatozoïdes matures, alors même que les transcrits sont présents à un niveau normal pendant la spermiogenèse (**Figure 46a**) [206]. Plusieurs modifications épigénétiques sont associées à ce phénotype et supposément responsables de la non-incorporation des protamines dans les spermatozoïdes : une diminution de l'ubiquitination de H2A et de H4K16Ac est observée par IF et Western Blot (WB) dans les spermatides allongées des souris *Rnf8*^{-/-} (**Figure 46c**) [206]. L'enzyme majoritairement responsable de l'apparition de K16Ac (KAT8) n'est pas correctement mobilisée sur la chromatine. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'ubiquitination de H2A/H2B est nécessaire pour le recrutement efficace de KAT8 qui a son tour catalyse l'acétylation des résidus H4K16, nécessaire pour le remplacement des histones par les protamines.

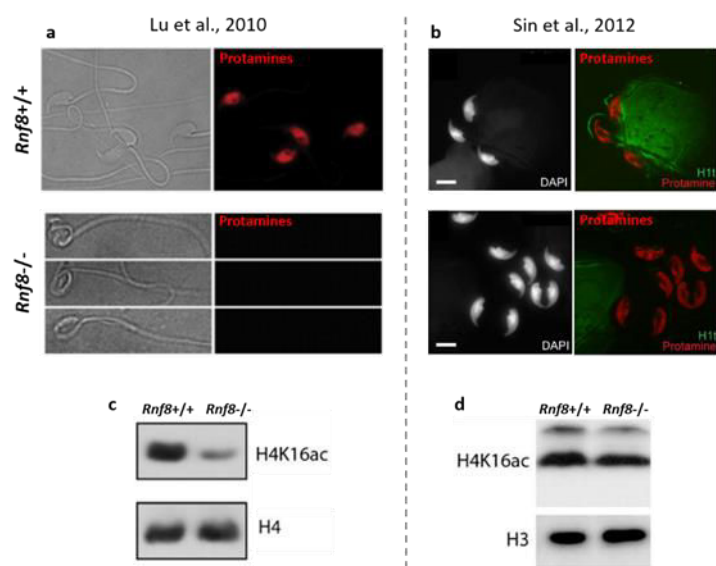


Figure 46. Différences phénotypiques obtenues avec la lignée de souris *Rnf8*^{-/-}. a-b. Détection par immunofluorescence des protamines dans les souris WT et *Rnf8*^{-/-}. c-d. Variation de la quantité de H4K16Ac sur des extraits testiculaires. Extraits de [206, 207].

Toutefois, une seconde étude menée en 2012 par l'équipe de Namekawa apporte des résultats contradictoires et propose un rôle alternatif pour RNF8 au cours de la spermiogenèse. En effet, cette étude ne rapporte ni de baisse significative pour H4K16Ac, ni de problème de protamination dans les spermatozoïdes issus de souris *Rnf8*^{-/-} (**Figure 46b et d**) [207]. Dans leur étude, l'absence de RNF8 entraîne une baisse concomitante de l'ubiquitination de H2A et de la marque épigénétique active H4K20me1 sur les chromosomes

sexuels des spermatocytes au stade pachytène, ainsi qu'une diminution de la marque H3K4me2 sur la chromatine sexuelle des spermatocytes au stade diplotène (**Figure 47a**) [207]. Après la méiose, non seulement la diminution de H3K4me2 est conservée, mais d'autres marques épigénétiques activatrices sont également quantitativement diminuées (H3K4me3 et Kcr) sur la PMSC (**Figure 47b**) [207]. Ces changements au niveau des marques de la chromatine dans les souris *Rnf8*^{-/-} sont certainement responsables de la répression transcriptionnelle de gènes normalement exprimés dans les spermatides ronds et portés par les chromosomes X et Y (**Figure 47c**).

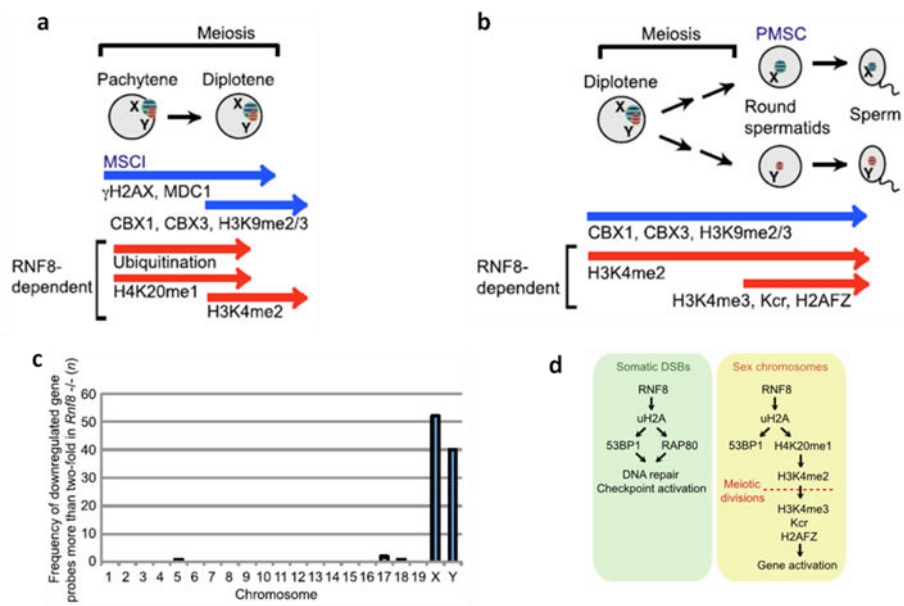


Figure 47. L'absence de RNF8 dans les spermatocytes et les spermatides ronds entraîne des dérégulations épigénétiques et transcriptionnelles chez les chromosomes sexuels. a-b. Apparition des PTMS d'histones dépendantes de RNF8 au cours de la spermatogénèse. **c.** Fréquence des gènes réprimés en fonction de leur localisation chromosomique dans les spermatides ronds issues de souris *Rnf8*^{-/-}. **d.** La régulation des marques épigénétiques activatrices retrouvés sur la chromatine sexuelle des spermatides ronds est indépendante de la voie de signalisation des cassures double brin de l'ADN dans les cellules somatiques. Extraits de [207].

De précédentes études ont démontré que RNF8 était impliquée dans la voie de signalisation mise en place lors de cassures double brin de l'ADN. Alors que son action dans les cellules somatiques soit dépendante de 53BP1 et RAP80, il semblerait que son rôle d'activateur de la transcription emprunte une voie différente dans les spermatides (**Figure 47d**) [207].

Il est difficile de comprendre les différences phénotypiques obtenues pour une même lignée de souris transgénique dans ces deux études. Cependant, il est intéressant de noter que

ces deux recherches décrivent à la fois une implication de RNF8 dans la régulation de la transcription des gènes portés par les chromosomes sexuels, et un rôle dans la compaction de la chromatine dans les spermatides allongées. En effet, les souris Sly-KD présentant également ces deux effets, SLY est impliquée à la fois dans la transcription des gènes et dans la transition histone-protamines des spermatides.

Un modèle pour la régulation transcriptionnelle des chromosomes sexuels dans les spermatides rondes ?

RNF8 et UBE2B ont une action opposée comme en témoigne la disparition de H4K20me2 dans les spermatides *Rnf8*^{-/-} et l'enrichissement en cette marque sur les chromosomes sexuels de spermatides *UBE2B*^{-/-}. De même, alors que RNF8 est nécessaire pour l'activation transcriptionnelle des chromosomes sexuels, SLY est un répresseur de la chromatine. Les mécanismes moléculaires mis en place par RNF8, UBE2B et SLY sont donc probablement indépendants (**Figure 48**) mais reposent tous sur une régulation épigénétique propre aux chromosomes sexuels dans les spermatides rondes.

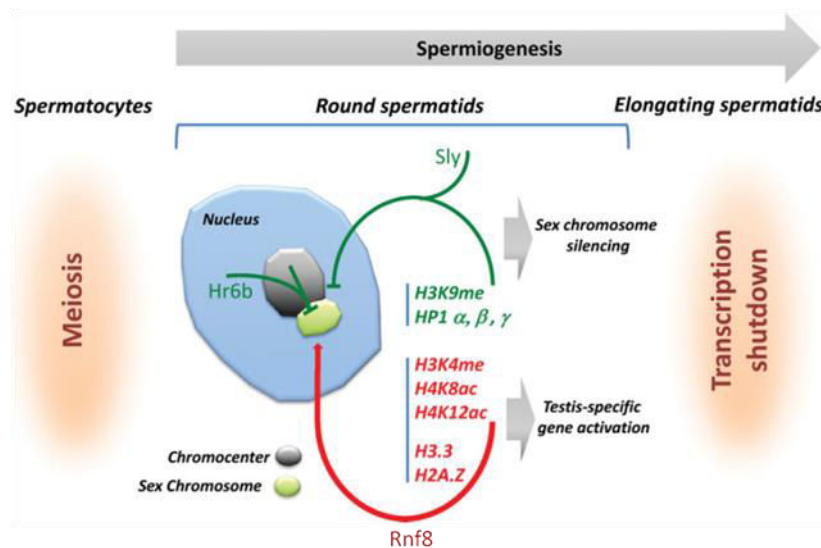


Figure 48. Modèle de régulation de la chromatine sexuelle dans les spermatides ronds. Par le recrutement de marques épigénétiques répressives ou de protéines associées à l'hétérochromatine, SLY réprime l'expression des gènes portés par les chromosomes sexuels. De même, UBE2B est un répresseur de la transcription dont l'absence engendre un enrichissement de marques épigénétiques activatrices. Au contraire, Rnf8 est essentiel pour la mise en place des marques épigénétiques activatrices sur la chromatine sexuelle contenue dans les spermatides ronds et favorise l'expression des gènes portés par le chromosome X et Y. Les marques associées avec les trois régulateurs (RNF8, UBE2B et SLY) de la chromatine sexuelle sont indiquées. Extrait de [87].

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Au cours de la spermatogenèse, les chromosomes sexuels sont successivement réprimés puis partiellement réactivés après la méiose. En 2009, Cocquet et al. ont mis en évidence l'importance du gène *Sly* dans la régulation génétique et épigénétique des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse. Cependant, les mécanismes sous-jacents à l'action de SLY restaient à comprendre.

L'objectif de ce travail a été d'étudier **le mécanisme de régulation de l'expression des chromosomes sexuels pendant la spermiogenèse** *via* la caractérisation de la protéine SLY dans des modèles de souris. Nous nous sommes appliquées à élucider le rôle de SLY au cours de la spermiogenèse grâce à différentes approches :

- La recherche des partenaires et des gènes cibles de SLY
- L'étude des mécanismes du conflit intragénomique *via* l'étude de SLX/SLXL1 et de SSTY, en la présence ou en l'absence de SLY
- La (ré)évaluation de l'état transcriptionnel et du paysage épigénétique des chromosomes sexuels après la méiose

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Article n°1 **SSTY proteins co-localize with the post-meiotic sex chromatin and interact with regulators of its expression**

Considérant les différences phénotypiques entre les souris mâles MSYq- et Sly-KD, nous avons voulu déterminer si SSTY, gène multicopie du bras long du chromosome Y, pouvait être le « facteur MSYq » manquant impliqué dans la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels.

Nous avons mis en évidence que SSTY est une protéine spécifique des spermatides rondes, fortement enrichie sur la chromatine sexuelle en l'absence de SLY. L'interaction exclusive avec SLX/SLXL1, ainsi que le potentiel rôle de SSTY dans la localisation nucléaire de SLX/SLXL1 suggère que, de façon inattendue, SSTY soit une protéine activatrice. Considérant le conflit intragénomique entre *Sly* et *Slx/Slxl1*, nous pensons également que la protéine SSTY est un nouvel acteur du conflit intragénomique.

L'étude de modèles transgéniques invalidés pour SSTY permettront sûrement de lever le voile sur la nature activatrice ou répressive de la régulation transcriptionnelle et chromatinienne par SSTY.

SSTY proteins co-localize with the post-meiotic sex chromatin and interact with regulators of its expression

Aurélie Comptour^{1,2,3,*†}, Charlotte Moretti^{1,2,3,†}, Maria-Elisabetta Serrentino^{1,2,3}, Jana Auer^{1,2,3}, Côme Ialy-Radio^{1,2,3}, Monika A. Ward⁴, Aminata Touré^{1,2,3}, Daniel Vaiman^{1,2,3} and Julie Cocquet^{1,2,3}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016, Institut Cochin, Paris, France

2 Centre National de la Recherche Scientifique, UMR8104, Paris, France

3 Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Paris, France

4 Institute for Biogenesis Research, University of Hawaii, Honolulu, HI, USA

Keywords

chromatin; germ cells; intra-genomic conflict; sex chromosomes; spermatogenesis

Correspondence

J. Cocquet, Faculté de Médecine, Hôpital Cochin, INSERM U1016, Institut Cochin, 24 rue du Faubourg St Jacques, Paris 75014, France

Fax: +33 1 44 41 24 21

Tel: +33 1 44 41 23 19

E-mail: julie.cocquet@inserm.fr

*Present address

Retinoids, Development and Developmental Diseases – EA 7281, School of Medicine, Auvergne University, Clermont-Ferrand, France

[†]These authors contributed equally to this work.

(Received 23 July 2013, revised 7 December 2013, accepted 20 January 2014)

doi:10.1111/febs.12724

In mammals, X- and Y-encoded genes are transcriptionally shut down during male meiosis, but expression of many of them is (re)activated in spermatids after meiosis. Post-meiotic XY gene expression is regulated by active epigenetic marks, which are *de novo* incorporated in the sex chromatin of spermatids, and by repressive epigenetic marks inherited during meiosis; alterations in this process lead to male infertility. In the mouse, post-meiotic XY gene expression is known to depend on genetic information carried by the male-specific region of the Y chromosome long arm (MSYq). The MSYq gene *Sly* has been shown to be a key regulator of post-meiotic sex chromosome gene expression and is necessary for the maintenance/recruitment of repressive epigenetic marks on the sex chromatin, but studies suggest that another MSYq gene may also be required. The best candidate to date is *Ssty*, an MSYq multi-copy gene of unknown function. Here, we show that SSTY proteins are specifically expressed in round and elongating spermatids, and co-localize with post-meiotic sex chromatin. Moreover, SSTY proteins interact with SLY protein and its X-linked homolog SLX/SLXL1, and may be required for localization of SLX/SLY proteins in the spermatid nucleus and sex chromatin. Our data suggest that SSTY is a second MSYq factor involved in the control of XY gene expression during sperm differentiation. As *Slx/Slxl* and *Sly* genes have been shown to be involved in the XY intra-genomic conflict, which affects the offspring sex ratio, *Ssty* may constitute another player in this conflict.

Introduction

The mammalian X and Y chromosomes are enriched in genes that are specifically expressed in the male germ cells, and are thus predicted to be important for spermatogenesis [1–3]. Their expression is under precise epigenetic regulation throughout spermatogenesis: the

sex chromosomes are transcriptionally active during spermatogonial stem cell proliferation, but expression of most X and Y genes (except microRNA [4]) is completely abolished at the pachytene stage of meiosis by a well-characterized epigenetic process,

Abbreviations

MSCI, meiotic sex chromosome inactivation; MSYq, male-specific region of the mouse Y chromosome long arm; PMSC, post-meiotic sex chromatin.

which is conserved among mammals, termed meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) [5]. Silencing of the sex chromosomes is initiated by phosphorylation of the histone H2A variant X (H2AFX) by ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related), followed by MDC1 (mediator of DNA-damage checkpoint 1)-mediated spreading of this signal [6,7] and subsequent recruitment onto the sex chromatin of repressive epigenetic marks such as ubiquitinated H2A or trimethylated lysine 9 of histone H3 (H3K9me3), and of the heterochromatin protein CBX1 (chromobox homolog 1, also known as HP1 β), which mediate gene silencing [8–10]. After meiosis, in haploid germ cells, many X and Y genes are reactivated or specifically activated [2,11,12]; their post-meiotic expression is regulated by a conjunction of active RNF8 (ring finger protein 8)-dependent epigenetic marks and of repressive epigenetic marks acquired during MSCI [13–17].

Deletions of the male-specific region of the mouse Y chromosome long arm (MSYq) cause spermiogenesis defects and male infertility associated with up-regulation of X and Y post-meiotic genes [18–24]. We have demonstrated that deficiency in *Sly* (Sycp3 like Y-linked), an MSYq multi-copy gene, recapitulates many of the phenotypes observed in MSYq-deleted males (i.e. sperm head abnormalities, decreased sperm motility, sperm DNA damage, abnormal chromatin packaging, etc.), and that SLY protein maintains post-meiotic sex chromosome gene expression at a low level [25,26]. Indeed, in males in which expression of *Sly* has been knocked-down (hereafter termed *Sly*-deficient males), the recruitment/maintenance of repressive epigenetic modifications normally associated with the post-meiotic sex chromatin (PMSC) is altered and results in up-regulation of most of the X and Y genes that are (re)activated post-meiotically [25].

Importantly, males without the MSYq region exhibit more severe sperm defects than *Sly*-deficient males, associated with a higher de-repression of XY genes and loss of additional epigenetic marks [24–27]. This difference may be due to insufficient knockdown of *Sly*, but we have observed that limited SLY protein remains in *Sly*-deficient males [25] (J.C. MAW, unpublished data); it is therefore more likely that another MSYq gene contributes to the regulation of post-meiotic sex chromosome gene expression. Due to the abundance of repetitive sequences on the mouse Y chromosome long arm, the annotation and characterization of MSYq genes is not complete. To date, the MSYq is known to encompass four other multi-copy genes (*Ssty*, *Srsy*, *Asty* and *Orly*). *Asty* and *Orly* do not have a coding potential [28,29] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

and there is no information on *Srsy*. The remaining gene, *Ssty* (spermiogenesis specific transcript on the Y), is present in two versions (*Ssty1* and *Ssty2*) and repeated > 100 times on MSYq. SSTY proteins are expressed during sperm development [30] and belong to the family of Spin domain proteins, one member of which has been shown to be a regulator of gene expression and to specifically recognize methylated lysine 4 of histone H3 *in vitro* [31].

In the present study, we investigate SSTY proteins in more details to obtain insight into their function during differentiation of post-meiotic male germ cells. Our work demonstrates that SSTY proteins are specifically present in round and elongating spermatids, co-localize with the PMSC and interact with SLY protein and its X-linked homolog SLX/SLXL1 (Sycp3 like X-linked), which are known regulators of PMSC expression [32]. We also provide data suggesting that localization of SLX/SLY protein to the spermatid nucleus and sex chromatin may depend on the presence of SSTY. All in all, these data are in favor of an important role of SSTY in the control of X and Y gene expression during sperm differentiation, and identify *Ssty* as a novel potential player in the intra-genomic conflict in which *Slx/Slly* genes have previously been shown to be involved [32].

Results

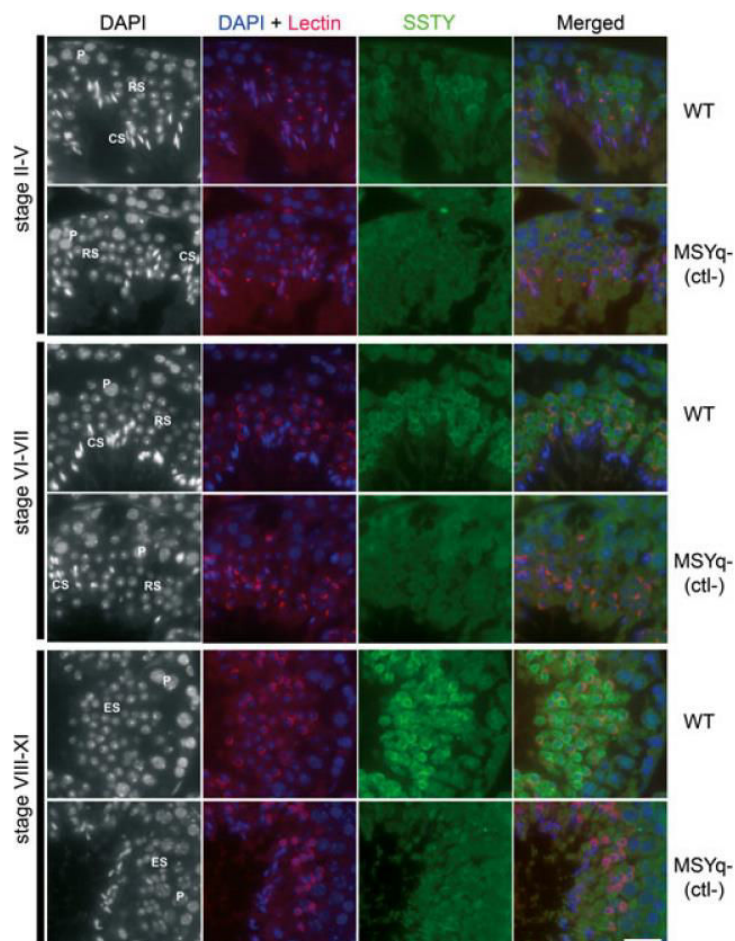
SSTY proteins are present in round and elongating spermatids

SSTY proteins are encoded by two highly related multi-copy genes located on the Y long arm: *Ssty1* and *Ssty2* (84% identity at the nucleotide level, Fig. S1A). It has previously been estimated that there are ~ 80 and 200 copies, respectively, of the *Ssty1* and *Ssty2* genes on the mouse Yq chromosome (for *Mus musculus musculus* Y chromosome [33]). A recent BLAST search of the NCBI database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) using *Ssty1/2* open reading frames led to retrieval of 58 and 131 distinct copies of *Ssty1* and *Ssty2*, respectively. We previously showed by western blot analyses that SSTY1 is specifically expressed during sperm development [30]. Here, we have further investigated the expression of SSTY proteins to determine their precise timing of expression and their intracellular localization. To do this, we took advantage of an antibody against SSTY1 that has been previously described, and also generated a new antibody recognizing both proteins (Fig. S1); we also made use of the *Sly*-deficient mouse model that shows an ~ 2.5-fold over-expression of SSTY proteins in spermatids [25].

First, we performed immunohistochemistry on wild-type (WT) testicular sections against SSTY1 and SSTY1/2. (Fig. 1 and Figs S2 and S3). Fluorescent immunodetection confirmed that SSTY proteins are expressed in post-meiotic cells. Specifically, SSTY proteins start to be visible in spermatids at step 2 or 3, with the signal increasing in subsequent stages of the round-spermatid phase. SSTY proteins are still visible during spermatid elongation (spermatids at steps 8–11), but the specific signal is lost in condensing spermatids (spermatids at steps 12–16). The specificity of the signal was controlled by performing similar analyses on sections from mutant testes (*MSYq*[−]) that do not express SSTY proteins (Fig. 1 and Fig. S2). A similar pattern of expression was observed on *Sly*-deficient testicular sections (Fig. S2). As an additional control of specificity, detection on WT and *Sly*-deficient testic-

ular sections using SSTY1/2 pre-immune serum was performed in parallel (Fig. S2). We also used antibody against SSTY1 on both WT and *Sly*-deficient testicular sections. Using fluorescent immunodetection, signal against SSTY1 was observed in spermatids of WT and *Sly*-deficient males at steps 6–11 (Fig. S3A,B), while a similar pattern of expression to that seen with antibody against SSTY1/2 was obtained when using a more sensitive assay (colorimetric immunohistochemistry; i.e. presence at most round spermatid stages and in elongating spermatids, but absent in condensing spermatids, see Fig. S3C). Finally, this pattern of expression was confirmed by western blot detection of SSTY proteins in fractions enriched in round spermatids or in elongating/condensing spermatids compared with mature spermatozoa collected from the epididymis (Fig. S1C).

Fig. 1. SSTY proteins are specifically present in round and elongating spermatids. Representative immunodetection images obtained using antibody against SSTY1/2 on testicular sections from WT and *MSYq*[−] mice, at stages II–V, VI–VII and VIII–XI. The black and white images represent DAPI staining of the nuclei. The various cell types present in the testes are indicated: P, spermatocytes at the pachytene stage; RS, round spermatids; ES, elongating spermatids; CS, condensing spermatids. SSTY proteins were detected in green. Lectin (red) was used to stain acrosomes for staging purposes. The specificity of the SSTY1/2 signal was controlled using testicular sections from mutant mice (*MSYq*[−]) that do not express SSTY and are thus considered as a negative control (ctl[−]). SSTY proteins are observed in the round spermatids and elongating spermatids, from stages II–XI. Scale bar = 20 μ m. Figure S2 shows additional negative control panels and a comparison of the pattern of expression of SSTY in WT and *Sly*-deficient (*shSLY*) mice.



SSTY proteins are enriched in sub-nuclear regions and co-localize with the post-meiotic sex chromatin

By immunohistochemistry, SSTY signal was clearly visible in both the spermatid nucleus and cytoplasm (Fig. 2 and Figs S1–S3). This was confirmed by western blot performed on nuclear and cytosolic fractions of WT and *Sly*-deficient round spermatids (Fig. S1D). In the nucleus, the SSTY signal was not homogenous but appeared brighter in discrete sub-nuclear regions (Fig. 2). DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining in the round spermatid nucleus has been well characterized: the most DAPI-dense circular region (usually one or two per spermatid nucleus) is the chromocenter (i.e. the pericentromeric constitutive heterochromatin), while the less DAPI-dense region near the chromocenter is the post-meiotic sex chromatin (i.e. either the X or the Y chromosome) [8]. Interestingly, we observed that some bright foci of SSTY proteins co-localize with the PMSC (white arrowheads in Figs 2 and 3) [5,8]. This signal is stronger in *Sly*-deficient spermatids than in WT spermatids (Fig. 2), probably due to the increase in the level of SSTY proteins in *Sly*-deficient mice as previously reported [25]. In the spermatid nucleus, epigenetic marks known to be associated with transcriptional repression, such as trimethylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9me3), are associated with the chromocenter and the PMSC [13–15]. At a higher magnification (Fig. 3), we observed that SSTY proteins co-localize with the PMSC, as visualized by both the DAPI staining and H3K9me3 signal. Although other bright foci of SSTY proteins are observed elsewhere in the nucleus of WT spermatids, there is a clear enrichment in SSTY proteins in the PMSC of *Sly*-deficient spermatids (Fig. 3).

SSTY proteins interact with SLX/SLY proteins

SLY protein and its X-encoded homologous proteins SLX/SLXL1 have been shown to co-localize with the PMSC and to control its expression [25,32]. SLY represses PMSC gene expression, while SLX/SLXL1 proteins have an effect antagonistic to that of SLY and activate PMSC gene expression [32]. We therefore wished to determine whether SSTY proteins physically interact with SLY and SLX/SLXL1 proteins. The *Sly* gene encodes two isoforms, *Sly1* and *Sly2*, arising from alternative splicing of exons 5 and 6 [25], while the *Slx* gene family comprises two genes: *Slx* and *Slx11* [34,35]. We co-transfected COS-7 cells with MYC-tagged versions of *Ssty1* or *Ssty2* together with FLAG-tagged *Slx*, *Slx11*, *Sly1* or *Sly2* genes, and then performed immunoprecipitation experiments using anti-MYC or

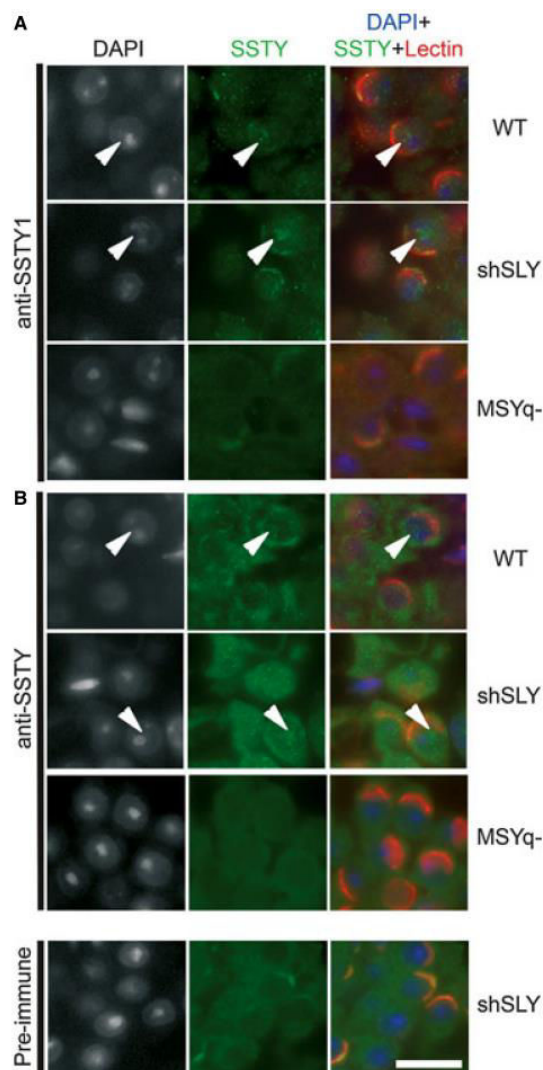


Fig. 2. SSTY proteins are enriched in sub-nuclear regions of the spermatids. Representative immunodetection images obtained for SSTY proteins in the nucleus of WT, shSLY and MSYq⁻ spermatids, taken at a higher magnification than Fig. 1 ($\times 60$), using (A) antibody against SSTY1 or (B) antibody against SSTY1/2. As negative controls, both antibodies were used on MSYq⁻ testicular sections (tissue that does not express SSTY), and SSTY1/2 pre-immune serum was used on shSLY sections. Antibodies and pre-immune serum were detected in green. Lectin (red) was used to stain acrosomes for staging purpose. Black and white images represent DAPI staining of the nuclei. The most DAPI-dense circular structure is the chromocenter; the less DAPI-dense region near the chromocenter is the post-meiotic sex chromatin (indicated by white arrowheads). SSTY protein staining is not diffuse but is enriched in some sub-nuclear regions, including post-meiotic sex chromatin (white arrowheads). Scale bar = 10 μ m.

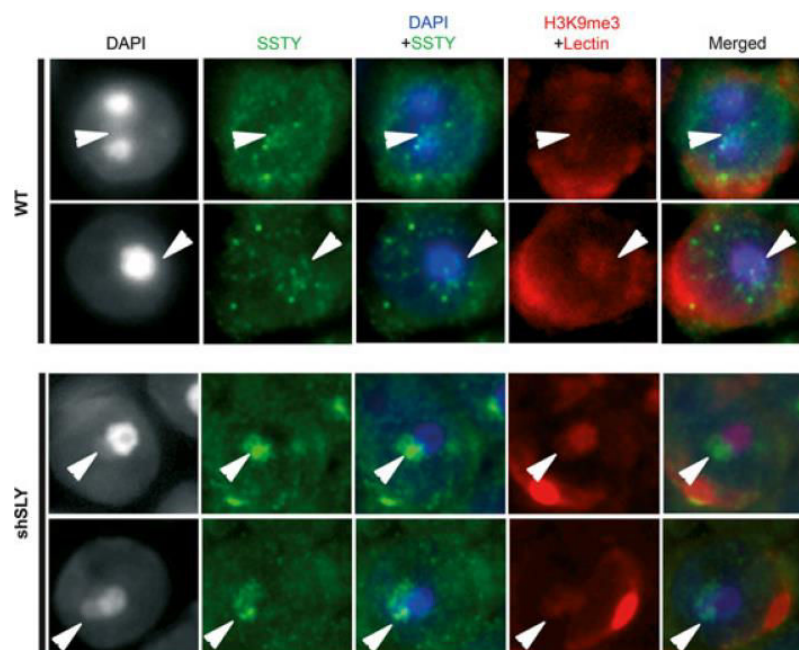


Fig. 3. SSTY proteins co-localize with the PMSC and associated epigenetic marks. Representative immunodetection images obtained for SSTY proteins (green) in the nucleus of WT and shSLY spermatids, taken at a high magnification ($\times 100$). In this immunodetection protocol, a permeabilization step was added prior to blocking and incubation with the primary antibody. DAPI (gray or blue) was used to stain nuclei. Lectin (red) was used to stain acrosomes for staging purposes. The PMSC (indicated by white arrowheads) may be visualized by DAPI staining (gray or blue) and H3K9me3 (red) staining. The most densely stained structure is the chromocenter; the less intensely stained structure near the chromocenter is the PMSC. In WT spermatids, SSTY proteins are visible as bright foci, some of which co-localize with the PMSC. In shSLY spermatids, the SSTY protein signal clearly co-localizes with the PMSC.

anti-FLAG antibodies. In these assays, we observed that SSTY1 and SSTY2 proteins pulled down SLY1, SLY2, SLX and SLXL1 proteins (anti-MYC immunoprecipitation), and conversely that SLX/Y proteins pulled down SSTY proteins (anti-FLAG immunoprecipitation; Fig. 4). No interaction between SLX/SLXL1 and SLY proteins was detected (data not shown).

Apart from their Cor1 domain, a domain that is found in SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) and XLR (X-linked lymphocyte-regulated) proteins and is thought to mediate interaction with the chromatin (National Center for Biotechnology Information Conserved Domain Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=147120> [36]), no functional domain has been identified in SLX/SLXL1/SLY proteins. We therefore tried to identify the 'minimal' region of SLY that mediates interaction with SSTY proteins. In mouse sex chromosome gene evolution, *Slx* appeared as a consequence of a chimerism between the 5' region of *Slx* and the 3' region of *Xlr* [29]; the N-terminal region of SLY and SLX/SLXL1 is therefore

the most conserved between these proteins, although their C-terminal region (which encompasses the Cor1 domain) also shows similarities (Fig. 4E). We produced truncated versions of SLY protein fused to the FLAG tag, and observed that the construct consisting of the first 108 amino acid residues of SLY1 protein (FLAGSLY1Nterm) pulled down SSTY, but a truncated construct termed FLAGSLYCterm consisting of the last 115 amino acid residues of SLY proteins (i.e. its Cor1 domain) did not. We used other truncated constructs, notably FLAGSLY37AA, that allowed us to pinpoint the minimal domain of interaction to the 37 first N-terminal residues of SLY (Fig. 4). This region is in fact the most conserved between SLX, SLXL1, SLY1 and SLY2 (Fig. 4E). Interestingly, the FLAGSLY37AA peptide is detected at a much higher molecular weight than expected (~ 15 kDa instead of 5.7 kDa), which suggests unusual physicochemical properties.

In addition to experiments using the cell model, we investigated SLX/SLY interactions with SSTY in whole testicular extracts by performing immunoprecip-

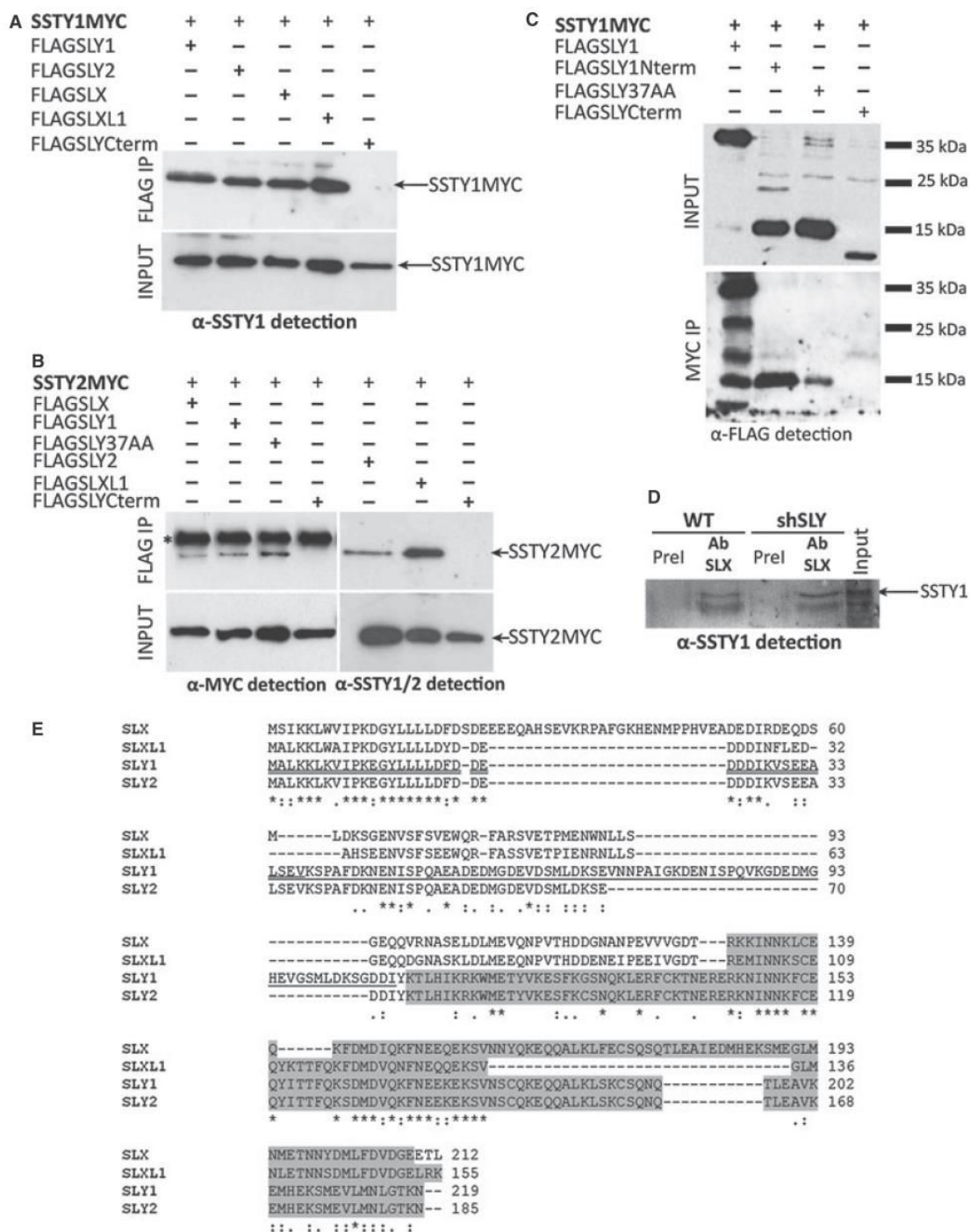


Fig. 4. SSTY proteins interact with SLX/SLY proteins. (A) Anti-SSTY1 antibody detection of protein extracts from COS-7 cells transfected with SSTY1MYC and either FLAGSLY1, FLAGSLY2, FLAGSLX, FLAGSLXL1 or FLAGSLYCTerm, before (INPUT) and after immunoprecipitation (IP) using FLAG antibody. SSTY1MYC (indicated by an arrow) is immunoprecipitated by FLAG antibody when co-expressed with FLAGSLY1, FLAGSLY2, FLAGSLX or FLAGSLXL1, but not with FLAGSLYCTerm. (B) Anti-MYC antibody and anti-SSTY1/2 antibody detection of protein extracts from COS-7 cells transfected with SSTY2MYC and either FLAGSLX, FLAGSLY1, FLAGSLY2, FLAGSLXL1, FLAGSLY37AA or FLAGSLYCTerm, before (INPUT) and after immunoprecipitation (IP) using FLAG antibody. The asterisk indicates the band corresponding to the light chain of the antibody used for immunoprecipitation. SSTY2MYC (indicated by an arrow) is immunoprecipitated by FLAG antibody when co-expressed with FLAGSLY1, FLAGSLY2, FLAGSLX, FLAGSLXL1 or FLAGSLY37AA, but not with FLAGSLYCTerm. (C) Anti-FLAG detection of protein extracts from COS-7 cells transfected with SSTY1MYC and either FLAGSLY1, FLAGSLY1Nterm, FLAGSLY37AA or FLAGSLYCTerm, before (INPUT) and after immunoprecipitation (IP) using MYC antibody. The bands of the protein molecular weight ladder (35, 25 and 15 kDa) are indicated on the right. Anti-FLAG detection shows the presence of FLAGSLY1 protein (~38 kDa), FLAGSLY1Nterm (~15 kDa), FLAGSLY37AA (~15 kDa) and FLAGSLYCTerm (~10 kDa) peptides (from left to right) before immunoprecipitation (INPUT). Anti-FLAG detection of the immunoprecipitated samples (MYC IP) shows that FLAGSLY1, FLAGSLY1Nterm and FLAGSLY37AA were immunoprecipitated by MYC antibody but FLAGSLYCTerm was not. In the lane corresponding to FLAGSLY1 immunoprecipitated by MYC antibody, four bands were detected using anti-FLAG antibody. The band of ~38 kDa corresponds to the intact version of FLAGSLY1, and the bands of ~28, 18 and 15 kDa probably correspond to shorter versions of the FLAGSLY1 protein produced by proteolysis during the immunoprecipitation process. (D) SSTY1 antibody detection of wild-type (WT) and *Sly*-deficient (*shSly*) whole testicular extracts immunoprecipitated using either anti-SLX/SLXL1 antibody or SLX/SLXL1 pre-immune serum (negative control). SLX/SLXL1 interacts *in vivo* with SSTY1. (E) CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) alignment of protein sequences of SLX (GenBank accession number [NP_001129948.1](#)), SLXL1 (GenBank accession number [NP_083457.1](#)), SLY1 (GenBank accession number [NP_963288.2](#)) and SLY2 (GenBank accession number [NP_001032837.2](#)). Asterisks indicate identities and dots indicate similarities (one or two dots indicate strong or weaker conservative changes, respectively). The sequence corresponding to SLY1Nterm is underlined once; the sequence corresponding to the SLY37AA construct (the minimal domain of interaction with SSTY), which overlaps with part of SLY1Nterm, is doubly underlined; the Cor1 domain, (i.e. SLY1CTerm), is highlighted in gray.

itation assays using anti-SLY and anti-SLX/SLXL1 antibodies. These assays allowed us to confirm an *in vivo* interaction between SSTY1 and SLX/SLXL1 proteins in WT and *Sly*-deficient testes (Fig. 4D), but we did not succeed in immunoprecipitating SSTY with SLY antibody in WT or *Sly*-deficient testes (data not shown). Unfortunately, anti-SSTY antibodies did not perform well enough to be used reliably in immunoprecipitation experiments.

SLX/SLXL1 nuclear localization depends on the presence of a Yq gene

Having confirmed the *in vivo* interaction between SSTY and SLX/SLXL1 proteins, we next studied SLX/SLXL1 intracellular localization in more detail. We have previously shown that SLX/SLXL1 proteins are predominantly cytoplasmic in WT spermatids, and are only faintly detected in the nucleus [34,35], while SLX/SLXL1 proteins are abundant in the nucleus of *Sly*-deficient spermatids, where they co-localize with the PMSC [32]. Surprisingly, when we studied in MSYq⁻ males, a model that is deficient for *Sly*, *Ssty* and all other MSYq genes, SLX/SLXL1 staining was not observed in the spermatid nucleus but was restricted to the cytoplasm (Fig. 5A and Fig. S4). We confirmed these observations by immunofluorescence on surface-spread spermatids (Fig. 5B); in these assays, not even a faint SLX/SLXL1 protein signal was

detected in MSYq⁻ spermatid nuclei (0/100), while SLX/SLXL1 were previously detected in the nucleus in ~16% of WT round spermatids and ~76% of *Sly*-deficient spermatids [32]. These results show that SLX/SLXL1 does not locate to the spermatid nucleus and PMSC in the absence of *Ssty* and other MSYq genes.

Discussion

In the present work, we studied the Yq-encoded multi-copy genes *Ssty* at the protein level, and found that SSTY proteins are present specifically in round and elongating spermatids (from steps 2/3 to step 11). In the round spermatid nucleus, SSTY proteins appear as foci, some of which co-localize with the PMSC. This pattern of expression is very similar to that of SLX/SLXL1 and SLY proteins, encoded by multi-copy genes of the X and Yq chromosomes, respectively [28,34], except that SLX/SLXL1 locates to the spermatid nucleus and sex chromatin more abundantly when SLY is reduced/absent [32]. Interestingly, the co-localization of SSTY proteins with the sex chromatin is also more apparent in *Sly*-deficient spermatids; this may be due to the increase in SSTY protein levels in this genotype. Surprisingly, in testes in which *Sly*, *Ssty* and all other MSYq genes are absent (i.e. MSYq⁻ males), SLX/SLXL1 proteins are exclusively cytoplasmic. As SSTY proteins interact with SLX/SLXL1 proteins in a cellular model as well as *in vivo*, it is plausible that

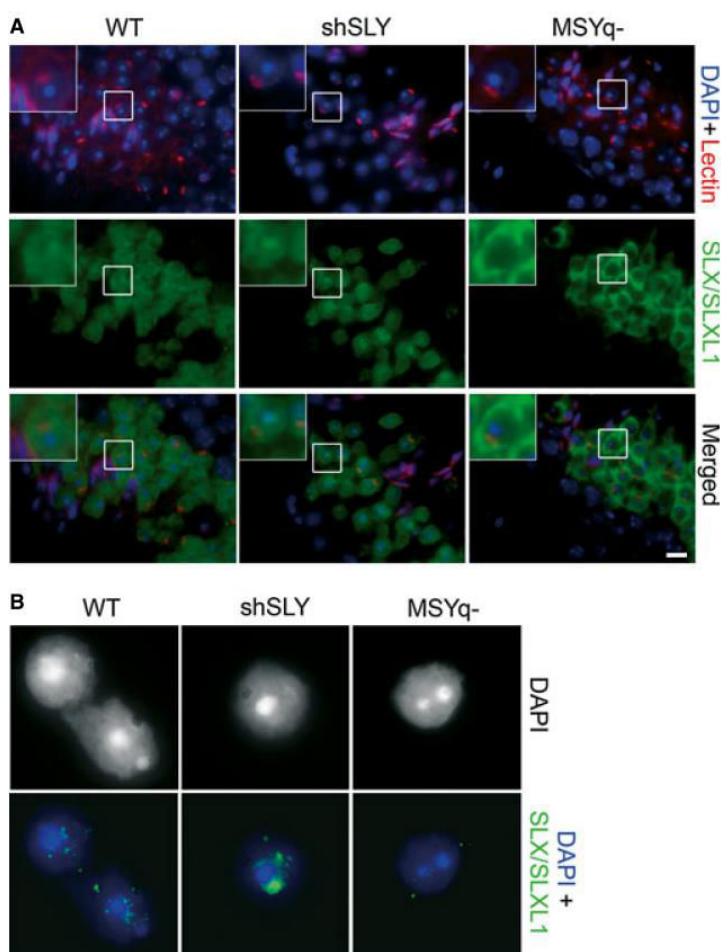


Fig. 5. SLX/SLXL1 proteins are not visible in the nucleus of MSYq⁻ spermatids. (A) Detection of SLX/SLXL1 proteins (green) by immunofluorescence in WT, shSLY and MSYq⁻ testis sections. DAPI (blue) was used to stain nuclei, and lectin (red) was used to stain acrosomes. The inset in the upper left corner represents a 2.5-fold magnification. Scale bar = 10 μm. (B) Representative images of SLX/SLXL1 proteins (green) detected by immunofluorescence in WT, shSLY and MSYq⁻ round spermatid nuclei (surface spread technique). DAPI (gray or blue) was used to stain nuclei. No signal was detected in MSYq⁻ round spermatid nuclei.

SSTY is the MSYq-encoded factor required for localization of SLX/SLXL1 proteins in the spermatid nucleus and PMSC. We also observed that SSTY interacts with SLY proteins in a cellular model but were unable to confirm this interaction in whole testicular extracts, probably due to lack of efficiency of our antibodies. It remains to be determined whether the presence of SLY in the spermatid nucleus and its association with the sex chromatin also depends on SSTY. Production of a mouse model that is solely deficient in SSTY would enable us to address this question.

SLX/SLXL1 have been shown to be positive regulators of sex chromosome-encoded genes during spermiogenesis, while SLY represses partially their expression; in mice, a balanced expression of these two factors is required for normal spermiogenesis to proceed [32]. Although the mechanism by which

members of the SLX/SLY protein family regulate sex chromosome gene expression has not been elucidated, it is known that they affect recruitment of repressive epigenetic marks onto the sex chromatin [25,32]. SLX/SLXL1 and SLY are very acidic proteins with calculated isoelectric points between 4.0 and 4.8 (<http://web.expasy.org/protparam/>). The minimal domain of interaction of SLX/Y proteins with SSTY is the most conserved region between SLX/SLXL1 and SLY (the N-terminal end), which is enriched in acidic amino acids (aspartic acid and glutamic acid). During denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, the peptide corresponding to this domain is detected at a much higher molecular weight than calculated; this is also the case for SLX/Y proteins and has previously been reported for other acidic proteins/peptides [37]. The acidity of SLX/Y proteins may confer

the ability to interact with basic DNA-binding proteins. In this respect, it is worth noting that SSTY1 has a calculated isoelectric point of 9.1 and SSTY2 has a calculated isoelectric point of 7.1, and these proteins are Spin domain proteins. Spindlin1, another member of this protein family, which shows 70% homology with SSTY proteins, has double-stranded DNA binding activity [38], and has been shown to co-localize with the meiotic spindle during female oogenesis [39]. More recent biochemical and structural studies demonstrated that Spindlin1 binds to trimethylated histone H3 lysine 4 (H3K4me3) via an aromatic pocket located in its Tudor-like domain [31,40]; the amino acids that form this structure are conserved in SSTY proteins. All these data strongly suggest a role for SSTY in regulation of expression of PMSC, together with SLX/Y.

At present, it is difficult to predict whether SSTY is an activator or a repressor of XY gene expression in spermatids. As it appears to preferentially interact with SLX/SLXL1, it is tempting to presume that SSTY is also an activator of gene expression. However, males carrying large deletions of the MSYq genomic region (and consequently deficient for all MSYq genes including *Sly* and *Ssty*) have a more dramatic phenotype than males that are deficient in *Sly* only: they show a higher de-repression of X and Y genes and loss of additional epigenetic marks [25,27] associated with more severe spermiogenesis defects, such as an increased incidence of spermhead malformations, sperm DNA damage and poorly condensed sperm [26]. When injected into oocytes, the sperm of MSYq-deficient males leads to impaired oocyte activation and increased oocyte arrest at the pronuclei stage, defects that are not observed using sperm from *Sly*-deficient males [24,26]. These observations suggest that another MSYq gene is required for sperm differentiation, and *Ssty* remains, to date, the best candidate.

Finally, *Slx/Slx1l* and *Sly* have recently been shown to be at the basis of an intra-genomic conflict occurring between the X and Y chromosomes in the mouse lineage [32]. Indeed, *Slx/Slx1l* and *Sly* have antagonistic effects during spermiogenesis, and favor their own transmission to the detriment of the other. A balance exists between *Slx/Slx1l* and *Sly* expression in wild-type mice, and disruption of this balance causes segregation distortion and male infertility. The conflict in which *Slx/Slx1l* and *Sly* are locked is thought to have led to amplification of *Slx/Slx1l* and *Sly* genes. Other X and Y spermiogenic genes would have become amplified in order to compensate for the increasing repressive effect of *Sly* on the PMSC, resulting in the

presence of dozens of ampliconic post-meiotic genes on the mouse sex chromosomes [32,33,41]. The data presented here suggest that *Ssty* may also be a regulator of this intra-genomic conflict. *Ssty* genes are located with *Sly* on the ~ 500 kb repeat unit that has been massively amplified on the Y chromosome long arm [29]; therefore, it seems likely that *Ssty* contributes, together with *Sly*, to maintenance of PMSC gene expression at a low level. In this respect, the fact that SSTY protein interacts *in vivo* with SLX/SLXL1 and appears to favor its nuclear localization is puzzling, and further functional studies are required to better characterize the individual and global effects of SLX/SLXL1, SLY and SSTY in the post-meiotic control of XY gene expression.

Experimental procedures

Mice

The *Sly*-deficient (shSLY), *Slx/Slx1l*-deficient (shSLX) and MSYq[−] mice (X^{Sxr}Y^{*X}) used in this study were produced in a random-bred MF1 albino background (UK National Institute for Medical Research colony), and maintained as described previously [28,32]. Non-transgenic male siblings of shSLY or shSLX animals were used as wild-type animals (WT). Animal procedures were subjected to local ethical review (Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale, Université Paris Descartes; registration number CEEA34.JC.114.12). MSYq[−] males (XY^{*X}Sxr^a) produced in partial C57BL/6 background were also used, and gave similar results to X^{Sxr}Y^{*X}. These mice were maintained as previously described [42] in accordance with the guidelines of the Laboratory Animal Services at the University of Hawaii and the US National Research Council's 'Guide for Care and Use of Laboratory Animals'. The protocol for animal handling and treatment procedures was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee at the University of Hawaii.

Purification and collection of round spermatids, elongating-condensing spermatids, and epididymal spermatozoa

Cells were isolated from 2-month-old mice by fluorescence-activated cell sorting (FACS) as previously described [43] with some modifications. After albuginea dissection, seminiferous tubules were dissociated by enzymatic digestion with collagenase type I at 120 U·mL^{−1} (Gibco, Carlsbad, CA, USA) for 30 min at 36   C in 1x HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented as previously described [43]. After incubation, a filtration step using a 40   m cell strainer was performed to separate interstitial cells from tubules. Tubules were collected

from the surface of the cell strainer, and incubated in cell dissociation buffer (Invitrogen) supplemented with $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 15 min at 36°C . The resulting cell suspension was filtered again using a $40 \mu\text{m}$ cell strainer; the flow-through was centrifuged for 10 min at $230 g$ and subsequently the pellet was resuspended at a concentration of 5×10^6 cells $\cdot\text{mL}^{-1}$ in incubation buffer (HBSS supplemented with 20 mM HEPES pH7.2, 1.2 mM MgSO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 6.6 mM sodium pyruvate, 0.05% lactate, glutamine and 1% fetal bovine serum). Resuspended cells were then stained with Hoechst 33342 (Invitrogen) at a concentration of $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 45 min at 36°C in the dark. Before FACS analysis, $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ propidium iodide (Sigma-Aldrich) was added to eliminate dead cells. Analysis and cell collection were performed at the Cochin Cytometry and Immunobiology Facility using an ARIA III cell sorter (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Hoechst 33342 and propidium iodide were excited using a violet laser at 405 nm, and cells were separated using a combination of 605 and 450 nm emission spectra. Spermatids were further differentiated into round spermatids and elongating/condensing spermatids according to their forward scatter parameters as described previously [43]. A $100 \mu\text{m}$ nozzle was used with a sample threshold rate of ~ 4000 events per second. The cell purity of the two populations collected by FACS was assessed by VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Vectorlab, Burlingame, CA, USA) staining, and was shown to be $\sim 95\%$ for round spermatids in the round spermatid fraction and $\sim 88\%$ for elongating and condensing spermatids in the elongating/condensing spermatid fraction.

Sperm were collected from the cauda epididymides. The cauda epididymides were isolated, several incisions were made in the tissue, and the sperm were allowed to swim out into NaCl/P_i (2.67mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 137.93 mM NaCl, 8.06mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), at 37°C , for several minutes. The sperm were then spun down at $600g$ for 10 min, at 4°C , the supernatant was removed, and the pellet was flash-frozen in liquid nitrogen.

Antibodies

To produce anti-SSTY1/2 antibody, a specific peptide (LVGREVQHKFEGKDGSED) was used to immunize two rabbits, followed by booster injections at 2, 4 and 8 weeks and affinity purification (90-day protocol; Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). For western blot detection, the dilution of primary antibodies used were 1 : 2000, rabbit anti-SLY1 antibody [44]; 1 : 3000, rabbit anti-SLX/SLXL1 antibody [34]; 1 : 1000, rabbit anti-SSTY1 antibody (YMT2B) [30], rabbit anti-SSTY1/2 antibody and mouse anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich); 1 : 500, mouse anti-MYC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). For immunode-

tection on sections and/or on surface-spread testicular cells, all primary antibodies [anti-SLX/SLXL1 [34], anti-SSTY1 [30], anti-SSTY1/2, anti-H3K9me3 (Millipore, Billerica, MA, USA)] and pre-immune serum were diluted at 1 : 50.

Immunofluorescence

For fluorescent or colorimetric immunohistochemistry (using 3,3'-diaminobenzidine), testes from 2-month-old mice were fixed in 4% buffered paraformaldehyde overnight, then washed in 70% ethanol at room temperature for 30 mins, dehydrated, and embedded in paraffin. Paraffin sections ($4 \mu\text{m}$) of testes were mounted on a glass slide and dried overnight at 37°C . Sections were dewaxed in xylene, and hydrated in a graded series of alcohols. After washing in de-ionized water, the sections were incubated for 40 min in 0.01 M sodium citrate solution (pH 6) in a water bath at 96°C to allow antigen retrieval. For immunohistochemistry using 3,3'-diaminobenzidine, slides were washed in de-ionized water and incubated in peroxidase block (Leica, Wetzlar, Germany) for 30 min. The subsequent stages were performed by Novolink polymer detection (Leica, Wetzlar, Germany) according to the manufacturer's instructions. For fluorescent immunodetection, slides were washed and blocked for 1 h at room temperature in NaCl/P_i , 0.1% Tween, 0.15% BSA. A permeabilization step (10 min with 0.05% Triton X-100) was added for immunodetection of H3K9me3. After blocking, slides were incubated overnight at 4°C with primary antibody (or pre-immune serum) diluted at 1/50 in antibody diluent (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Slides were washed in NaCl/P_i , incubated in either Alexa Fluor 488-labeled goat anti-(rabbit IgG), (1 : 500; Molecular Probes) or Alexa Fluor 594-labeled chicken anti-(mouse IgG), (1 : 500; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) diluted in NaCl/P_i for 1 h at room temperature, washed in NaCl/P_i , and mounted in VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vectorlab). Alexa Fluor 594-conjugated peanut agglutinin lectin (Invitrogen) stains the developing acrosome and was used to determine the stage of testis tubules and associated spermatids. Briefly, the 12 stages [45–47] may be differentiated as follows: the pro-acrosomal vesicle appears at stage I and develops into two pro-acrosomal granules at stages II–III. It then increases in size and flattens (stages IV–V), and starts to surround the spermatid nucleus (stages VI–VII). At stage VIII, the spermatids' acrosomes face the basal membrane, their nuclei then elongate and flatten (stages IX–X) and become more and more compact (stages XI–XII). Stage XII can be recognized by the presence of spermatids show typical meiotic division features such as spermatocytes in metaphase.

Immunofluorescence experiments on surface-spread testicular cells were performed using a protocol adapted from Barlow *et al.* [48] and described previously [25].

Transfection

The open reading frames of *Slx*, *Slx11*, *Sly*, *Sly2* and truncated forms of *Sly* [encoding the 37 first amino acids (SLY37AA) or the 111 last amino acids of the SLY protein sequence corresponding to the Cor1 domain (SLYCterm)] were cloned in-frame with an N-terminal FLAG tag under the control of the CMV promoter of the pCDNA3.1 vector (Invitrogen). Similarly, the open reading frames of SSTY1 and SSTY2 were cloned in-frame with a C-terminal MYC tag. COS-7 cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells were collected for protein extraction 24–48 h after transfection.

Protein extracts

Nuclear and cytosolic extracts were obtained from round spermatids following elutriation as described previously [25]. Briefly, a pellet of 1×10^7 round spermatids was homogenized using a glass pestle in 500 μ L lysis buffer [0.6 M sucrose, 10 mM HEPES pH 7.7, 0.2% Igepal CA-630 (Sigma-aldrich), 25 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 $\times$ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride]. After centrifugation for 15 min at 800 *g*, the supernatant was retained as the cytoplasmic fraction, while the pellet was washed twice with 1 mL lysis buffer and resuspended in 50 μ L of nuclear protein extraction buffer [400 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7.7, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 1 $\times$ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride inhibitors]. After 30 min of homogenization at 4 $^{\circ}$ C, the samples were centrifuged for 30 min at 11 000 *g*; the supernatant corresponded to the nuclear protein extract.

Proteins were extracted from transfected cells using ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer [25 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.1% Igepal CA-630 (Sigma-aldrich), 1 $\times$ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride]. Cells were pelleted by centrifugation for 5 min at 100 *g* 24–48 h after transfection, and resuspended in 200 μ L ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer, followed by incubation at 4 $^{\circ}$ C for 30 min on a rotating platform. After centrifugation at 13 000 *g* at 4 $^{\circ}$ C for 30 s, the supernatant was collected and immediately used for the immunoprecipitation assay.

Flash-frozen testes were ground and resuspended in 1 : 9 w/v ice-cold extraction buffer [300 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 $\times$ protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and 0.2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride]. After homogenization and incubation at 4 $^{\circ}$ C for 30 min, cell/tissue lysates were centrifuged at 13 000 *g* at 4 $^{\circ}$ C for 10 min. The supernatant was collected and immediately used for the immunoprecipitation assays.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitation assays of MYC-tagged proteins, 50 μ L Dynabeads Protein G (Invitrogen) were washed according to the manufacturer's instructions, resuspended in 250 μ L binding buffer (1 $\times$ NaCl/P_i with 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-aldrich)) containing anti-MYC antibody (Santa Cruz Biotechnology), and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C. The beads were then washed in 0.2 M sodium borate (pH 9.0), incubated in 30 mM dimethyl pimelimidate for 30 min at room temperature, and washed in 0.2 M ethanolamine (pH 8.0) and then in binding buffer. Antibody-coupled beads were incubated with cell lysates overnight at 4 $^{\circ}$ C, and then washed three times in extraction buffer. Elution was performed using 0.1 M glycine/HCl buffer (pH 3.0), which was then neutralized with 1 M Tris buffer (pH 8.8).

For immunoprecipitation assays of FLAG-tagged proteins, 40 μ L ANTI-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich) were washed twice in 1 $\times$ TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4). The beads were incubated with cell lysates overnight at 4 $^{\circ}$ C, washed three times in 800 μ L of 1 $\times$ TBS and resuspended twice in 100 μ L of 0.1 M glycine/HCl buffer (pH 3.0) for 5 min at room temperature. The pH was neutralized using triethylammonium bicarbonate buffer (pH 8.4). The samples were concentrated using a refrigerated speed vacuum concentrator for 45 min (UNI-VAPO SYSTEM with Rotary Vane Vacuum Pump and UNICRYO SYSTEM, München, Germany).

For *in vivo* immunoprecipitation assays of SLX/SLXL1 proteins, 200 μ L of Dynabeads Protein G (Invitrogen) were washed three times in binding buffer (1 $\times$ NaCl/P_i with 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-aldrich)), resuspended in 800 μ L binding buffer with anti-SLX/SLXL1 antibody, and incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C to allow binding of the antibody. Beads were washed twice in 1 mL of 0.2 M sodium borate (pH 9.0), incubated in 1 mL of 30 mM dimethyl pimelimidate for 30 min at room temperature to covalently couple the antibodies to the beads, washed three times in 1 mL of 0.2 M ethanolamine (pH 8.0), and then washed twice in 1 mL binding buffer. Antibody-coupled beads were incubated with 260 mg protein extract for 2 h, and washed three times in 500 μ L extraction buffer and once in 500 μ L of 1 $\times$ TBS with 0.05% Triton X-100. For non-denaturing elution, beads were resuspended in 60 μ L elution buffer (0.1 M glycine/HCl, pH 3.0), and incubated at room temperature for 5 min. The pH was neutralized using triethylammonium bicarbonate buffer (pH 8.4).

Western blot

One million round spermatids, elongating-condensing spermatids or spermatozoa were denatured in 50 μ L of 1 $\times$ NuPAGE[®] LDS sample buffer (Life Technologies,

Carlsbad, CA, USA) with 5% β -mercaptoethanol, and boiled for 25 min at 95 °C. The other samples were denatured for 10 min at 95 °C in Laemmli denaturing buffer (60 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) and subjected to SDS/PAGE. A protein molecular weight ladder (PageRuler pre-stained protein ladder; Thermo Scientific) was loaded and run in parallel. Following transfer, membranes were blocked in 1 $\times$ NaCl/P_i, 5% milk powder, 0.1% Tween-20. Incubation with primary antibody was performed overnight at 4 °C. Membranes were washed three times in 1 $\times$ NaCl/P_i with 0.1% Tween-20, incubated with the corresponding secondary antibody [anti-mouse antibody, 1 : 3000 (Santa Cruz Biotechnology); anti-rabbit antibody, 1 : 3000 (Santa Cruz Biotechnology)] coupled to peroxidase, and washed three times in 1 $\times$ NaCl/P_i with 0.1% Tween-20. The signal was revealed by chemiluminescence using SuperSignal WestPico chemiluminescent substrate (Pierce, Carlsbad, CA, USA) and Immobilon™ Western chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (Millipore) according to the manufacturers' instructions, and recorded on X-ray films (BioMax® XAR film; Kodak).

Acknowledgements

The authors wish to thank P. Burgoyne, O.A. Ojarikre and A. Rattigan at the UK National Institute for Medical Research, and the staff of the Cochin Mouse House Facility, Histology, Immunostaining and Laser Microdissection Facility, Cellular Imaging Facility and Cytometry and Immunobiology Facility. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Agence Nationale de la Recherche program ANR-12-JSV2-0005-01 (to J.C.), a Marie Curie fellowship to J.C. (FP7-PEOPLE-2010-IEF-273143) and US National Institutes of Health grants HD072380, RR024206 (Project 2) and HCF13ADVC-60314 to M.A.W.

References

- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F & Page DC (2001) An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet* **27**, 422–426.
- Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC & Turner JM (2008) The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet* **40**, 794–799.
- Affara NA & Mitchell MJ (2000) The role of human and mouse Y chromosome genes in male infertility. *J Endocrinol Invest* **23**, 630–645.
- Song R, Ro S, Michaels JD, Park C, McCarrey JR & Yan W (2009) Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* **41**, 488–493.
- Turner JM (2007) Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* **134**, 1823–1831.
- Royo H, Prosser H, Ruzankina Y, Mahadevaiah SK, Cloutier JM, Baumann M, Fukuda T, Hoog C, Toth A, de Rooij DG *et al.* (2013) ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes Dev* **27**, 1484–1494.
- Ichijima Y, Ichijima M, Lou Z, Nussenzweig A, Camerini-Otero RD, Chen J, Andreassen PR & Namekawa SH (2011) MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev* **25**, 959–971.
- Montellier E, Rousseaux S, Zhao Y & Khochbin S (2012) Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: post-meiotic male-specific gene expression. *BioEssays* **34**, 187–193.
- van der Heijden GW, Eijpe M & Baarends WM (2011) The X and Y chromosome in meiosis: how and why they keep silent. *Asian J Androl* **3**, 779–780.
- Ichijima Y, Sin HS & Namekawa SH (2012) Sex chromosome inactivation in germ cells: emerging roles of DNA damage response pathways. *Cell Mol Life Sci* **69**, 2559–2572.
- Wang PJ, Page DC & McCarrey JR (2005) Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet* **14**, 2911–2918.
- Hendriksen PJM, Hoogerbrugge JW, Themmen APN, Koken MHM, Hoeijmakers JHJ, Oostra BA, van der Lende T & Grootegoed JA (1995) Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol* **170**, 730–733.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, Wansink DG, van der Vlag J, Peters AH & de Boer P (2007) Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* **39**, 251–258.
- Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD & Lee JT (2006) Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol* **16**, 660–667.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ, Mitchell MJ & Burgoyne PS (2006) Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell* **10**, 521–529.
- Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen J, Andreassen PR & Namekawa SH (2012) RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive

- sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev* **26**, 2737–2748.
- 17 Baarends WM, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Schoenmakers S, Sun ZW & Grootegeed JA (2007) Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. *J Cell Sci* **120**, 1841–1851.
- 18 Ellis PJ, Clemente EJ, Ball P, Toure A, Ferguson L, Turner JMA, Loveland KL, Affara NA & Burgoyne PS (2005) Deletions on mouse Yq lead to upregulation of multiple X- and Y-linked transcripts in spermatids. *Hum Mol Genet* **14**, 2705–2715.
- 19 Moriwaki K, Suh D-S & Styrna J (1988) Genetic factors affecting sperm morphology in the mouse. *Mouse News Lett* **82**, 138.
- 20 Styrna J, Klag J & Moriwaki K (1991) Influence of partial deletion of the Y chromosome on mouse sperm phenotype. *J Reprod Fertil* **92**, 187–195.
- 21 Styrna J, Imai HT & Moriwaki K (1991) An increased level of sperm abnormalities in mice with a partial deletion of the Y chromosome. *Genet Res* **57**, 195–199.
- 22 Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Sutcliffe MJ & Palmer SJ (1992) Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal 'spermiogenesis' gene mapping to the long arm. *Cell* **71**, 391–398.
- 23 Touré A, Szot M, Mahadevaiah SK, Rattigan A, Ojarikre OA & Burgoyne PS (2004) A new deletion of the mouse Y chromosome long arm associated with loss of *Ssty* expression, abnormal sperm development and sterility. *Genetics* **166**, 901–912.
- 24 Yamauchi Y, Riel JM, Stoytcheva Z, Burgoyne PS & Ward MA (2010) Deficiency in mouse Y chromosome long arm gene complement is associated with sperm DNA damage. *Genome Biol* **11**, R66.
- 25 Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Mahadevaiah SK, Affara NA, Ward MA & Burgoyne PS (2009) The multicopy gene *Sly* represses the sex chromosomes in the male mouse germline after meiosis. *PLoS Biol* **7**, e1000244.
- 26 Riel JM, Yamauchi Y, Sugawara A, Li HY, Ruthig V, Stoytcheva Z, Ellis PJ, Cocquet J & Ward MA (2013) Deficiency of the multi-copy mouse Y gene *Sly* causes sperm DNA damage and abnormal chromatin packaging. *J Cell Sci* **126**, 803–813.
- 27 Reynard LN & Turner JM (2009) Increased sex chromosome expression and epigenetic abnormalities in spermatids from male mice with Y chromosome deletions. *J Cell Sci* **122**, 4239–4248.
- 28 Toure A, Clemente EJ, Ellis P, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Ball PA, Reynard L, Loveland KL, Burgoyne PS & Affara NA (2005) Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm. *Genome Biol* **6**, R102.
- 29 Ellis PJ, Ferguson L, Clemente EJ & Affara NA (2007) Bidirectional transcription of a novel chimeric gene mapping to mouse chromosome Yq. *BMC Evol Biol* **7**, 171.
- 30 Touré A, Grigoriev V, Mahadevaiah SK, Rattigan A, Ojarikre OA & Burgoyne PS (2004) A protein encoded by a member of the multicopy *Ssty* gene family located on the long arm of the mouse Y chromosome is expressed during sperm development. *Genomics* **83**, 140–147.
- 31 Wang W, Chen Z, Mao Z, Zhang H, Ding X, Chen S, Zhang X, Xu R & Zhu B (2011) Nucleolar protein Spindlin1 recognizes H3K4 methylation and stimulates the expression of rRNA genes. *EMBO Rep* **12**, 1160–1166.
- 32 Cocquet J, Ellis PJ, Mahadevaiah SK, Affara NA, Vaiman D & Burgoyne PS (2012) A genetic basis for a postmeiotic X versus Y chromosome intragenomic conflict in the mouse. *PLoS Genet* **8**, e1002900.
- 33 Ellis PJ, Bacon J & Affara NA (2011) Association of Sly with sex-linked gene amplification during mouse evolution: a side effect of genomic conflict in spermatids? *Hum Mol Genet* **20**, 3010–3021.
- 34 Reynard LN, Turner JM, Cocquet J, Mahadevaiah SK, Toure A, Hoog C & Burgoyne PS (2007) Expression analysis of the mouse multi-copy X-linked gene Xlr-related, meiosis-regulated (Xmr), reveals that Xmr encodes a spermatid-expressed cytoplasmic protein, SLX/XMR. *Biol Reprod* **77**, 329–335.
- 35 Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Riel JM, Karacs TP, Rattigan A, Ojarikre OA, Affara NA, Ward MA & Burgoyne PS (2010) Deficiency in the multicopy Sycp3-like X-linked genes *Slx* and *Slxl* causes major defects in spermatid differentiation. *Mol Biol Cell* **21**, 3497–3505.
- 36 Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR *et al.* (2011) CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, D225–D229.
- 37 Tsuchida J, Nishina Y, Wakabayashi N, Nozaki M, Sakai Y & Nishimune Y (1998) Molecular cloning and characterization of meichroacidin (male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein). *Dev Biol* **197**, 67–76.
- 38 Zhao Q, Qin L, Jiang F, Wu B, Yue W, Xu F, Rong Z, Yuan H, Xie X, Gao Y *et al.* (2007) Structure of human spindlin1. Tandem tudor-like domains for cell cycle regulation. *J Biol Chem* **282**, 647–656.
- 39 Oh B, Hwang S-Y, Solter D & Knowles B (1997) Spindlin, a major maternal transcript expressed in the mouse during the transition from oocyte to embryo. *Development* **124**, 493–503.
- 40 Yang N, Wang W, Wang Y, Wang M, Zhao Q, Rao Z, Zhu B & Xu RM (2012) Distinct mode of methylated lysine-4 of histone H3 recognition by tandem tudor-like

- domains of Spindlin1. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 17954–17959.
- 41 Good JM (2012) The conflict within and the escalating war between the sex chromosomes. *PLoS Genet* **8**, e1002955.
 - 42 Yamauchi Y, Riel JM, Wong SJ, Ojarikre OA, Burgoyne PS & Ward MA (2009) Live offspring from mice lacking the Y chromosome long arm gene complement. *Biol Reprod* **81**, 353–361.
 - 43 Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I & Fouchet P (2005) Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A* **65**, 40–49.
 - 44 Reynard LN, Cocquet J & Burgoyne PS (2009) The multi-copy mouse gene Sycp3-like Y-linked (*Sly*) encodes an abundant spermatid protein that interacts with a histone acetyltransferase and an acrosomal protein. *Biol Reprod* **81**, 250–257.
 - 45 Russell LD, Hikim APS, Ettlin RA & Clegg ED (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Cache River Press, Clearwater, FL.
 - 46 Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch JL, Davidson I, Parvinen M & Sassone-Corsi P (2004) Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* **1**, 249–254.
 - 47 Ahmed EA & de Rooij DG (2009) Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol Biol* **558**, 263–277.
 - 48 Barlow AL, Benson FE, West SC & Hultén MA (1997) Distribution of the RAD51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J* **16**, 5207–5215.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Fig. S1. Characterization of SSTY antibodies, and confirmation of the presence of SSTY proteins in round and elongating spermatids, as well as in the nuclear and cytosolic compartments of spermatids.

Fig. S2. SSTY proteins are specifically present in round and elongating spermatids.

Fig. S3. SSTY1 protein is specifically present in round and elongating spermatids.

Fig. S4. Absence of SLX/SLXL1 nuclear signal in MSYq[−] spermatids.

1 **Supporting Figure legend**

2 **Figure S1: Characterization of SSTY antibodies, confirmation of the presence of SSTY**
 3 **proteins in round and elongating spermatids, as well as in the nuclear and cytosolic**
 4 **compartments of spermatids.**

5 **(A)** CLUSTALW alignment of the protein sequences of SSTY1 and SSTY2 (GenBank
 6 Accession numbers: NP_033246.2 and NP_076035.3). The peptide sequence used to produce
 7 anti-SSTY1 antibody is indicated in black; it corresponds to the last 13 AA of the C terminal
 8 region of SSTY1. The peptide sequence used to produce anti-SSTY1/2 antibody is indicated
 9 in grey. Stars indicate identities and dots similarities (one or two dots indicate strong or
 10 weaker conservative changes respectively), a gap indicates no conservation. **(B)** Western Blot
 11 detections of proteins extracted from COS-7 cells transfected either with SSTY1MYC,
 12 SSTY2MYC or SPIN4MYC. Anti-SSTY1, anti-SSTY1/2 and anti-MYC antibodies were used
 13 on the same protein extracts. Anti-SSTY1 antibody specifically detects a ~26kDa band
 14 corresponding to SSTY1MYC fusion protein (as confirmed with anti-MYC antibody) but
 15 does not recognize SSTY2MYC. Anti-SSTY1/2 antibody recognizes both SSTY1MYC (at
 16 ~26kDa) and SSTY2MYC (at ~24kDa); the additional bands may represent truncated forms
 17 of SSTY1MYC and SSTY2MYC proteins without their C-terminal ends since they are not
 18 detected by anti-SSTY1/2 in cells expressing SPIN4MYC, nor with SSTY1 and MYC
 19 antibodies. Neither antibody recognizes SPIN4MYC, a protein related to SSTY1/2,
 20 demonstrating the specificity of the antibodies. Anti-MYC antibody detection was performed
 21 to control the expression and size of the fusion proteins. It detects SSTYMYC at ~26kDa,
 22 SSTY2MYC at ~24kDa, and SPIN4MYC at ~24kDa. **(C)** Western Blot detection of protein
 23 extracts from WT and shSLY round spermatids (RS), elongating-condensing spermatids (ES-
 24 CS) and epididymal spermatozoa (Spz) using anti-SSTY1 or anti-SSTY1/2, anti-SLY1 or
 25 anti-SLX/SLXL1 antibody. SSTY1 is observed predominantly in RS and weaker in ES-CS.

26 SSTY1 protein is not present in Spz. SSTY1 protein detection is more sensitive in ES-CS
 27 from shSLY compared to WT ES-CS; this is probably due to the upregulation of SSTY1
 28 protein in shSLY compared to WT spermatids. Anti-SSTY1 antibody shows a non-specific
 29 band (indicated by a star) above SSTY1 expected size. Detection with anti-SSTY1/2
 30 confirmed that SSTY1 and SSTY2 are expressed in RS. In ES-CS, only SSTY2 protein was
 31 visible; this is probably due to the fact that this antibody is not sensitive enough to detect a
 32 faint quantity of SSTY1. Since it was raised against a peptide which presents 100% similarity
 33 with SSTY2 but only 83% with SSTY1 (see Fig. S1A), anti-SSTY1/2 antibody may be more
 34 sensitive to detect a faint quantity of SSTY2 than of SSTY1. SLY1 protein is predominantly
 35 present in RS, faintly detected in ES-CS and absent in Spz. Anti-SLY1 antibody shows a non-
 36 specific band (indicated by a star) below SLY1 expected size. As expected SLY1 protein is not
 37 present in shSLY spermatids. SLX/SLXL1 proteins are only present in RS. No SLX/SLXL1
 38 signal could be observed in ES-CS. Lamin B1 was used as a loading control. **(D)** Western
 39 blot detection of SSTY1 in nuclear and cytosolic extracts from two WT and two independent
 40 *Sly*-deficient (shSLY) round spermatid samples. Lamin B1 and Actin were used as loading
 41 controls for nuclear and cytoplasmic extracts, respectively. SSTY1 protein level has been
 42 shown to be increased in shSLY compared to WT in total round spermatid protein extracts
 43 [25]. Here, we can observe this increase in both cytoplasmic and nuclear compartments. **(E-**
 44 **H)** FACS analyses. **(E)** A representative FACS profile from a suspension of adult murine WT
 45 testicular cells according to Hoechst and PI fluorescence is shown. The populations of cells
 46 shown in boxes represent three different meiotic stages as previously indicated in [43]. **(F)**
 47 Representative scatter plot used to differentiate round spermatids (P5, RS) and elongating-
 48 condensing spermatids (P6, ES-CS) according to Forward Scatter Parameters (FSC). **(G and**
 49 **H)** Representative pictures of the RS (G) and CS-ES (H) fractions of germ cells sorted by
 50 FACS. DAPI (in blue) was used to stain the nuclei. Based on the morphology of their nuclei,

the purity of the RS fraction was estimated ~94% of step1-8 spermatids (n=200) and the purity of the CS-ES fraction was estimated ~88% of step 9 to 16 spermatids (n=238). Scale bar indicates 20µm.

Figure S2: SSTY proteins are specifically present in round and elongating spermatids.

Supplemental panel to Figure 1. Immunodetection of SSTY using SSTY1/2 antibody or SSTY1/2 pre-immune serum on testicular sections from WT, shSLY mice and MSYq⁻ mice, at different stages. Black and white pictures represent DAPI staining of the nuclei. The different cell types present in the testes are indicated: spermatocytes at pachytene stage (P), round spermatids (RS), elongating spermatids (ES) and condensing spermatids (CS). Anti-SSTY1/2 was detected in green. Lectin-PNA (red) was used to stain acrosomes for staging purposes. The specificity of SSTY1/2 signal was controlled either on sections from mutant testes (MSYq⁻) which do not express SSTY (thus considered as a negative control, ctl-) or by immunostaining of sections from WT testes with SSTY1/2 pre-immune serum (Prel) (as immunostaining of WT and shSLY testes with SSTY1/2 pre-immune serum were identical, only sections from WT are displayed). The green staining observed in spermatids with SSTY1/2 pre-immune serum corresponds to non-specific recognition of the acrosome. **(A and B)** At stages II-V and VI-VII, SSTY1/2 proteins are observed in round spermatids, in both WT and shSLY testes. **(C)** At stage VIII-XI, SSTY1/2 proteins are observed in elongating spermatids, in both WT and shSLY testes. **(D)** At stage XII, SSTY1/2 proteins are not observed in condensing spermatids. The green staining of the acrosome of condensing spermatids observed on WT and shSLY testicular sections is also visible on MSYq⁻ sections and is therefore non-specific. Scale bar indicates 20µm.

Figure S3: SSTY1 protein is specifically present in round and elongating spermatids.

76 **(A and B)** Immunodetection of SSTY1 using SSTY1 antibody on testicular sections from
 77 WT, shSLY and MSYq⁻ mice, at different stages. Black and white pictures represent DAPI
 78 staining of the nuclei. The different cell types present in the testes are indicated:
 79 spermatocytes at pachytene stage (P), round spermatids (RS), elongating spermatids (ES) and
 80 condensing spermatids (CS). Anti-SSTY1 was detected in green. Lectin-PNA (red) was used
 81 to stain acrosomes for staging purposes. The specificity of SSTY1 signal was controlled on
 82 sections from mutant testes (MSYq⁻) which do not express SSTY1. No non-specific signals
 83 were observed on immunodetection with SSTY1 pre-immune serum (data not shown). No
 84 clear signals were observed at stages II-V, in either WT or shSLY testes. At stage VI-VII and
 85 VIII-XI, SSTY1 protein was observed in round and elongating spermatids, in WT and shSLY
 86 testes. **(C)** Immunohistochemical staining (DAB) of SSTY1 protein using SSTY1 antibody on
 87 testicular sections from WT, shSLY and MSYq⁻ mice, at different stages. Anti-SSTY1 was
 88 detected in brown. No non-specific signals were observed on immunodetection with SSTY1
 89 pre-immune serum (data not shown). Contrary to immunofluorescence staining, SSTY1
 90 expression is observed from the earliest stage (stage II-V) to stage VIII-XI; some staining is
 91 also visible in spermatids of stage XII tubules (only in shSLY testes). This is due to higher
 92 sensitivity of DAB staining. The discrepancy between WT and shSLY staining at stage XII is
 93 likely due to the fact that, in shSLY, there is a spermatid elongation delayed (as well as sperm
 94 shedding delay) (see [25]). Scale bar indicates 20µm.

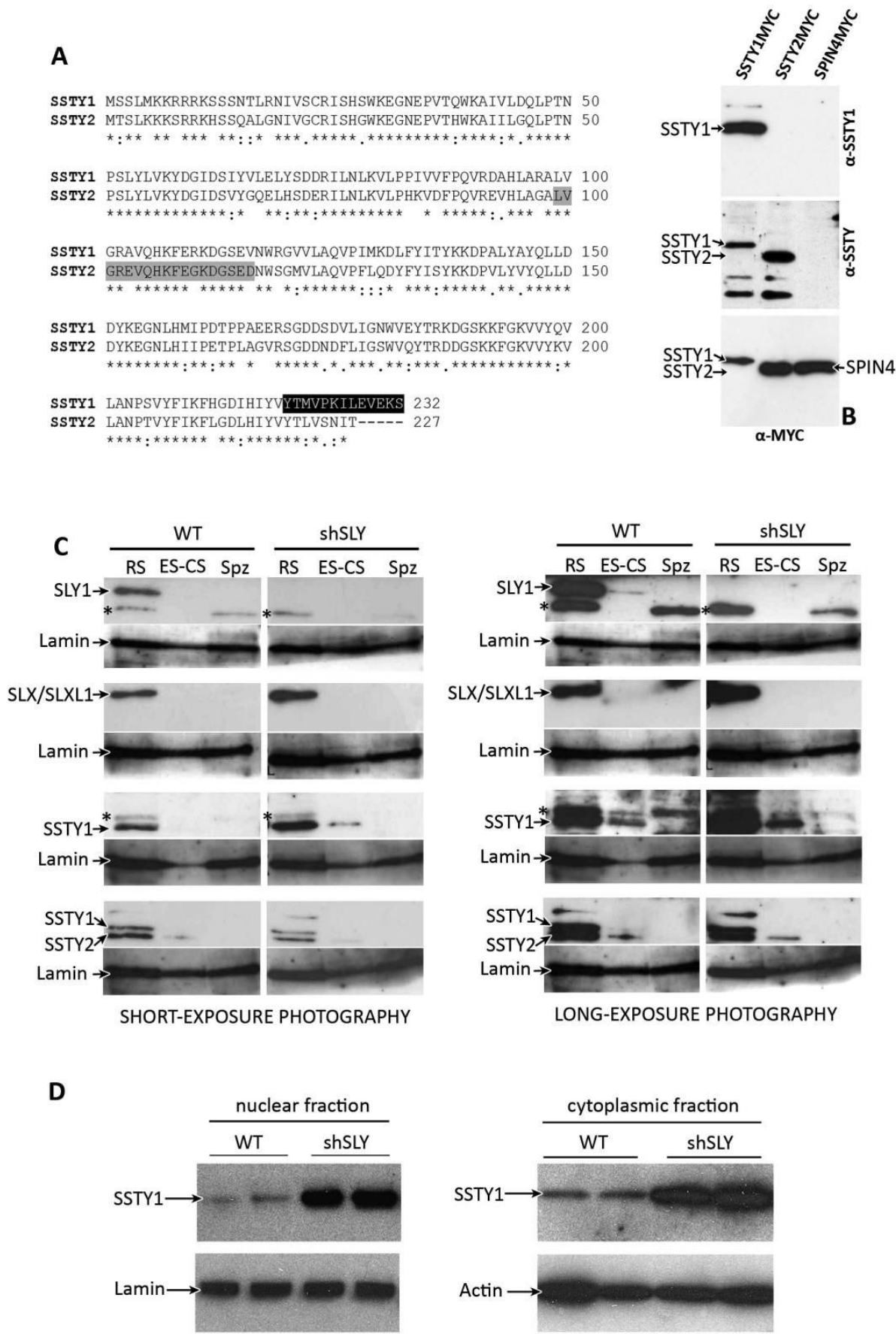
95

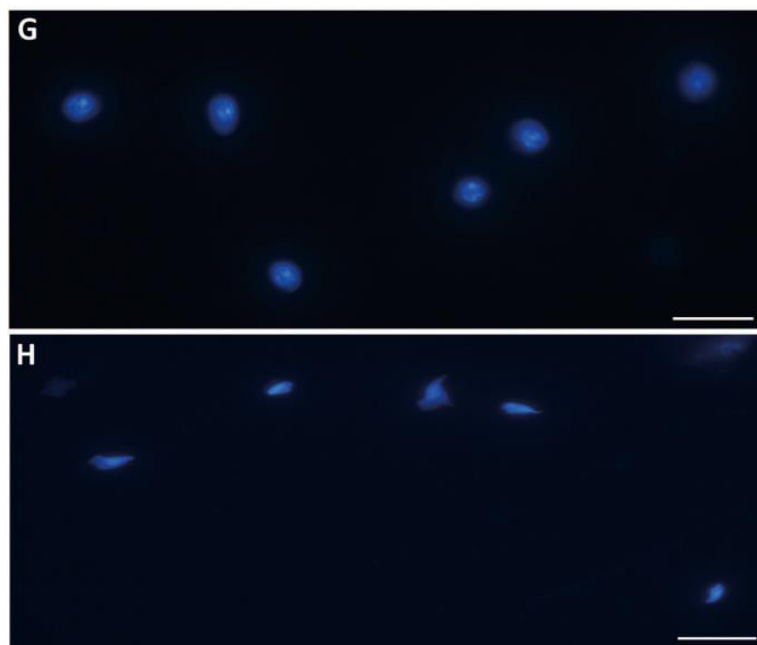
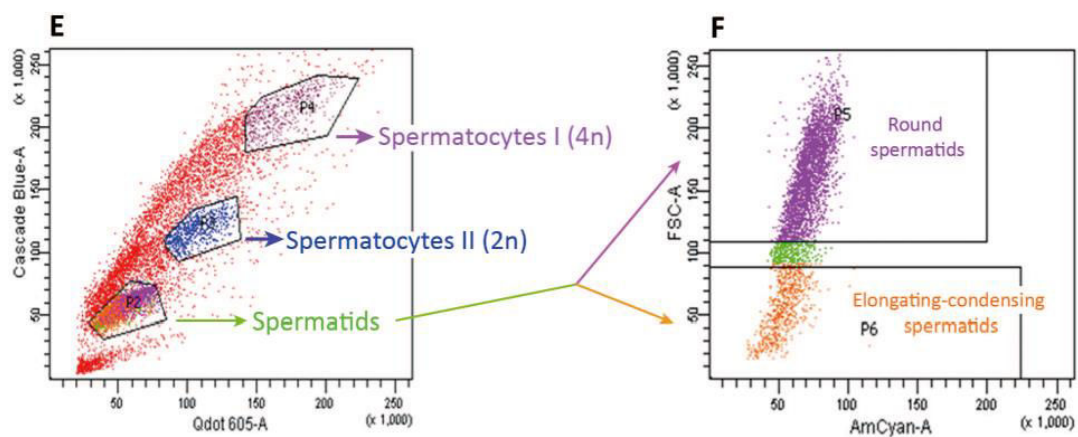
96 **Figure S4. Absence of SLX/SLXL1 nuclear signal in MSYq⁻ spermatids.**

97 Supplementary panel to Figure 5. Immunohistochemical staining (DAB) for SLX/SLXL1
 98 proteins using anti-SLX/SLXL1 antibody on testicular sections from WT, shSLY and MSYq⁻
 99 mice. Anti-SLX/SLXL1 antibody was detected in brown. The nuclei of MSYq⁻ spermatids are
 100 devoid of SLX/SLXL1 proteins. Stronger staining of the cytoplasm in MSYq⁻ is likely due to

101 overexpression of SLX/SLXL1 in this genotype, due to lack of SLY [25]. Scale bar indicates
102 10µm.
103
104
105

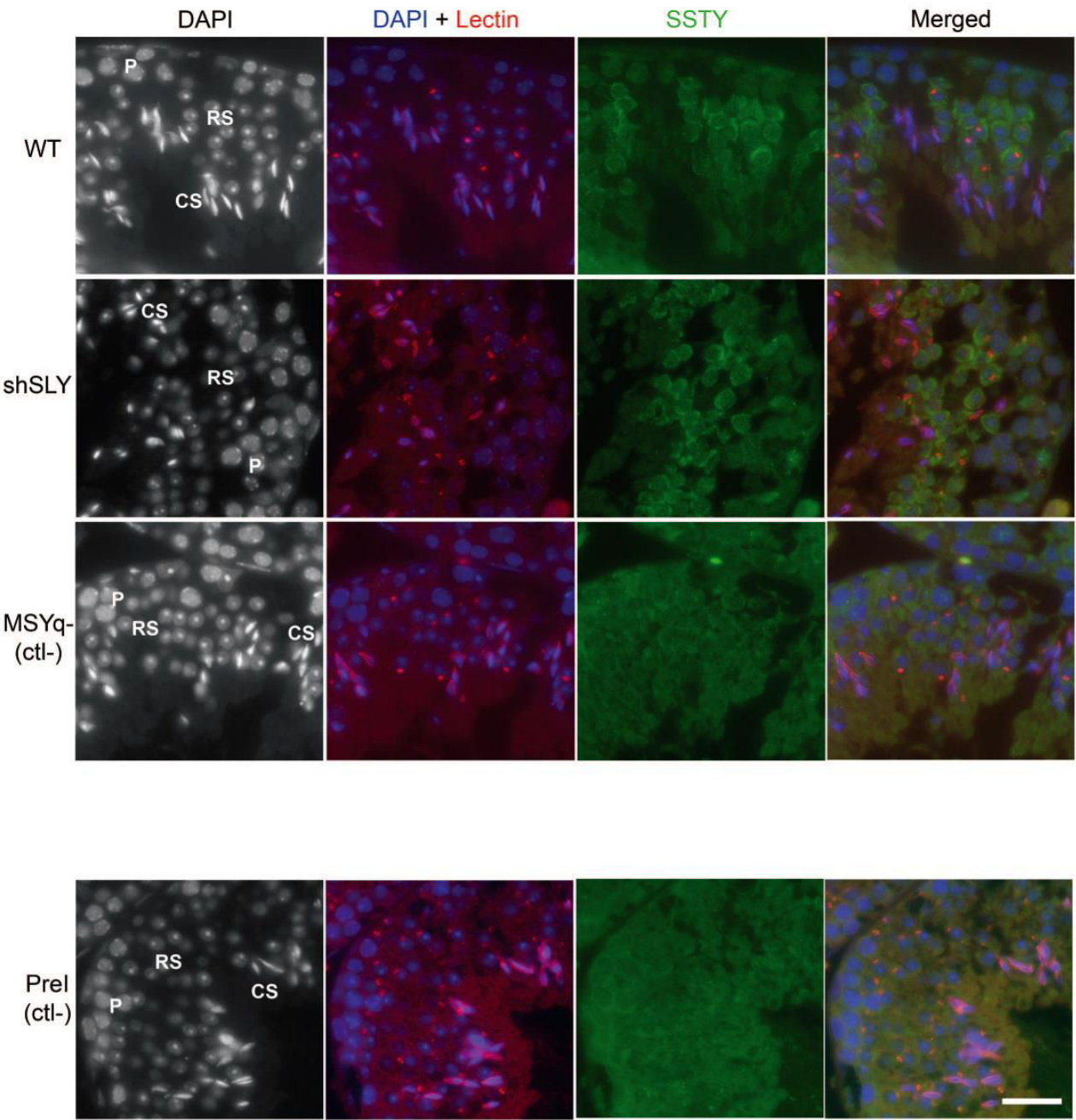
Comptour et al. Fig. S1



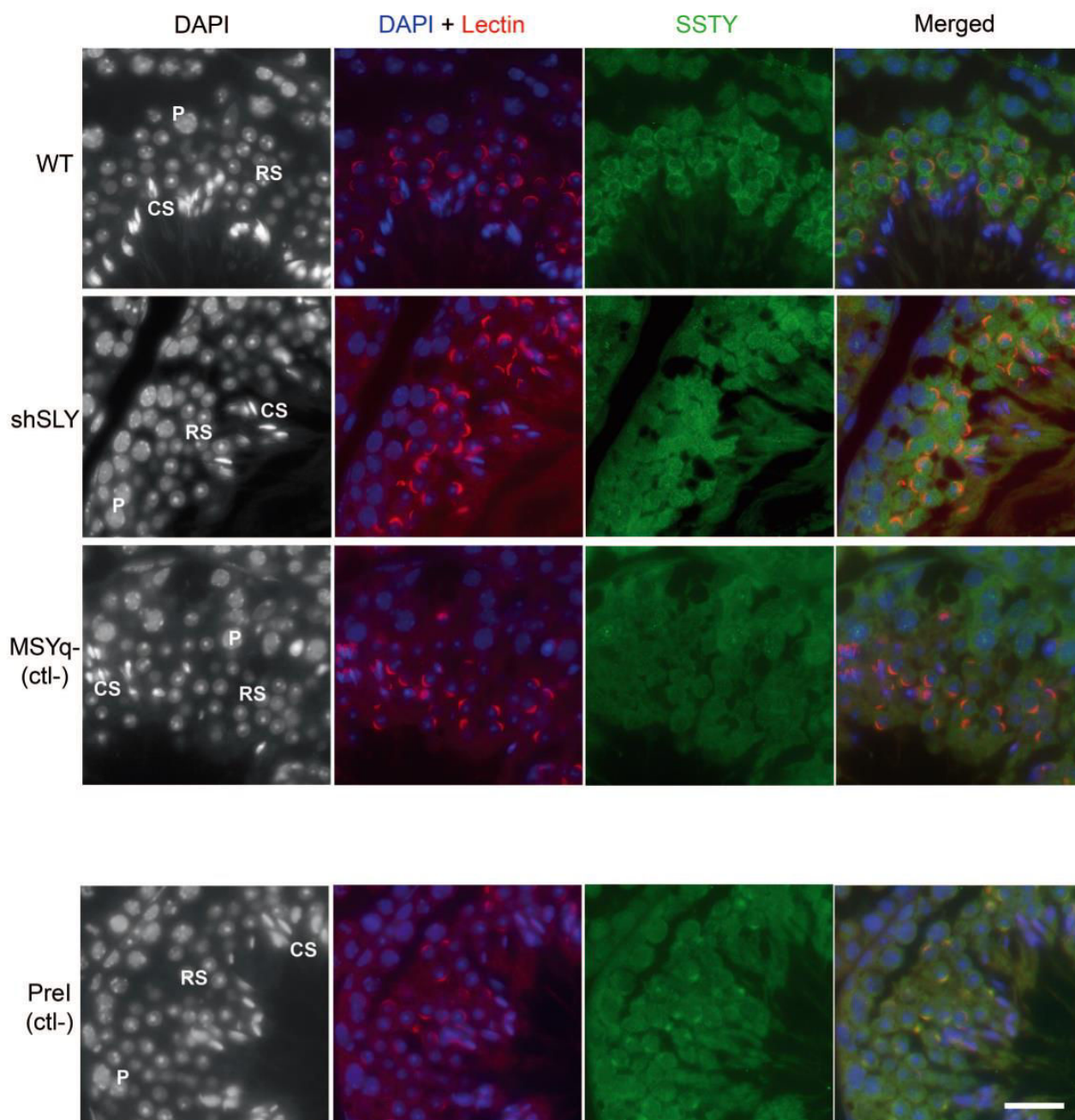


Comptour et al. Fig. S2-A

Anti SSTY1/2 antibody - stage II-V tubules

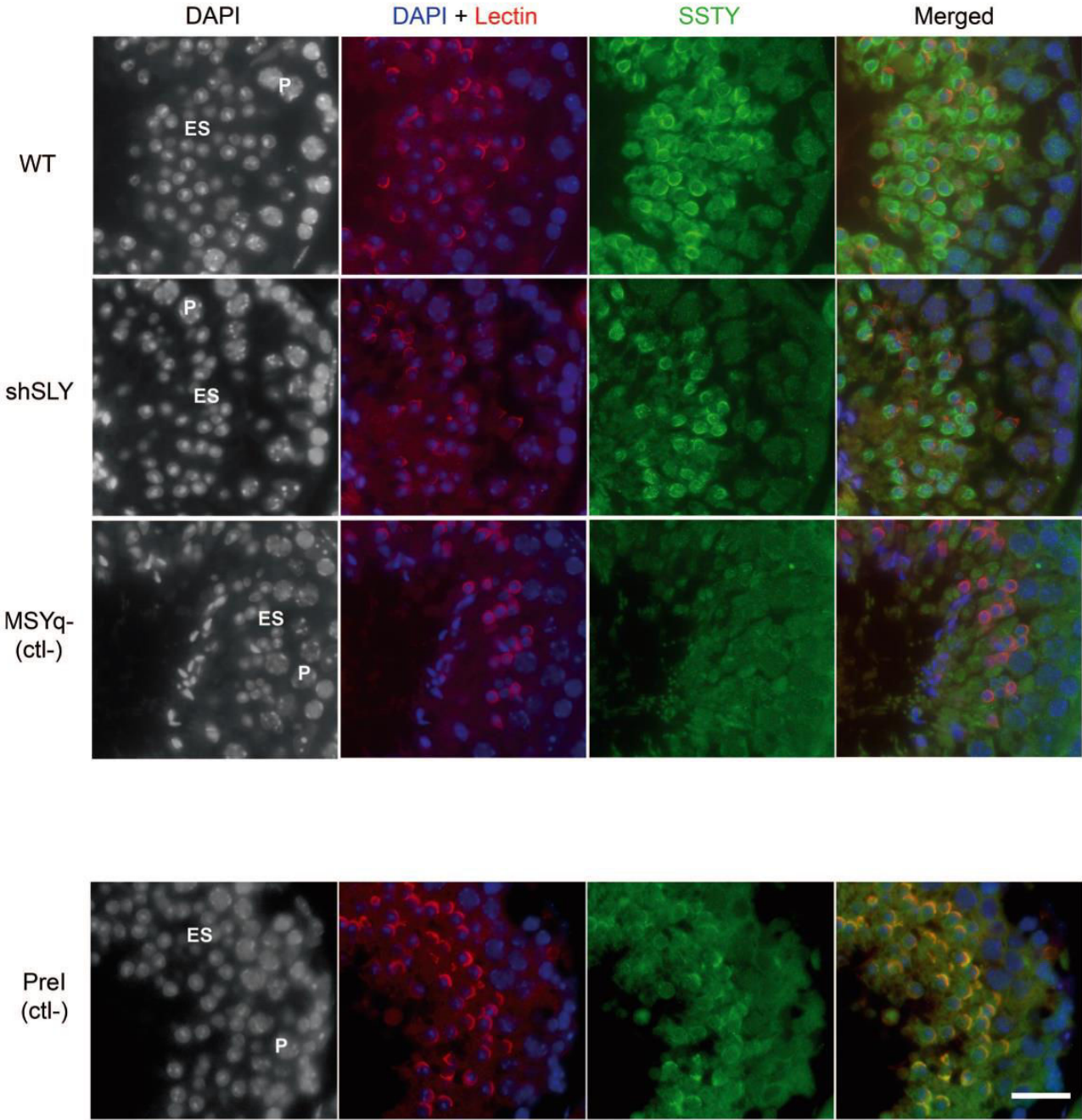


Anti SSTY1/2 antibody - stage VI-VII tubules

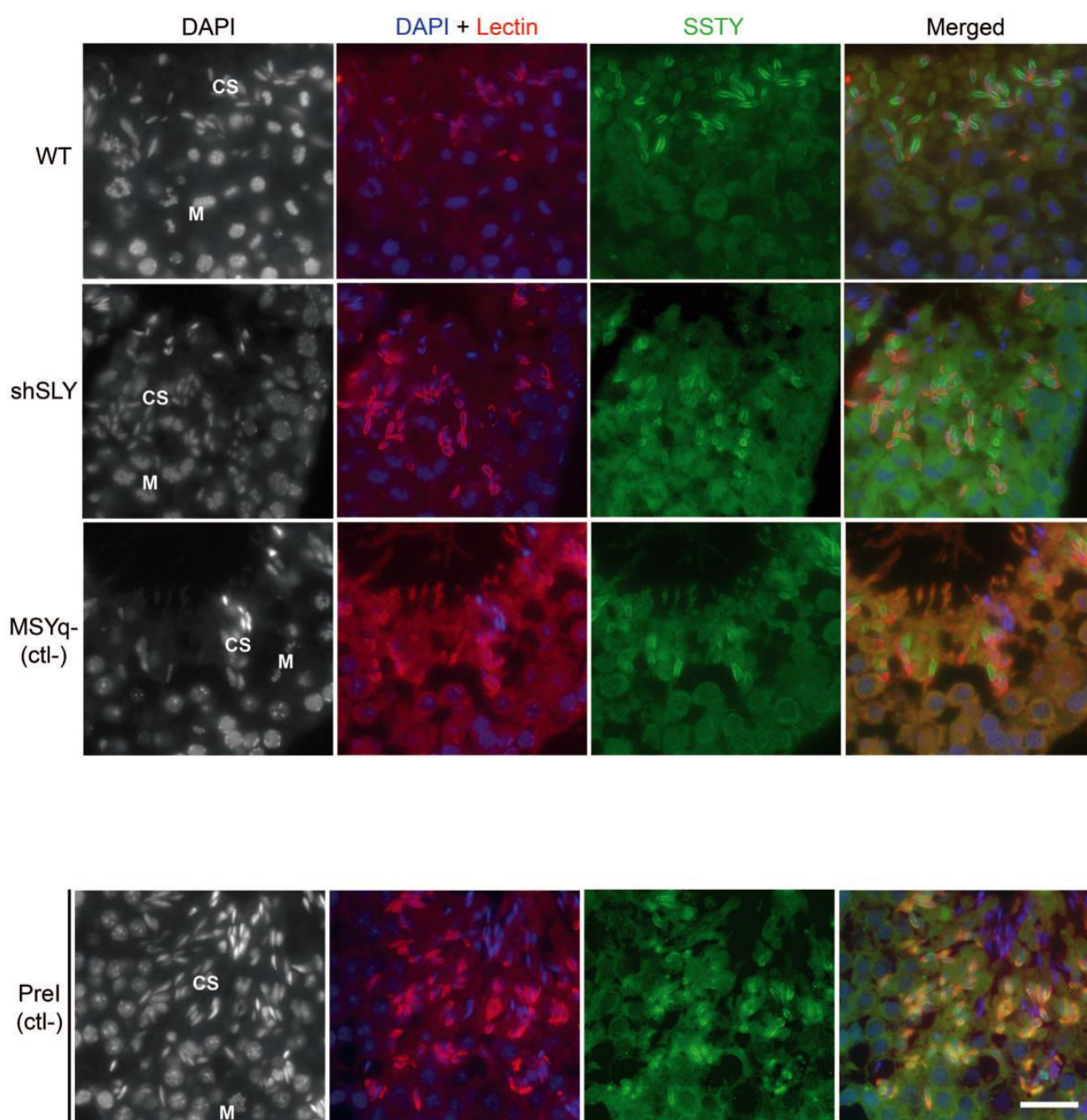


Comptour et al. Fig. S2-C

Anti SSTY1/2 antibody - stage VIII-XI tubules

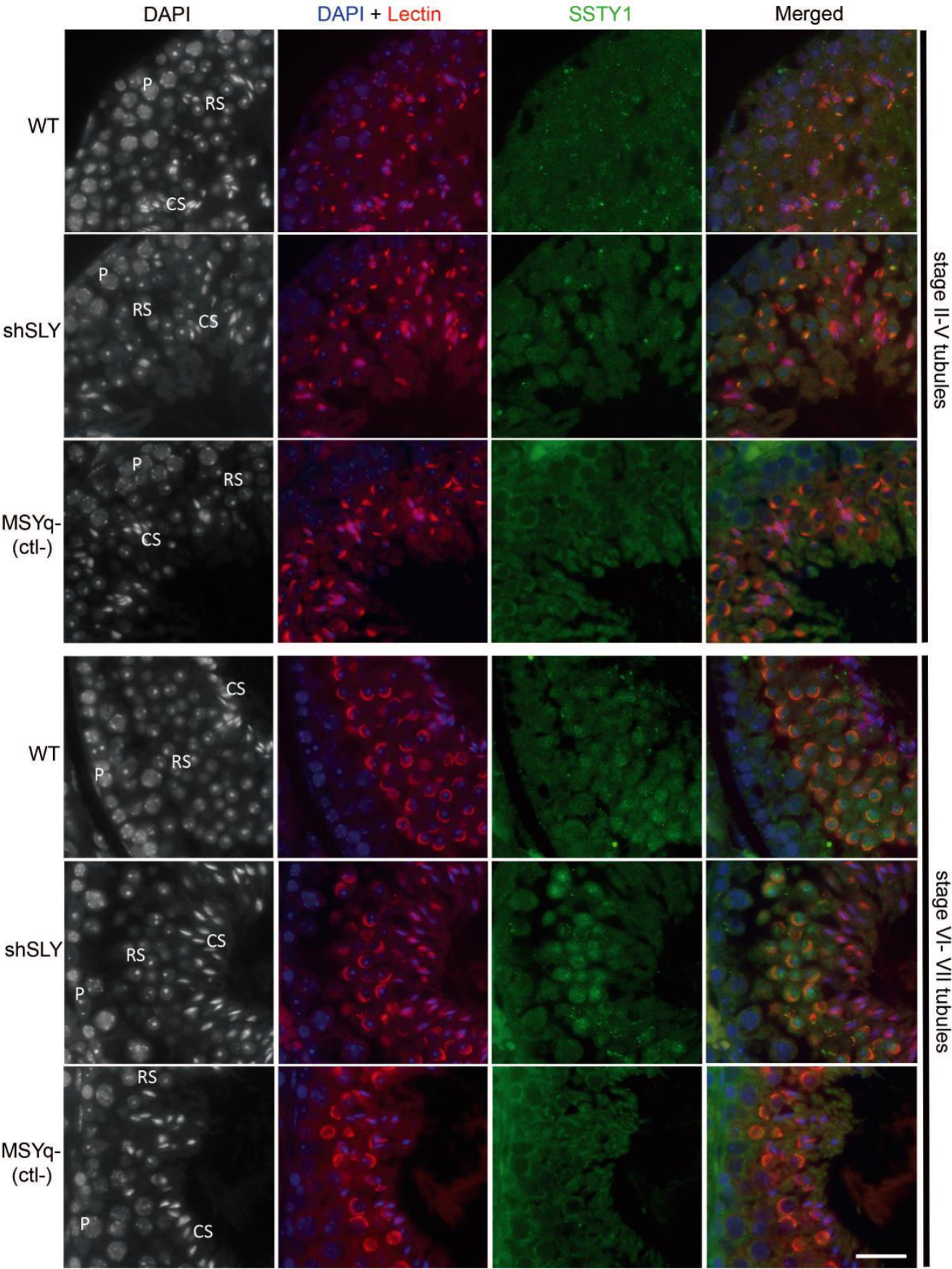


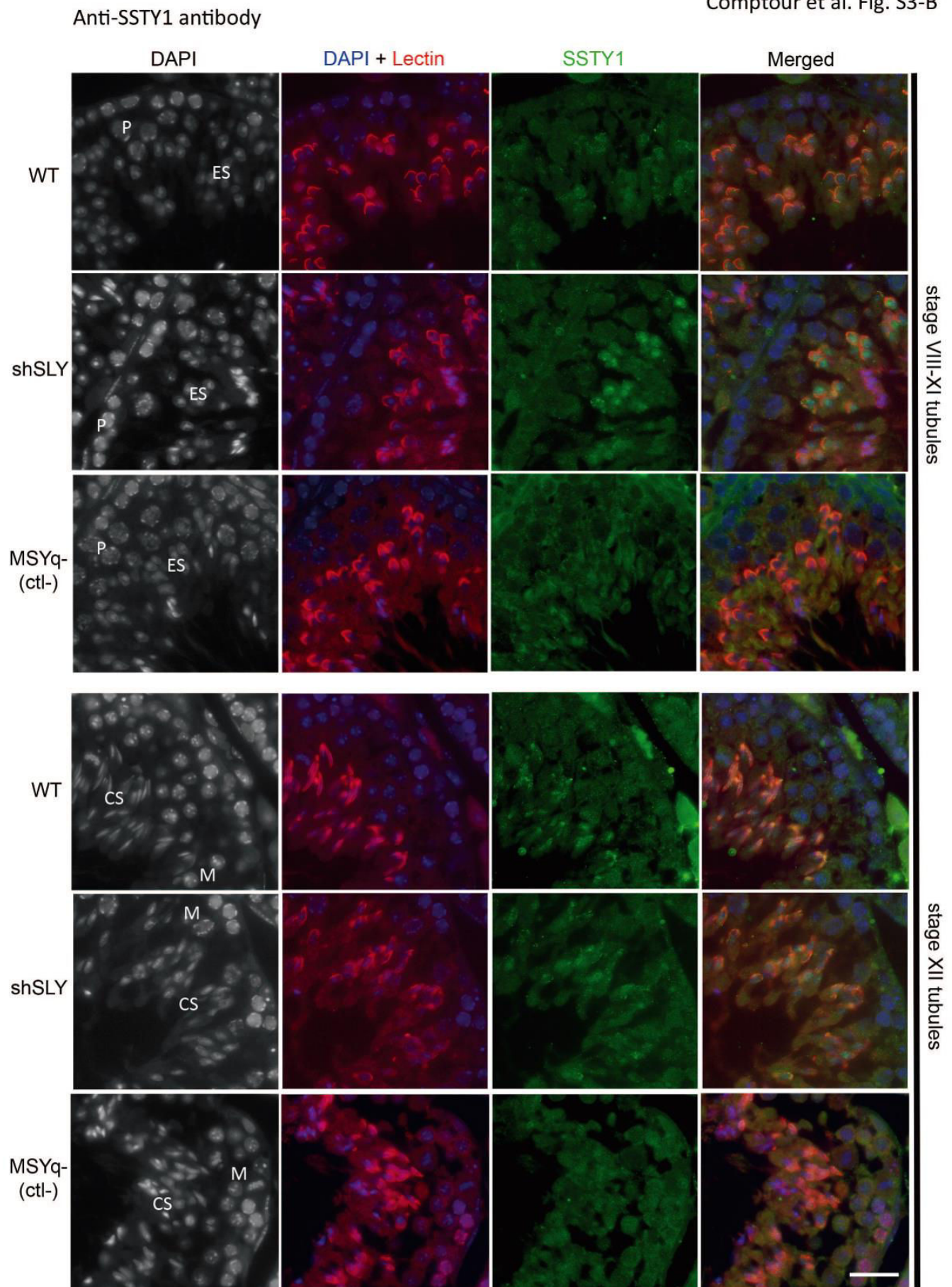
Anti SSTY1/2 antibody - stage XII tubules



Comptour et al. Fig. S3-A

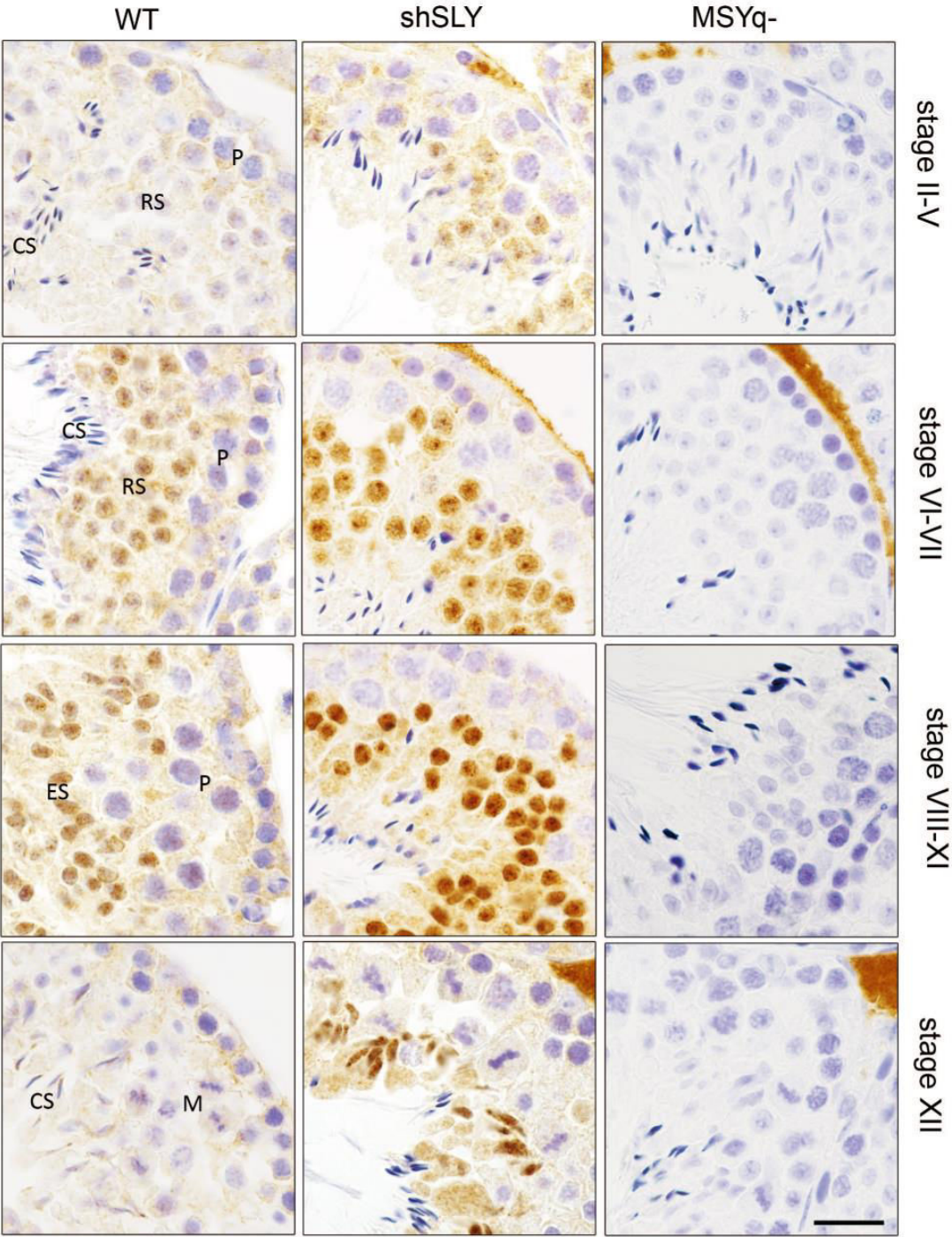
Anti-SSTY1 antibody



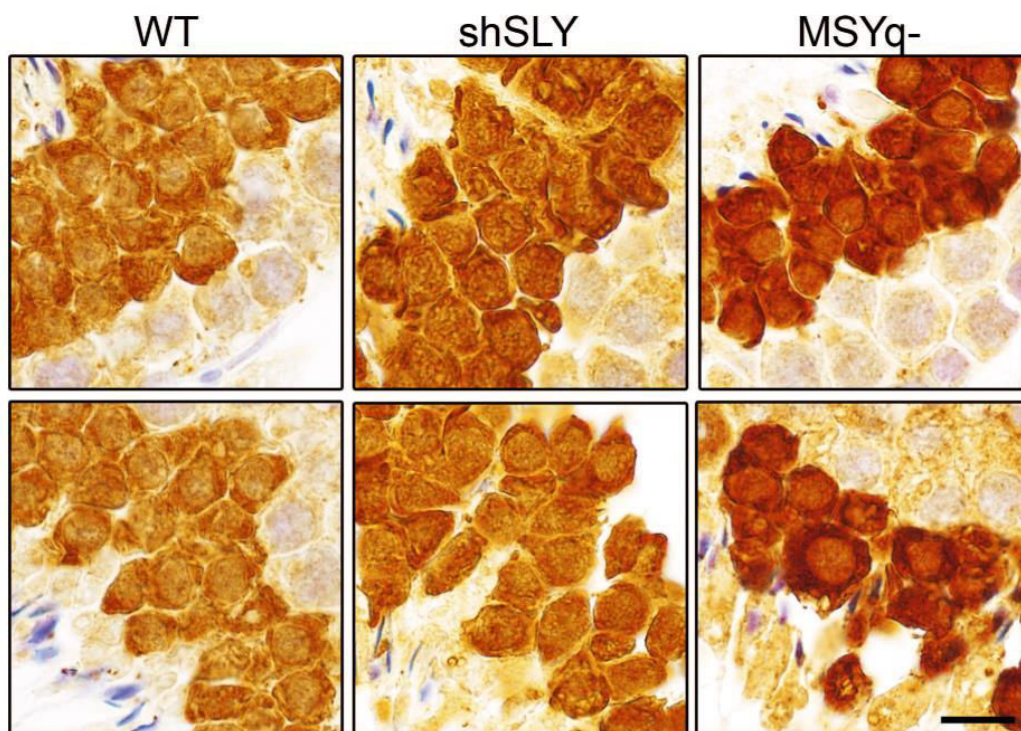


anti-SSTY1 antibody - DAB

Comptour et al. Fig. S3-C



Anti-SLX/SLXL1 with DAB coloration, on round spermatids



Article n°2 : Expression and epigenomic landscape of the sex chromosomes in mouse post meiotic male germ cells

Lors de la méiose, les chromosomes sexuels sont transcriptionnellement inactivés. Cependant, le statut transcriptionnel des chromosomes sexuels après la méiose continue d'être une source de débats et de recherches. Le chromosome X de la souris contient beaucoup de gènes multicopies difficilement analysés lors des études de bio-informatique. De plus, une nouvelle version du génome murin (contenant plus d'annotations pour le chromosome Y) est disponible depuis 2011. Souhaitant reconsidérer le statut transcriptionnel du chromosome X et analyser celui du chromosome Y, nous avons décidé d'évaluer à la fois l'expression des gènes, et également d'analyser la présence ou l'absence de certaines marques épigénétiques sur les chromosomes sexuels après la méiose.

Nos travaux ont confirmé que le paysage épigénétique du chromosome Y est extrêmement différent des autosomes. Certaines marques (*e.g* H3K27Ac) permettent également de discriminer le chromosome Y du chromosome X, suggérant que les chromosomes sexuels ne doivent pas être systématiquement considérés comme une entité homogène, soumise à des voies de régulation identiques.

Finalement, nous proposons que le conflit intragénomique entre les gènes *Slx* et *Slx/Slx1* représente une forte pression de sélection qui pourrait être à l'origine de l'enrichissement des marques épigénétiques répressives des chromosomes sexuels ainsi que l'extrême amplification des gènes portés par ces chromosomes.

N.B. En raison d'une erreur de mise en page lors de la publication de l'article, la moitié du Tableau 1 présenté dans cet article est manquante. Le tableau complet est disponible page 136.

RESEARCH

Open Access



Expression and epigenomic landscape of the sex chromosomes in mouse post-meiotic male germ cells

Charlotte Moretti^{1,2,3}, Daniel Vaiman^{1,2,3}, Frederic Torres⁴ and Julie Cocquet^{1,2,3*} 

Abstract

Background: During meiosis, the X and Y chromosomes are transcriptionally silenced. The persistence of repressive chromatin marks on the sex chromatin after meiosis initially led to the assumption that XY gene silencing persists to some extent in spermatids. Considering the many reports of XY-linked genes expressed and needed in the post-meiotic phase of mouse spermatogenesis, it is still unclear whether or not the mouse sex chromatin is a repressive or permissive environment, after meiosis.

Results: To determine the transcriptional and chromatin state of the sex chromosomes after meiosis, we re-analyzed ten ChIP-Seq datasets performed on mouse round spermatids and four RNA-seq datasets from male germ cells purified at different stages of spermatogenesis. For this, we used the last version of the genome (mm10/GRCm38) and included reads that map to several genomic locations in order to properly interpret the high proportion of sex chromosome-encoded multicopy genes. Our study shows that coverage of active epigenetic marks H3K4me3 and Kcr is similar on the sex chromosomes and on autosomes. The post-meiotic sex chromatin nevertheless differs from autosomal chromatin in its enrichment in H3K9me3 and its depletion in H3K27me3 and H4 acetylation. We also identified a posttranslational modification, H3K27ac, which specifically accumulates on the Y chromosome. In parallel, we found that the X and Y chromosomes are enriched in genes expressed post-meiotically and display a higher proportion of spermatid-specific genes compared to autosomes. Finally, we observed that portions of chromosome 14 and of the sex chromosomes share specific features, such as enrichment in H3K9me3 and the presence of multicopy genes that are specifically expressed in round spermatids, suggesting that parts of chromosome 14 are under the same evolutionary constraints than the sex chromosomes.

Conclusions: Based on our expression and epigenomic studies, we conclude that, after meiosis, the mouse sex chromosomes are no longer silenced but are nevertheless regulated differently than autosomes and accumulate different chromatin marks. We propose that post-meiotic selective constraints are at the basis of the enrichment of spermatid-specific genes and of the peculiar chromatin composition of the sex chromosomes and of parts of chromosome 14.

Keywords: Sex chromosomes, Post-meiotic sex chromatin, MSCI, Spermiogenesis, Mouse, H3K4me3, Crotonylation, H3K9me3, H3K27ac, Chromosome 14

Background

Sex chromosomes differ from autosomes in their genome organization, gene content and gene expression. At the

basis of those differences is the fact that they are under different evolutionary constraints due to loss of recombination and sexual antagonism (i.e., when a gene is beneficial to one sex but detrimental to the other) [1–6]. In mammalian males, sex chromosomes are highly heteromorphic and only recombine via a small region usually located at the tip of the chromosome (the PAR, pseudo-autosomal region), while in females the X chromosome

*Correspondence: julie.cocquet@inserm.fr

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)

U1016, Institut Cochin, Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2016. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

can recombine. Meaning that, compared to a classic pair of autosomes, the X only recombines two-thirds of the time and most of the Y chromosome does not recombine at all, and is hence called MSY for male-specific region on the Y [7, 8].

One particular phenomenon which affects mammalian sex chromosome gene content and expression takes place in male germ cells: During meiosis, the X and Y chromosomes are transcriptionally silenced by a series of chromatin-based events. The precise role of meiotic sex chromosome inactivation (MSCI) is unknown, but it is conserved and essential in all mammals studied so far and in more distant species such as *C. elegans* (see [9–12] for reviews). While XY chromosomes are enriched in genes expressed in spermatogonia, they are devoid of genes expressed during meiosis, as a consequence of MSCI [13, 14]. Whether or not XY chromosomes remain to some extent silent after meiosis is still controversial (see below).

Based on many studies performed using mostly mouse as a model, MSCI is known to start in spermatocytes at the pachytene stage of meiotic prophase I with phosphorylation of histone H2A variant X by ATR- and MDC1-mediated spreading of this signal over the sex chromosomes [15, 16]. This is followed by changes in histone posttranslational modifications, such as di- and trimethylation of the lysine 9 of histone H3 (H3K9me2 and me3) and ubiquitination of histone H2A (uH2A), and recruitment of heterochromatin proteins (CBX1 and CBX3) [17–21]. Some other changes in the sex chromatin appear later, such as deacetylation of histones H3 and H4 [19], replacement of the canonical histones H3 (H3.1 and H3.2) by H3.3 variant and methylation of the lysine 20 of histone H4 (H4K20me) at mid-pachytene [22]. All these changes in the composition of the sex chromatin are accompanied by its compaction and re-localization at the periphery of the spermatocyte nucleus in a structure called the sex body [23].

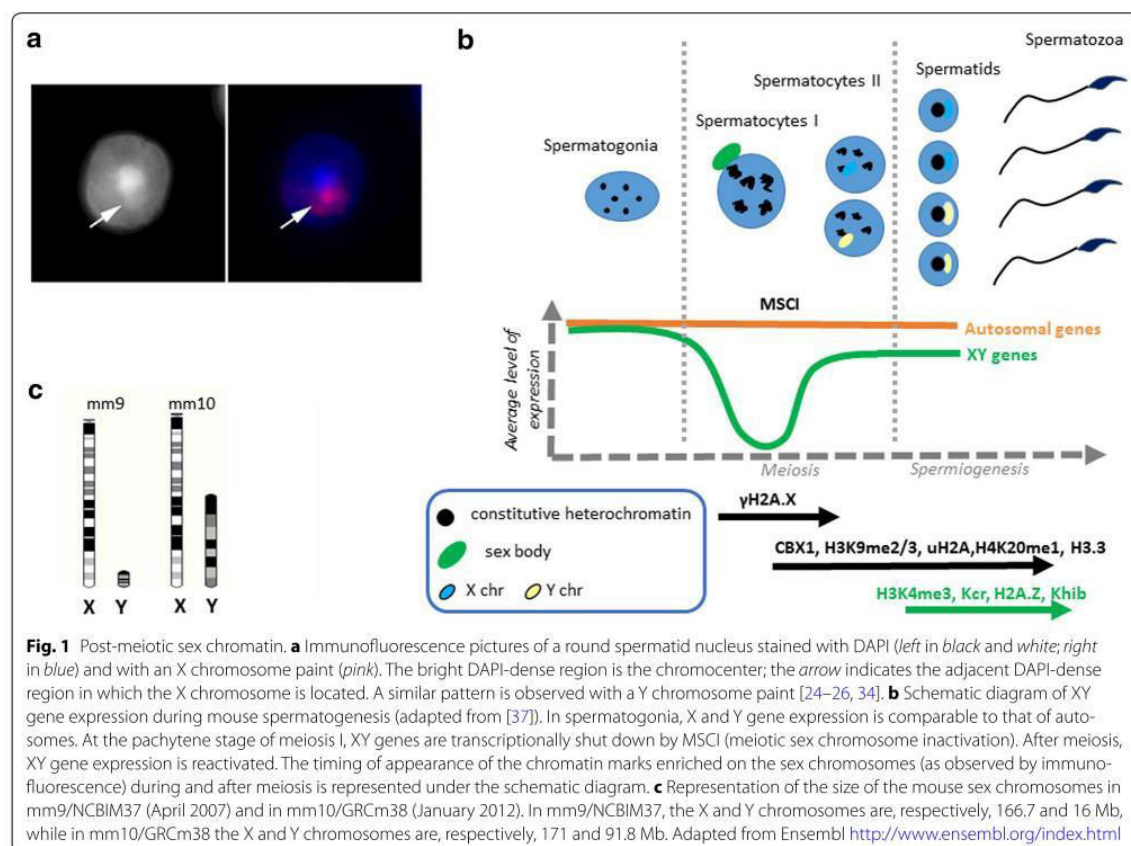
After meiosis, in spermatids, the sex chromatin (either from the X or the Y chromosome since spermatids are haploid) can still be easily distinguished from autosomal chromatin, as a more DAPI-dense structure immediately adjacent to the constitutive heterochromatin regrouped into one or two chromocenters (Fig. 1a) [24–26]. Some of the repressive chromatin marks and chromatin-associated proteins observed on the sex body during meiosis (H3K9me2 and H3K9me3, CBX1 and CBX3) are still visibly enriched on the post-meiotic sex chromatin [24–26]. These heterochromatin-like features suggest that XY gene silencing persists in spermatids, with most genes repressed and only a few “escapees” [24–28]. There are nevertheless many reports of sex chromosome-encoded genes expressed and needed in the post-meiotic phase of

spermatogenesis [29–36] and, in 2008, Mueller et al. have demonstrated that the mouse X chromosome is actually enriched in multicopy genes expressed in spermatids [37].

Interestingly, (re)activation of XY gene expression in spermatids coincides with changes in nucleosomal histones and histone modifications which appear, by immunofluorescence, to coat the post-meiotic sex chromatin, such as H2A.Z [24], H2A.B3 (also known as H2A.Lap1) [38], histone lysine crotonylation Kcr [39, 40], histone 3 lysine 4 di- and trimethylation (H3K4me2 and H3K4me3) [19, 22], and histone 4 lysine 8 2-hydroxybutyrate (H4K8_hib) [41] (see Fig. 1b). Presence/enrichment of histone variants and histone posttranslational modifications (PTM) on the post-meiotic sex chromatin has been shown to correlate with XY gene expression and, when abnormal, to lead to sperm differentiation defects and male infertility [34, 42–44]. Initially, accumulation of histone variants and PTM onto the post-meiotic sex chromatin was deduced from immunofluorescence observations; but when looked at by chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-Seq), discrepancies with immunofluorescence data were observed. Indeed, by ChIP-Seq, Kcr does not appear to cover more the X chromosome than autosomes [39], and H4K8_hib is even less present on the X chromosome than on autosomes [41]; this is despite the fact that both marks are enriched at the transcriptional start site (TSS) of many post-meiotic activated X-encoded genes (i.e., genes which are upregulated in spermatids compared to spermatocytes) [39, 41]. No conclusion could be drawn for the Y chromosome since, in the mm9 version of the mouse genome available at that time (mm9), only 15% of the Y chromosome was assembled (cf. Fig. 1c).

Therefore, in the present study, we sought to compare the composition of the sex chromatin with that of autosomal using ChIP-Seq and the last version of the mouse genome (mm10/GRCm38). We re-analyzed ten ChIP-Seq datasets performed on mouse round spermatids and showed that active epigenetic marks are similarly present on the sex chromosomes and on autosomes, but that the post-meiotic sex chromatin nevertheless differs from autosomal chromatin in its content in repressive chromatin marks and in histone acetylation. We also identify a histone PTM, H3K27ac, which specifically accumulates on the Y chromosome, suggesting that regulation of the X and Y chromosomes may differ during sperm differentiation.

In parallel, we analyzed RNA-Seq datasets from purified male germ cells to investigate the dynamics of XY gene expression during spermatogenesis, and in particular, after meiosis. We found that the X and Y chromosomes are enriched in genes expressed



post-meiotically and display a higher proportion of spermatid-specific genes compared to autosomes though with a range of gene expression values starting lower than autosomal genes. Finally, we found that chromosome 14 and the sex chromosomes share some specific features, such as enrichment in H3K9me3 and the presence of clusters of spermatid-specific genes amplified only in rodents, suggesting that part of chromosome 14 is under the same evolutionary constraints than the sex chromosomes.

Overall, we conclude that, after meiosis, the mouse sex chromosomes are no longer silenced but are nevertheless regulated differently than autosomes and accumulate different chromatin marks. MSCI does not appear to have a strong impact on XY gene expression; we propose that other selective constraints such as the regulatory effect of the X versus Y chromosome intragenomic conflict driven by *Slx/Slx* [45] are at the basis of the significant enrichment of round spermatid-specific genes on the sex chromosomes and on chromosome 14, and of the peculiar features of their chromatin after meiosis.

Results

Conserved and specific features of the post-meiotic sex chromatin

There have been several reports of enrichment of histone variants or histone posttranslational modifications on the PMSC based on immunofluorescence observations. This is the case of H2A variants H2A.Z and H2A.B3 (aka H2A.Lap1) [24, 38], H3.3 variant [22], and of histone PTM H3K4me2 [19], H3K4me3 [22], H3K9me2 [19, 22, 25, 26], H3K9me3 [22], H4K16ac [25], histone lysine crotonylation Kcr [39] and histone 4 lysine 8 2-hydroxybutyrate H4K8_hib [41]. ChIP-Seq analyses also highlighted the specific enrichment of Kcr and H2A.B3 at the TSS of a subset of activated X-linked genes after meiosis, as well as the depletion of H4K8_hib on the X chromosome [38, 39, 41].

We sought to determine to what extent sex chromatin differs from autosomal chromatin by systematically re-analyzing 10 ChIP-Seq datasets of histone PTM performed in mouse purified round spermatids using the last version of the mouse genome (mm10/GRCm38).

This last version (mm10) is more complete than the previous version (mm9, NCBI built 37) especially regarding Y chromosome sequence (see Fig. 1c) but is still scarcely used in the literature. Importantly, to include multicopy genes in our analysis, reads which mapped perfectly to several genomic regions were not ignored and were distributed to one location picked randomly.

For each ChIP-Seq dataset, we compared the coverage, i.e., total number of base pairs covered by the chromatin mark, on the X chromosome, the Y chromosome and all autosomes (Fig. 2; Additional file 1). We particularly compared coverage between the sex chromosomes and autosomes of equivalent length and number of genes (i.e., chromosomes 3 and 6 for the X chromosome, and chromosomes 16 and 18 for the Y chromosome, see Table 1 and Additional file 1). Chromosome per chromosome coverage of ChIP peaks was determined in base pair (Additional file 2) and reported to the total length of each chromosome (Fig. 2; Additional file 1). A snapshot of the obtained ChIP-Seq peaks on portion of relevant chromosomes is shown in Additional file 3.

With this method, H3K4me3 and Kcr, two active chromatin marks which appear enriched on the PMSC based on immunofluorescence observations [22, 39, 41], did not have a higher coverage of the sex chromosomes than of autosomes: H3K4me3 and Kcr coverage of the Y was found within the range of that of autosomes, while X chromosome coverage was in fact slightly lower (Fig. 2; Additional files 1, 2 and 3).

With the same approach, we analyzed the repressive chromatin marks H3K9me3 and H3K27me3. Consistent with immunofluorescence observations, H3K9me3 was found enriched on the PMSC compared to autosomes by ChIP-Seq. This enrichment is particularly striking for the Y chromosome since 1.7% of the Y appears covered by H3K9me3 compared to 0.09 and 0.04% of chromosomes 16 and 18, respectively (Fig. 2; Additional file 1). In total, H3K9me3 coverage of the Y chromosome accounts for 25% of its entire genome coverage (while the Y only represents 3.4% of the genome). In comparison, 0.58% of the X is covered by H3K9me3 (compared to 0.1 and 0.04% of chromosomes 3 and 6, respectively) and the X chromosome accounts for 16% of H3K9me3 entire genome coverage (while the X represents 6.3% of the genome). Surprisingly, we observed that chromosome 14 is the second chromosome most enriched in H3K9me3 (0.78% of its length) with H3K9me3 coverage on chromosome 14 accounting for 16% of its entire genome coverage (while chromosome 14 only represents 4.6% of the genome) (Fig. 2; Additional file 1).

As for H3K27me3, it is particularly depleted on both sex chromosomes after meiosis (Fig. 2; Additional files 1 and 2) with 0.07% of the X and 0.03% of the Y

chromosome covered by this mark compared to 2.8, 2.95, 3 and 3.3% of chromosomes 3, 6, 16 and 18, respectively (genome coverage: 3.2%) (Fig. 2). The difference in H3K27me3 between the sex chromosomes and autosomes is also very striking when comparing any portion of the sex chromosomes with that of autosomes (Additional file 3). These results are in agreement with previous immunofluorescence observations [22, 25].

H3K27me3 and H3K27ac are mutually exclusive; we therefore investigated H3K27ac location in post-meiotic germ cells. Interestingly, we observed an enrichment in H3K27ac on the Y chromosome with 7.9% of the Y covered by this mark compared to 0.3 and 0.2% of chromosomes 16 and 18, respectively (genome coverage: 0.6%). This is not the case of the X chromosome since 0.6% is covered by H3K27ac compared to 0.2 and 0.3% of chromosomes 3 and 6, respectively (Fig. 2; Additional files 1, 2 and 3). To the best of our knowledge, enrichment of H3K27ac on the Y has never been described before; we therefore performed immunofluorescence detection and observed that approximately 50% (28/55) of round spermatids display enrichment of H3K27ac over the PMSC, while the other 50% display a strong diffuse signal not particularly brighter over the PMSC (Fig. 3; Additional file 4). These observations suggested an enrichment of H3K27ac on the Y chromosome (in Y-bearing spermatids which represent ~50% of spermatids) but not on the X (diffuse signal in X-bearing spermatids, which represent ~50% of spermatids). To confirm that, we studied a mouse model with a large deletion (>96%) of its Y chromosome (deletion of the male-specific region of the Y chromosome long arm, MSYq- males) [8, 46]. In this model, the vast majority of round spermatids (59/65) displays a bright diffuse H3K27ac enrichment, without enrichment over the PMSC (Fig. 3; Additional file 4) confirming that H3K27ac enrichment is specific of the Y chromosome.

Looking at other available round spermatid ChIP-Seq datasets for chromatin marks, we found that PMSC is particularly depleted in histone 4 lysine 8 2-hydroxybutyrate (H4K8_hib) in acetylated histone H4 (H4ac) and globally in histone acetylation (K_acetylation) (Fig. 2; Additional files 1, 2 and 3). This confirms previous observations that the X chromosome is depleted in H4K8_hib and H4K8_ac (histone 4 lysine 8 acetylation) in spermatocytes and round spermatids [41]. There is also slightly less H3K9ac on PMSC than on autosomes when normalized to chromosome size (Fig. 2; Additional files 1 and 2).

Finally, we looked at 5-hydroxymethylcytosine (5hMC), a modification at CpG dinucleotides which was previously found less present on the X chromosome in round spermatids [47]; our analyses confirm this observation

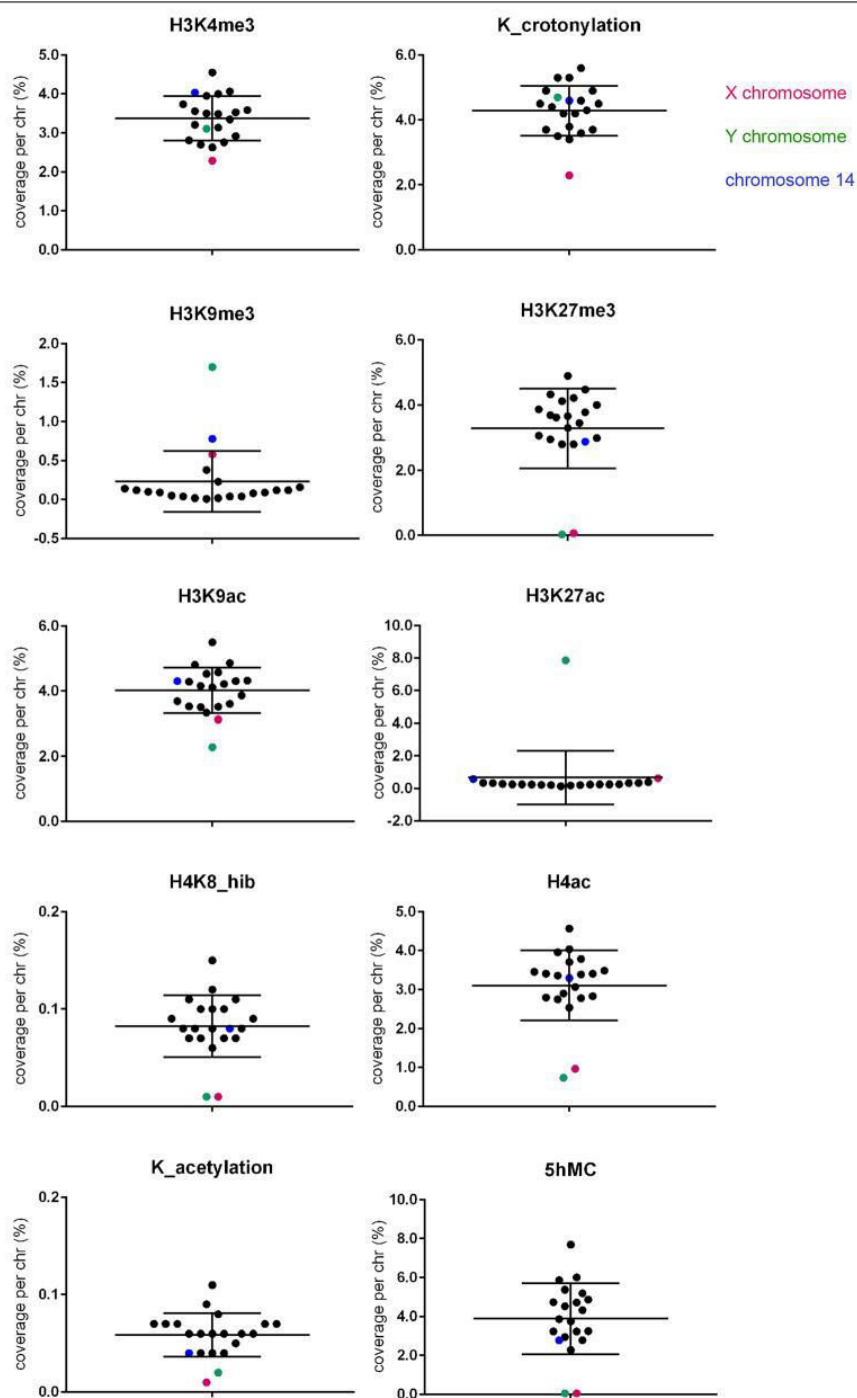


Fig. 2 Comparison of the chromatin composition of sex chromosomes and autosomes in mouse round spermatids. Scatter plot showing the chromosome coverage (% of each chromosome) of 9 histone PTM (i.e., H3K4me3, Kcr, H3K9ac, H4K8_hib, H4ac, K_acetylation, H3K9me3, H3K27ac, H3K27me3) and 5-hydroxymethylcytosine in round spermatids. Mean values for all chromosomes $\pm$ standard deviation are represented. See Additional file 1 for detailed statistical analyses and Additional files 2 and 3 for complementary graphic representations

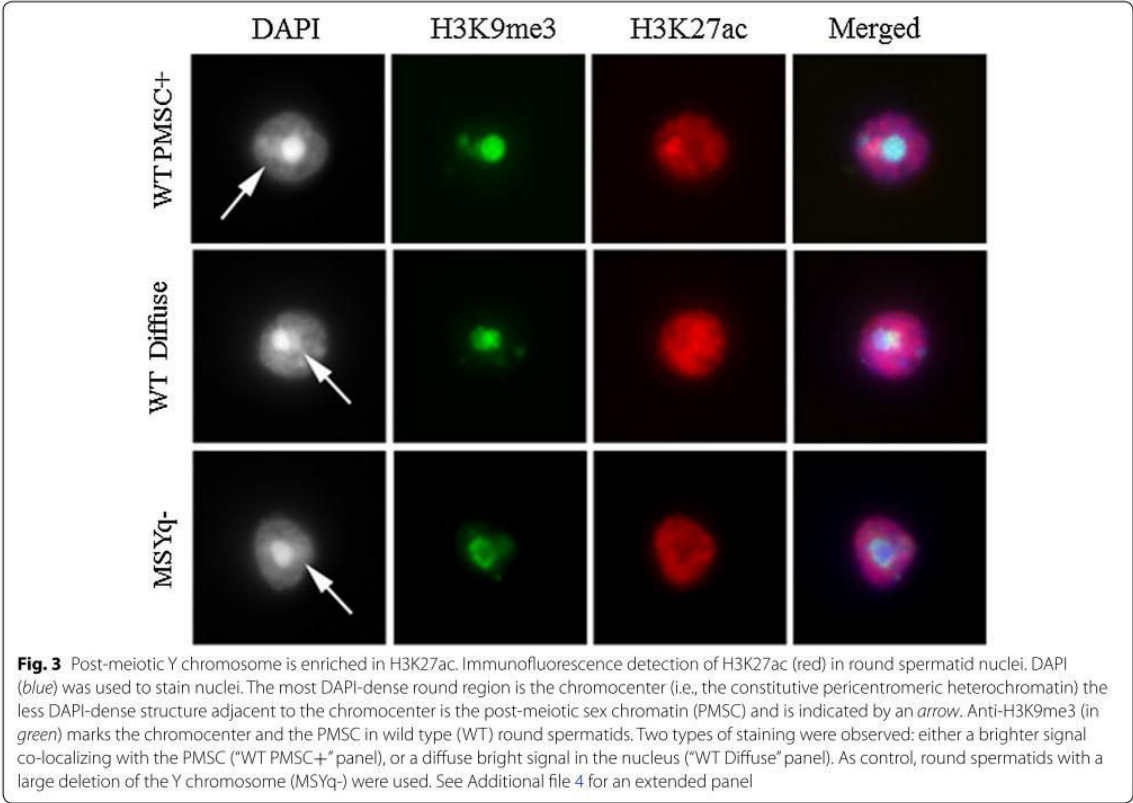
Table 1 Mouse chromosome statistics (from mm10/GRC38 Ensembl gene 81)

Chromosomes	X	Y	1	2	3	4	5	6	7	8
Length (Mb) including gaps	171	92	195	182	160	157	152	150	145	129
Nber of Genes	2607	1570	3431	3751	2891	2863	3250	2348	3472	1786
Nber of Genes expressed at some time during spermatogenesis	1310	358	1723	2119	1451	1763	1932	1207	1799	1239
% of Genes expressed at some point of spermatogenesis	50,25	22,80	50,22	56,49	50,19	61,58	59,45	51,41	51,81	69,37
p value of χ^2 test for X chromosome versus autosomes (% of expressed genes)		6,77E-69	9,81E-01	9,04E-07	9,65E-01	3,32E-17	1,97E-12	4,16E-01	2,27E-01	1,74E-36
p value of χ^2 test for Y chromosome versus autosomes (% of expressed genes)	6,77E-69		1,91E-74	8,37E-112	8,06E-71	6,88E-135	5,63E-126	9,30E-72	7,82E-83	5,10E-160

and show that the Y chromosome is also devoid of 5hMC (Fig. 2; Additional files 1 and 2).

Dynamics of XY gene expression during spermatogenesis
To compare PMSC features with gene expression profiles, we next re-analyzed RNASeq datasets performed on purified mouse germ cells at different stages of spermatogenesis (spermatogonia B, pachytene spermatocytes, round spermatids and elongating spermatids) [47], using the same mapping parameters we used to analyze

ChIP-Seq datasets (i.e., last version of the mouse genome and parameters allowing the mapping of reads from multicopy genes). Using these datasets, we compared the dynamics of expression of sex chromosome-encoded and autosomal genes, according to their RPKM value. The threshold RPKM value (0.22) above which a gene was considered as expressed was calculated by comparing the expression levels of exons and intergenic regions, as previously described in Ramsköld et al. [48]. Importantly, in our analysis we considered one Ensembl gene ID equals



one gene, that is to say related genes (such as genes of the same family or copies of the same gene) were not pooled and treated individually.

The X chromosome

First, we found that, of the 2607 genes present on the X chromosome, 50.25% (1310 genes) are expressed at least during one stage of spermatogenesis; the same value was obtained for genes on chromosome 3 and chromosome 6 which can be used as reliable comparisons for the X chromosome in term of both length and number of genes (Table 1). It is noteworthy to indicate that for subsequent analysis we took into account genes that are at least expressed in one stage and ignored the genes which are completely silenced during spermatogenesis.

Just prior to meiosis, in spermatogonia B cells, the proportion of genes expressed varies from approximately 60–70% depending on the chromosome (Fig. 4a). The proportion of expressed X-linked genes is within the range of autosomes, i.e., similar to chromosome 3 but significantly different from chromosome 6 (Fig. 4a; Additional file 5). Similarly, comparison of RPKM values of all genes showed that expression values of X-linked genes are within the range of that of autosomal genes but still with individual differences: this time, the X chromosome values differ from those obtained for chromosome 3 but are similar to chromosome 6 values (Fig. 4b; Additional file 6). These differences reflect the high heterogeneity between autosomes and should be kept in mind when comparing sex chromosomes to autosomes.

At the pachytene stage of meiosis, not only a lower proportion of X-linked genes is expressed compared to autosomes (Fig. 4a; Additional file 5) but the RPKM mean value of X-linked genes is also decreased (Fig. 4b; Additional file 6). A higher proportion of pachytene-repressed genes (i.e., expressed before meiosis in type B spermatogonia but no more actively transcribed in pachytene) was also observed among X-linked genes compared to autosomal genes (Fig. 5; Additional file 7), as expected as a consequence of MSCI. However, we still observed many X-encoded genes indicated as “expressed” in pachytene spermatocytes. Those are in fact genes which were expressed before pachytene but of which transcription products are still present in pachytene despite transcription shut down.

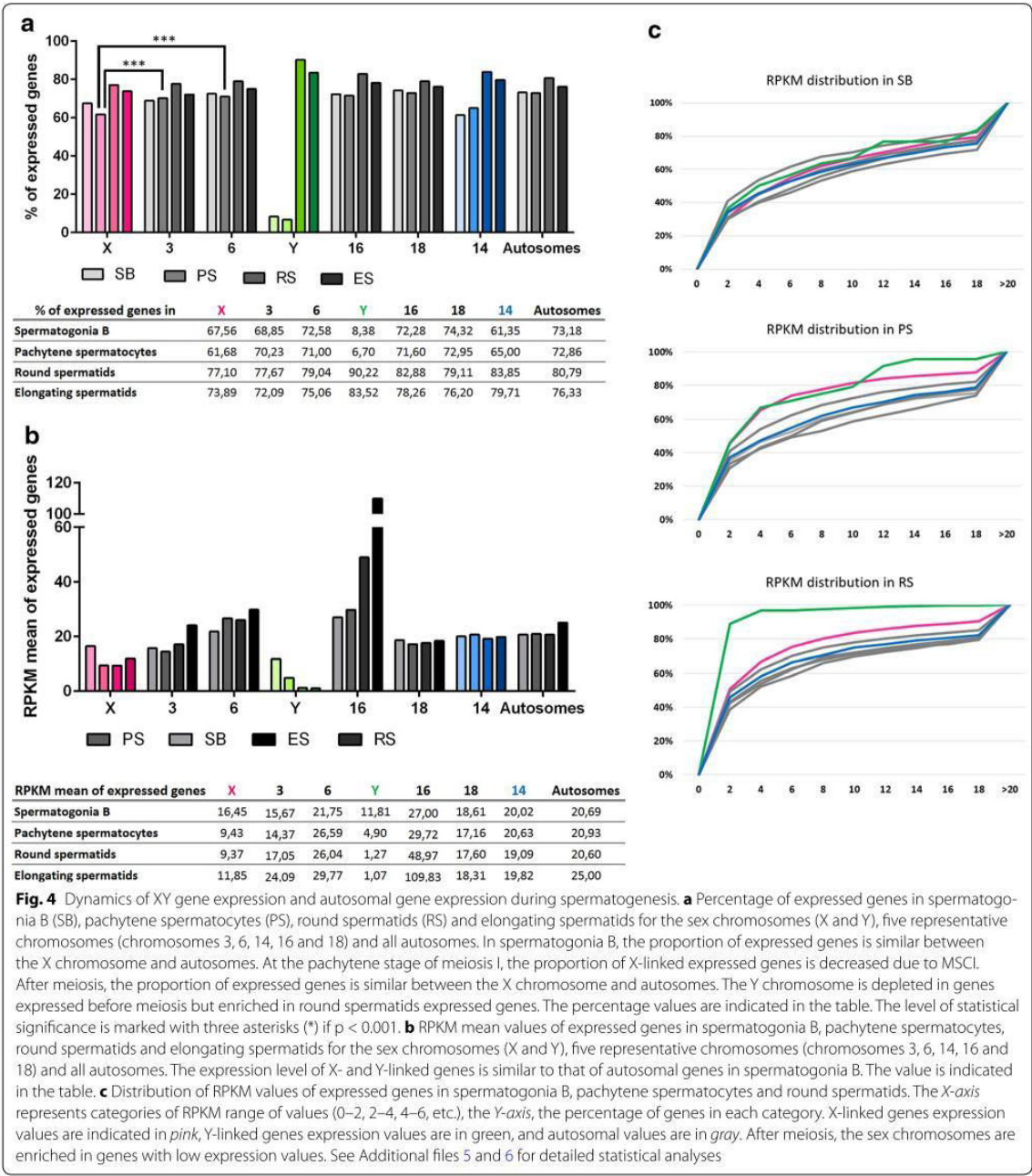
After meiosis, in round spermatids, the majority of pachytene-repressed genes do not recover their prior level of expression and were considered as round spermatids non-reactivated genes (Fig. 5). This is true for autosomal genes and X-encoded genes (Fig. 5; Additional file 7). Of note, an identical proportion of X-linked genes than of autosomal genes are expressed in round spermatids (Fig. 4a; Additional file 5). Surprisingly, 30.46% of

X-encoded expressed genes are enriched in round spermatids (i.e., expressed higher in round spermatids than in pachytene spermatocytes). This is, overall, significantly higher than for autosomal genes (25.22 and 26.35% for chromosomes 3 and 6, respectively) (Fig. 6; Additional file 8). Finally, we found that ~18% of X-encoded expressed genes are specifically expressed post-meiotically. This proportion of genes is also significantly higher for the X chromosome than for autosomes (12.61 and 11.02% for chromosomes 3 and 6, respectively) (Fig. 6; Additional file 8). In order to determine whether the high proportion of X-encoded round spermatid-specific genes is due to the abundance of X-linked multicopy genes and to the fact that, in our analysis, we considered one Ensembl gene ID equals one gene, we undertook an additional analysis in which highly similar genes (i.e., genes of the same “family”) were treated as one gene (Additional file 9). The results obtained did not significantly differ from the initial analysis meaning that the chromosome X is genuinely enriched in single-copy genes and multicopy genes specifically expressed at the round spermatids stage (Additional file 9).

Regarding the expression intensity (RPKM) of the genes enriched in round spermatids, the mean value is lower for X-encoded genes than for autosomal genes (chr 3, $m = 27.58$; chr 6, $m = 33.07$; X chr, $m = 13.88$), but unexpectedly it is not significantly different (Fig. 6b, c; Additional file 10). Chromosome 16 displays the highest RPKM value ($m = 132.87$), an odd characteristic explained by the presence of genes massively expressed after meiosis: *Tnp1*, *Prm1* and *Prm2* (which, respectively, encode transition protein 1, protamines 1 and 2). Indeed, their expression value in round spermatids is over 5700 RPKM. Finally, although RPKM means of round spermatid-specific genes are in the same range for the X chromosome and autosomes (from 7.26 to 9.09), X-linked genes display a distribution of RPKM values that is significantly different from that of autosomal genes (Fig. 6c; Additional file 10).

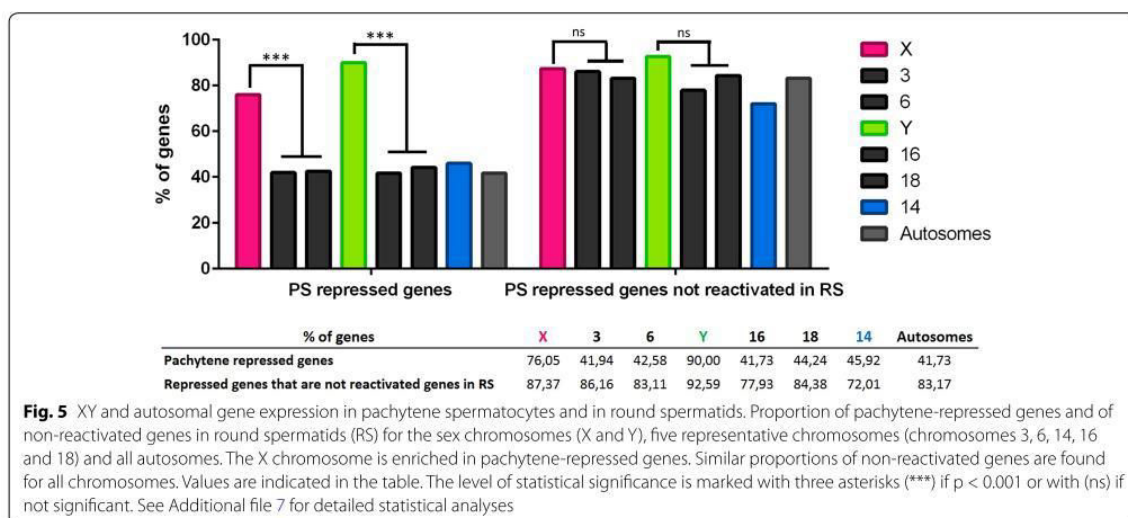
The Y chromosome

When focusing on the Y chromosome, we found a very different profile than that of the X chromosome. First, of the 1570 Y-linked genes, only ~23% are expressed at some point during spermatogenesis, compared to 62.69% for chromosome 16 and 65.77% for chromosome 18 (Table 1), which can be used as reliable comparisons for the Y chromosome in term of both length and number of genes. The fact that only 23% of Y chromosome genes were found expressed at some point during spermatogenesis is due to the presence of non-transcribed genes (or with a level of transcription too low to be detected) and non-transcribed pseudogenes belonging to *Sly*, *Ssty1*,



Ssty2 or Srsy gene family, located on the Y chromosome long arm. Indeed, the proportion of Y-linked genes expressed during spermatogenesis was dramatically increased when only genes (and not pseudogenes) were

analyzed (based on the data reported by Soh et al. [8]), and highly similar gene family members of the Y chromosome were treated as a single gene ID (see Additional file 9).



In spermatogonia B cells, only 30 Y-linked genes are expressed; this represents 8.38% of all Y-encoded expressed genes compared to 72.28% of chromosome 16 and 74.32% of chromosome 18 expressed genes (Fig. 4a; Additional file 5). Its RPKM mean value is, however, not significantly different from the corresponding autosomal values (Fig. 4b; Additional file 6). This result can be explained in light of the RPKM value distributions which are overall similar for Y-linked genes and autosomal genes (Fig. 4c; Additional file 6).

At pachytene stage, most of the spermatogonia expressed genes are repressed or completely shut down: 7.54% of expressed genes are pachytene-repressed genes, which means that 90% of the spermatogonial B expressed genes are repressed at the pachytene stage of meiosis. This proportion is not comparable in chromosome 16 and chromosome 18 (Fig. 5; Additional file 7). As a consequence, the proportion of Y-encoded genes “expressed” at this stage drops to 6.7% (Fig. 4a; Additional file 5); their RPKM mean value drops down to 4.90 and is significantly lower than that of autosomes (Fig. 4b; Additional file 5). Strikingly, 90% of Y-linked expressed genes are in fact expressed after meiosis (Fig. 4a), the vast majority of them (83.52%) being exclusively *de novo* expressed in round spermatids (genes first expressed at the spermatid stage) (Fig. 6a) and still found expressed in elongating spermatids (Fig. 4a). These values are significantly higher for the Y than for autosomes (Figs. 4a, 6a; Additional files 5 and 8). The extremely low level of their RPKM values is a peculiarity of Y-linked genes expressed in round spermatids (Figs. 4c, 6c; Additional files 6 and 10).

Chromosome 14

Chromosome 14 stands out compared to other autosomes (more particularly to chromosome 10 which can be used as a reliable comparison for chromosome 14 in term of both length and number of genes) and resembles that of the X in its high proportion in spermatid-enriched genes (~36.44%) and in spermatid-specific genes (~19.42%, Fig. 6a; Additional file 8). The mapping of these spermatid-specific genes revealed two regions that are both deprived of round spermatid non-reactivated genes and densely composed of round spermatid-specific genes (Fig. 7; genes listed in Additional file 11). The RPKM mean value of this group of genes is incidentally lower than that of spermatid-specific autosomal genes (3.61 compared to 7.80). Those genes belong to the α -taksan family which has been massively amplified in two regions of mouse chromosome 14 (Fig. 8).

Discussion

Based on immunofluorescence data of many studies [19, 22, 24–26, 38, 39, 41], the post-meiotic sex chromatin forms a peculiar structure which appears to accumulate more active and repressive histone marks than autosomes. These marks are crucial for the regulation of XY gene expression after meiosis and for normal sperm differentiation; changes in the composition of sex chromatin are associated with deregulation of XY genes, abnormal sperm differentiation and male infertility [34, 42, 43]. Here, we compared the post-meiotic sex chromatin with autosomal chromatin using ChIP-Seq analyses. In parallel, we studied the dynamics of XY gene expression

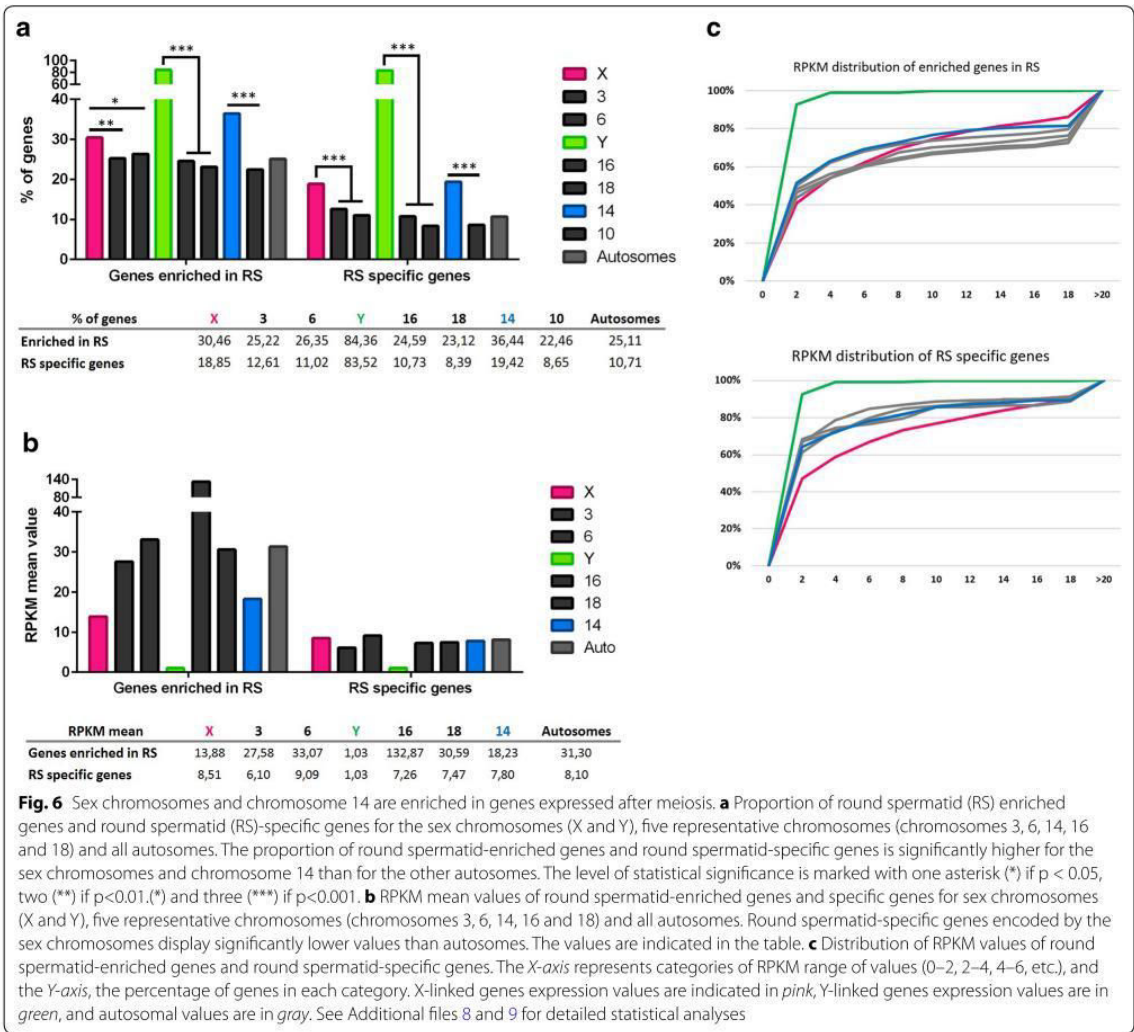


Fig. 6 Sex chromosomes and chromosome 14 are enriched in genes expressed after meiosis. **a** Proportion of round spermatid (RS) enriched genes and round spermatid (RS)-specific genes for the sex chromosomes (X and Y), five representative chromosomes (chromosomes 3, 6, 14, 16 and 18) and all autosomes. The proportion of round spermatid-enriched genes and round spermatid-specific genes is significantly higher for the sex chromosomes and chromosome 14 than for the other autosomes. The level of statistical significance is marked with one asterisk (*) if $p < 0.05$, two (**) if $p < 0.01$, (*) and three (***) if $p < 0.001$. **b** RPKM mean values of round spermatid-enriched genes and specific genes for sex chromosomes (X and Y), five representative chromosomes (chromosomes 3, 6, 14, 16 and 18) and all autosomes. Round spermatid-specific genes encoded by the sex chromosomes display significantly lower values than autosomes. The values are indicated in the table. **c** Distribution of RPKM values of round spermatid-enriched genes and round spermatid-specific genes. The X-axis represents categories of RPKM range of values (0–2, 2–4, 4–6, etc.), and the Y-axis, the percentage of genes in each category. X-linked genes expression values are indicated in pink, Y-linked genes expression values are in green, and autosomal values are in gray. See Additional files 8 and 9 for detailed statistical analyses

during spermatogenesis using RNA-Seq datasets from purified mouse germ cells.

The presence of active marks on the PMSC correlates with expression of many XY-encoded genes post-meiotically

First, we found that, following the global transcriptional shut down of XY gene expression during meiosis, chromatin marks associated with open chromatin and gene expression (i.e., H3K4me3 and Kcr) cover the sex chromosomes in the same way as they cover autosomes. This contrasts with immunofluorescence data in which H3K4me3 and Kcr signals appear more intense on the PMSC than on the rest of the nucleus [22, 39, 40] (and personal observations). A similar discrepancy

has previously been reported by Dai and colleagues for H4K8_hib and H4K8_ac; indeed, these marks appear enriched on the post-meiotic X and Y chromosomes by immunofluorescence, but their coverage of the X chromosome (obtained by ChIP-Seq) is poor compared to that of autosomes [41]. The authors hypothesized that the X chromosome regions covered by these marks could be particularly accessible to antibodies. Discrepancy between IF and ChIP-Seq may also be explained by the fact that sex chromatin is denser than autosomal chromatin (as suggested by DAPI staining); therefore, sex chromatin immunofluorescence signal accumulates in a smaller, denser region than for autosomes, and appears to be brighter. A similar artifact has been unraveled by Perche and colleagues, who have demonstrated that

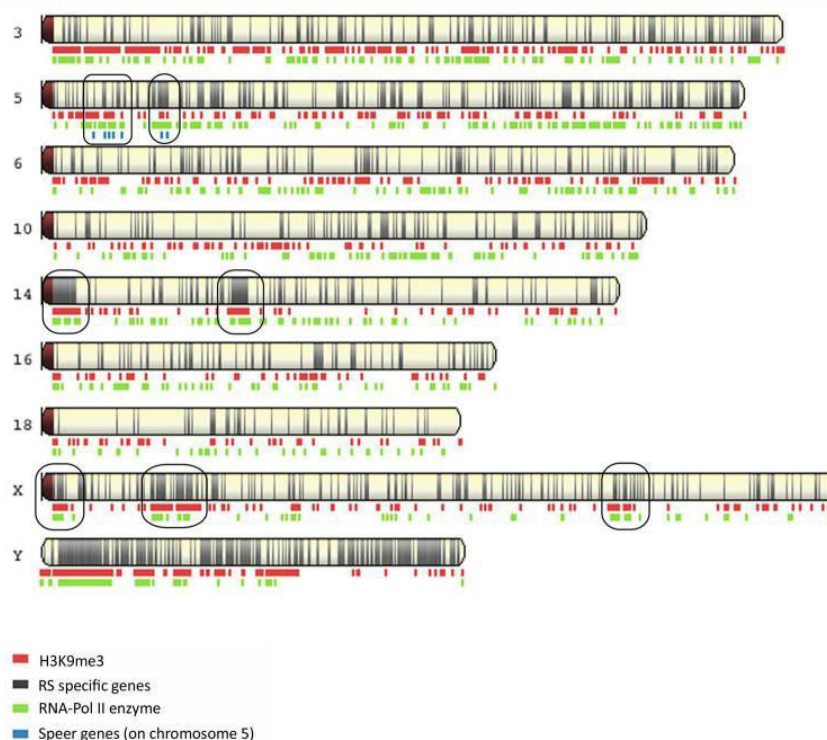
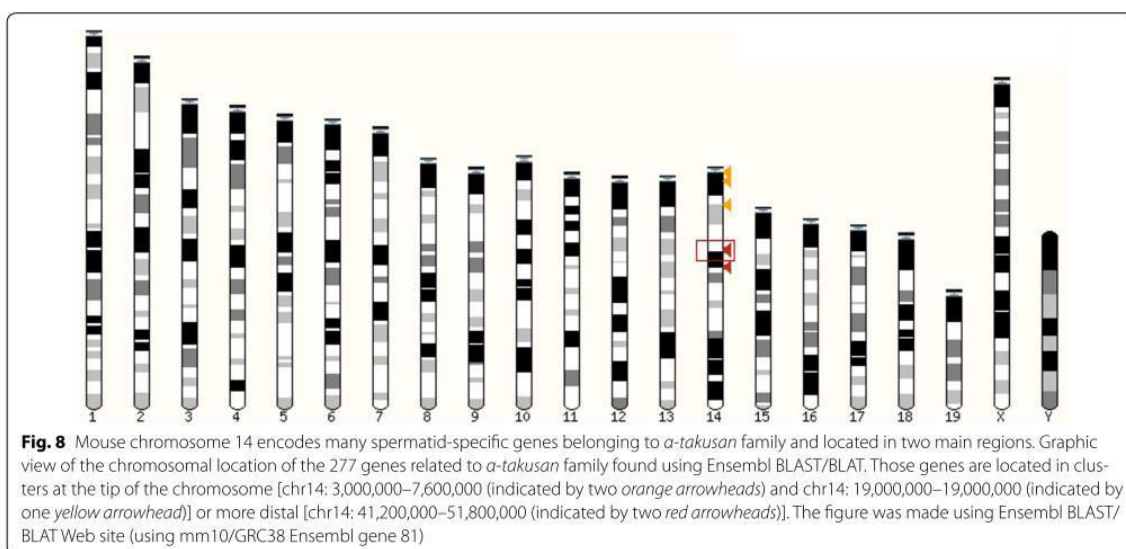


Fig. 7 Sex chromosomes and chromosome 14 have common chromatin features in round spermatids. Graphic representation of the ChIP-Seq profiles of H3K9me3 and RNA-Pol II enzyme over chromosomes 3, 5, 6, 10, 14, 16, 18, X and Y in round spermatids. RNA-Pol II (in green) marks the regions where round spermatid-expressed genes are located. The genomic location of round spermatid-specific genes is represented as narrow black bars on the chromosomes. The genomic location of *Speer* genes is indicated by blue bars underneath the chromosomes. Ampliconic multicopy spermatid-specific genes on portions of chromosomes 5, 14 and X are circled. Note that they are enriched in H3K9me3 (in red). The figure was made using NCBI Genome Decoration Page Web site (using mm10/GRC38 Ensembl gene 81)

macro-H2A enrichment on the inactive X of female somatic cells was in fact due to a higher density in nucleosomes [49]. One should nevertheless keep in mind that, in contrary to immunofluorescence experiments, ChIP-Seq analyses are performed on a pool of round spermatids from step 1 to step 8 and may mask/average differences between spermatids at different steps of spermiogenesis. Besides, it is worth noting that independently of the width of their genome coverage, active chromatin marks such as H3K4me3, H2A.B3, Kcr and H4K8_hib are enriched at the TSS of X-encoded and autosomal genes expressed post-meiotically [38, 39, 41] (and personal observations).

Since the sex chromosomes appear to accumulate active chromatin marks in the same way as autosomes after meiosis, we investigated expression of XY genes at that stage. Several studies have concluded that the X chromosome is still under the influence of MSCI after meiosis since they observed that only a small number

of genes are expressed from the X chromosome in post-meiotic cells [25, 50, 51]. These studies were based on microarray analyses and either ignored multicopy genes or considered all genes of the same family (all copies of the same gene) as one gene. Here, using parameters allowing interpretation of multicopy genes, we found that the X chromosome is not depleted in genes expressed post-meiotically. *Au contraire*, a high number of X genes are expressed after meiosis; the X chromosome even encompasses a higher proportion of genes which are upregulated in round spermatids than autosomes. Also a higher proportion of genes with spermatid-specific expression (*de novo* expressed genes, i.e., first expressed at the spermatid stage) was found on the X than on autosomes. Our data are in line with results obtained by [37] which showed that the mouse X chromosome encodes 273 genes (which belongs to 33 multicopy gene families) with predominant expression after meiosis.



To the best of our knowledge, no thorough description of the dynamics of mouse Y gene expression during spermatogenesis has been performed so far. This is probably due to the peculiar structure of the mouse Y chromosome (composed of ampliconic euchromatin for >95% of its sequence [8]) and to the fact that most studies used the previous version of the mouse genome (mm9) which is incomplete in terms of Y chromosome sequence. Here, we found that the vast majority of Y-encoded expressed genes are exclusively expressed after meiosis (~83% of expressed genes compared to ~11% for chromosome 16), but with very low expression values. This reflects the presence of 2 gene families (*Sly* and *Ssty*) representing more than 400 genes in total [8], and which are exclusively expressed in spermatids [52, 53].

It is important to note that the threshold value above which a gene is considered as expressed is a critical parameter. For the present study, this value was calculated using a method comparing expression levels of exons and intergenic regions, previously described in Ramsköld et al. [48], and which is lower than the one chosen in other studies such as in [54]. In spite of that, many Y- and X-encoded ampliconic genes which belong to families of genes specifically expressed after meiosis had expression values below that threshold and were considered as silent (~2/3rd of all Y-linked genes). Since the conservation between ampliconic genes of the same family sometimes reaches 99%, it is impossible to precisely determine which gene members are transcribed and which are not. Soh et al. have estimated transcription of Y ampliconic gene families in whole testicular RNA-Seq

datasets based on the search of sequence variants that distinguish individual members of each gene family. Out of the 432 genes and 366 pseudogenes of *Sly/Ssty* families they could infer, they found evidence of transcription of at least 25% of them ($n = 208$). Transcription of *Srsy* genes was too low to be confidently confirmed [8]. These results are in agreement with those found in our analysis, since we found ~300 Y-encoded genes which are specifically expressed after meiosis.

Specific features of the PMSC

ChIP-Seq analyses revealed that the sex chromatin bears a signature different from that of autosomal chromatin, characterized by enrichment in H3K9me3 and depletion in histone H4 acetylation, H3K27me3 and 5-hydroxymethylcytosine. These results are in agreement with previous studies in which H3K9me3 enrichment and H3K27me3 depletion have been observed on the sex chromatin during and after meiosis, by immunofluorescence [19, 22, 25].

Repressive chromatin marks H3K9me3 and H3K27me3 are considered to be mutually exclusive [55]. H3K27me3 is usually present at gene-rich regions, while H3K9me3 has been shown to localize to regions with tandem repeats (i.e., centromeres, telomeres and long terminal repeats) but is also found at unique sites, near satellite repeats or long terminal repeats [56]. Here, we found H3K9me3 is more present on the sex chromosomes than on autosomes (with H3K9me3 coverage of the sex chromosomes representing ~40% of H3K9me3 entire genome coverage) and, in comparison, covers more of the Y than

of the X chromosome. Despite its highly ampliconic structure, the mouse Y content is similar in interspersed-repeat to mouse autosomes and is rather gene dense. Since more than 95% of its sequence is made of ampliconic euchromatin [8], heterochromatinization of the Y cannot account for H3K9me3 enrichment. A lysine residue cannot be both methylated and acetylated; yet, no major depletion in H3K9ac was observed on the post-meiotic sex chromatin, but this is not surprising since H3K9ac is located at the transcription start sites (TSS) of active genes, while H3K9me3 is reduced at TSS and maps to intergenic regions [57, 58].

Analysis of ChIP-Seq data also revealed that PMSC is depleted in acetylated histone H4 and in acetylated histone globally. Depletion in acetylated histone H4 had been observed on sex chromosomes during meiosis [19] and, recently, Goudarzi et al. have reported the depletion of the X chromosome in acetylated and butyrylated histone H4 residues during and after meiosis [59]. Since two recent studies have shown that BET bromodomain proteins (such as BRDT and BRD4) which are involved in transcriptional activation and chromatin remodeling during spermatogenesis, can bind to acetylated histone H4 lysine residues but not to butyrylated or crotonylated residues [59, 60], it is clear that the expression of sex chromosome-encoded genes is controlled (at least in part) by distinct pathway(s) than that of autosomal genes, in post-meiotic cells. Besides, histone H4 hyperacetylation and BET bromodomain proteins have been shown to be essential for the chromatin remodeling events which ultimately lead to the replacement of histones by protamines during spermatid elongation [61]. Histone H4 hyperacetylation starts a few days after the round spermatid stage, in elongating spermatids. To date, this process has only been studied globally, but it would be interesting to investigate whether the dynamics of histone acetylation and removal in elongating spermatids is different for the sex chromosomes compared to other chromosomes.

Finally, genome mapping of 5-hydroxymethylcytosine had previously shown that this DNA modification is less present on the post-meiotic X chromosome than on autosomes [47]; our study confirmed this observation and showed that the Y chromosome is also devoid of 5hMC.

Distinct feature between the X and Y chromosomes

H3K27 residue can either be acetylated or methylated, and both modifications are enriched at the TSS. Our analyses showed that the Y chromosome, while devoid of H3K27me3, is enriched in H3K27ac. Since H3K27ac marks the TSS and enhancers of active genes [62], enrichment of H3K27ac on the Y may be correlated with the fact that many Y chromosome-encoded genes

are expressed post-meiotically. Despite the presence of many spermatid-expressed genes on the X chromosome, we did not observe a particular enrichment of H3K27ac compared to autosomes suggesting that X and Y chromosome gene regulation may differ. The X and Y chromosomes, while sharing specific features, bear significant differences and may be considered individually rather than as a whole. Using a similar approach, it would be interesting to look at the X and Y chromatin composition in other cell types, germinal and somatic, as well as in other organisms.

Dynamic of XY gene expression during spermatogenesis

Our analysis provides a comparison of XY gene expression and autosomal gene expression throughout spermatogenesis. Based on those data, we can conclude that, before meiosis, a similar proportion of genes is expressed from the X chromosome and from autosomes, while only a few (30) Y genes are expressed. At the pachytene stage of meiosis, as a consequence of MSC1, a large majority of X and Y genes (76.05 and 90%) can be considered as repressed (i.e., at least twofold downregulated in pachytene spermatocytes compared to spermatogonial B cells), compared to ~40% of autosomal genes.

Interestingly, most genes (whether autosomal or sex chromosome-encoded) which are expressed in spermatogonia and repressed in spermatocytes are not "reactivated" after meiosis, suggesting very distinct genetic programs between the spermatogonia stage and the meiotic/post-meiotic phase. This is in agreement with results obtained in recent transcriptomic studies which described a switch in global gene expression at the initiation of pachynema [50, 54]. After meiosis, despite the fact that the transcription of some genes with spermatid-specific function starts in spermatocytes [54], there is still a substantial number of genes of which expression is enriched in spermatids or even spermatid specific; the sex chromosomes and chromosome 14 are particularly enriched in those genes compared to autosomes.

Portions of chromosome 14 may be under similar evolutionary constraints than the sex chromosomes

In our study, we observed that chromosome 14 stands out compared to other autosomes and resembles the X chromosome in both its epigenomic features and its high proportion of spermatid-specific genes with lower than autosomal RPKM values. Interestingly, the mapping of these spermatid-specific genes revealed two large genomic regions which encompass ampliconic genes of the α -takusan family. The α -takusan family (takusan, meaning "many" in Japanese) has been shown to encompass at least 75 genes, and its expression is restrained to brain and testis [63]. We show here that, in the germline,

the α -*takusan* genes are specifically expressed after meiosis, are enriched in H3K9me3 and have been massively amplified in the mouse lineage, with ~277 genes found in total. Those are features shared with the sex chromosome-encoded genes, *Slx/Sly* and *Spin/Ssty* gene families [32, 35, 53, 64] which have been shown to be involved in the X versus Y chromosome post-meiotic intragenomic conflict (also known as sex chromosome drive). At the basis of this phenomenon is the presence of (a) selfish gene(s) (or transmission distorter) on the X chromosome which favors its own transmission when not balanced. *Slx* and *Sly* have been shown to be regulators of this process via their opposite effects on gene expression [45]. The involvement of α -*takusan* genes in this phenomenon remains to be determined, but our results suggest that they are under similar evolutionary constraints than *Slx/Sly* and *Spin/Ssty* gene families. X chromosome drivers are thought to prompt the development of a resistant Y chromosome and of autosomal suppressors (see [65] for a recent review). It is therefore tempting to speculate that the α -*takusan* gene family could act as a potential autosomal suppressor of the intragenomic conflict between *Slx* and *Sly* gene families. Investigations on the α -*takusan* genes during spermiogenesis will surely shed light on the mechanism(s) underlying this intragenomic conflict.

Is H3K9me3 enrichment on the PMSC a consequence of MSCI or of the competition between the sex chromosomes?

It is intriguing that portions of chromosome 14 which a priori are not submitted to MSCI are enriched in H3K9me3. In that respect, α -*takusan* genes are probably not the only autosomal genes with this chromatin feature associated with gene amplification, but maybe the most striking example of autosomal gene amplification. As such, the *Speer* gene family located on chromosome 5 is another example of autosomal ampliconic spermatid-specific genes [45, 66, 67] but less numerous than α -*takusan* genes; it also appears enriched in H3K9me3 (Fig. 7). This might represent the first evidence that H3K9me3 enrichment on the PMSC is due to the post-meiotic intragenomic conflict rather than to MSCI. To address this question, it will be required to determine whether H3K9me3 enrichment on gene-rich portions of chromosome 14 and chromosome 5 is established in spermatocytes or in spermatids.

Whether or not H3K9me3 enrichment is initiated at meiosis or later, it does not prevent XY gene expression in spermatids. Our data suggest that the presence of active chromatin marks, such as H3K4me3, Kcr, H3K9ac and, particularly for the Y, H3K27ac at the TSS of the genes located in an H3K9me3-rich repressive

environment is sufficient to ensure transcription by the RNA-Pol II enzyme (Fig. 7).

Conclusion

In mouse post-meiotic cells, the composition of sex chromatin significantly differs from that of autosomes, such as its enrichment in H3K9me3. The sex chromosomes also contain a higher proportion of genes expressed at their highest after meiosis, though often with lower expression values than autosomal genes. We propose that these features are consequences of the post-meiotic X versus Y intragenomic conflict rather than a consequence of a repressive chromatin environment inherited from the meiotic silencing of sex chromosomes. In other species than the mouse, such as in the cattle and domestic pig [7, 68, 69] sex chromosomes encode clusters of ampliconic genes, it would therefore be interesting to investigate their PMSC composition and dynamics of gene expression during spermatogenesis.

Methods

ChIP-Seq analyses

Round spermatids ChIP-Seq datasets from [39, 41, 57, 70, 71] were analyzed as follows. Only those with a high number of reads and a good FastQC report were considered. All samples and input were single end and were aligned using Heng Li Burrows-Wheeler aligner BWA [72] version 0.7.5a-r405 with “mem” command against last mouse genome release mm10 (see Additional file 12). By default with BWA, reads which do not map uniquely on the genome are distributed to one location picked randomly. Briefly, BWA-MEM algorithm works by seeding alignments with maximal exact matches (MEMs) and then extending seeds with the affine-gap Smith-Waterman algorithm (SW). In case of multiple primary alignments, -c INT discards a MEM if it has more than INT occurrence in the genome. The maximum is set to 10,000. Peaks were then called with MACS [73] v1.4 using default parameters (p value cut off for peak detection = $1e^{-05}$; mfold parameters = 10.32), cf. Additional file 12. Decreasing the mfold parameters values did not change the interpretation of ChIP-Seq data. Analyses were partly performed using Mississippi Galaxy Web site <https://mississippi.snv.jussieu.fr/>.

Integrative Genomic Viewer (IGV) was used to produce graphic representations of H3K9me3, H3K27ac, H3K27me3, H4ac, H3K4me3 and Kcr ChIP peaks on chromosomes X, Y, 3 and 18 [74]. Chromosomes 3 and 18 were used as “representative autosomes” because they have approximately the same size as chromosomes X and Y, respectively. Comparison with other autosomes gave similar results.

Expression analyses

RNA-Seq datasets from [47] (GSE35005) were analyzed by GenoSplice (<http://www.genosplice.com>) using the following parameters: Reads were aligned using STAR 2.4.2a [75] on Mouse Genome version GRCh38 (see also Additional file 12). All genes (including pseudogenes) were taken into account. Gene counts were computed using featureCounts from the Subread package version 1.4.6-p5 [76]. RPKM values were computed from Subread results. Ensembl 81 was used for gene annotation. Reads which mapped at different locations were assigned to the location with the best score or to one location picked randomly by the program (option-M, see line commands in Additional file 12). The limit is set to 10 (i.e., reads which mapped to 10 or more locations with a similar score were excluded; this represents less than 0.5% of all reads, cf. Additional file 12). The threshold RPKM value above which a gene was considered as expressed was calculated by comparing the expression levels of exons and intergenic regions (i.e., intersection of density plots), as previously described in Ramsköld et al, see Additional file 13 [48]. Individual threshold RPKM values vary among datasets from 0.15 to 0.27, yielding to an average threshold RPKM value of 0.22. Genes de novo expressed are genes found to be expressed (RPKM > 0.22) at one particular stage (pachytene stage or in round spermatids) and not before. Pachytene-repressed genes are genes that are at least twofold downregulated compared to their RPKM value in spermatogonial B cells. Round spermatids non-reactivated genes are genes defined as repressed in pachytene stage (see above) which do not recover at least half of their spermatogonia B RPKM value in round spermatids. Genes enriched in round spermatids are genes that are at least twofold upregulated compared to their RPKM value in pachytene spermatocytes. To visualize the distribution of RPKM values, Excel complementary module "Analysis ToolPak" was used to categorize genes according to their RPKM values (0–2, 2–4, 4–6, etc.).

Annotation of the genome

Genome Decoration Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp/>) was used to produce graphic representation of round spermatid-specific genes, *Spee* genes, H3K9me3 and RNA-Pol II genomic locations on chromosomes 3, 5, 6, 10, 14, 16, 18, X and Y.

Immunofluorescence

Immunofluorescence experiments were performed on round spermatids following a protocol adapted from Barlow et al. [77] and previously described in [34]. Anti-H3K9me3 (Millipore) and anti-H3K27ac (active

motif) were used at 1/200. Animal procedures were subjected to local ethical review (*Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale, Université Paris Descartes*; registration number CEEA34.JC.114.12).

Ensembl analysis

Ensembl BLAST Web site (<http://www.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>) was used to search for genes related to takusan gene family. Using several gene accession IDs as queries, a total of 277 related genes (with >50% identity) were found; all mapped to chromosome 14. The analysis in which highly similar gene family members of the X and Y chromosome were treated as a single gene (Additional file 9) was performed as follows: Ensembl Biomart Web site (<http://www.ensembl.org/biomart>) was used to search for highly similar genes (with >80% identity) on the X and Y chromosomes. For the X chromosome, combination of the gene ID of identified members of multicopy gene families and the RNA-Seq data was used to analyze and collapse highly related genes into one single gene ID. For the Y chromosome, the multicopy gene-collapsed analysis was based on Soh et al. data and combined with the RNA-Seq data.

Statistics

Analyses of chromatin marks coverage were performed by determining the 95% confidence interval (see Additional file 1). To compare the number of genes (based on their expression status) encoded by the sex chromosomes, chromosome 14 and representative autosomes, we performed Chi-square tests (see Additional files 5, 7 and 8). To compare distribution of RPKM values, Mann and Whitney tests were performed (see Additional files 6 and 9).

Additional files

Additional file 1. Table showing individual chromosome coverage (reported to total chromosome length) of 9 histone PTM (i.e., H3K4me3, Kcr, H3K9ac, H4K8_hib, H4ac, K_acetylation, H3K9me3, H3K27ac, H3K27me3) and 5-hydroxymethylcytosine in round spermatids. Values are indicated for the sex chromosomes, chromosome 14 and representative autosomes. The mean coverage values, standard deviation (SD) and boundaries (maximum and minimum) values of the 95% confidence interval (CI) are reported underneath. Those values were calculated based on data collected from all chromosomes or from only autosomes (i.e., excluding values for the X and Y chromosomes). Values which are outside the 95% CI calculated for all chromosomes are represented in italic; values which are outside the 95% CI calculated for "only autosomes" are represented in bold and underscored.

Additional file 2. Graphic representation of the coverage (in base pair) of 9 histone PTM (i.e., H3K4me3, Kcr, H3K9ac, H4K8_hib, H4ac, K_acetylation, H3K9me3, H3K27ac, H3K27me3) and 5-hydroxymethylcytosine in round spermatids.

Additional file 3. Graphic representation of the ChIP-Seq profiles of H3K9me3, H3K27ac, H3K27me3, H4ac, H3K4me3 and Kcr over the sex chromosomes (X and Y) and two representative autosomes (chromosome 3 and chromosome 18) using IGV (Integrative Genomic Viewer). RefSeq genes are indicated underneath.

Additional file 4. Extended panel from Fig. 3. Immunofluorescence detection of H3K27ac (red) in round spermatid nuclei. DAPI (blue) was used to stain nuclei. The most DAPI-dense round region is the chromocenter (i.e., the constitutive pericentromeric heterochromatin) the less DAPI-dense structure adjacent to the chromocenter is the post-meiotic sex chromatin (PMSC) and is indicated by an arrow. Anti-H3K9me3 (in green) marks the chromocenter and the PMSC in wild type (WT) round spermatids. Two types of staining were observed: either a brighter signal co-localizing with the PMSC (top panel, $n=28/55$), or a diffuse bright signal in the nucleus (middle panel, $n=27/55$). As control, round spermatids with a large deletion of the Y chromosome (MSYq-) were used (bottom panel). The vast majority of MSYq- round spermatids analyzed (59/65) did not display any enrichment of H3K27ac on the PMSC, indicating that in WT spermatids only the Y and not the X is enriched in H3K27ac.

Additional file 5. Tables presenting the results of Chi-square tests performed on the number of X- or Y-encoded expressed genes compared to autosomal expressed genes throughout spermatogenesis.

Additional file 6. Graphic representation of the mean rank values obtained with Mann and Whitney tests and tables presenting the results of Mann and Whitney tests performed on the RPKM values of X- and Y-encoded genes compared to that of autosomal genes in spermatogonia B (SB), pachytene spermatocytes (PS) and round spermatids (RS). P indicates the obtained p value (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; p < 0.001).

Additional file 7. Tables presenting the results of Chi-square tests performed on the number of pachytene (PS) repressed genes and PS repressed genes that are not reactivated in round spermatids (RS) for the X and Y chromosomes compared to representative autosomes.

Additional file 8. Tables presenting the results of Chi-square tests performed on the number of genes enriched in round spermatids (RS) and on the number of RS-specific genes for the X and Y chromosomes and chromosome 14 compared to representative autosomes.

Additional file 9. Analysis of single-copy genes and collapsed multicopy gene family of the sex chromosome. **a** Table presenting the number of X-encoded single-copy genes and multicopy gene family expressed throughout spermatogenesis, enriched in round spermatids (RS) or round spermatids (RS) specific. A Chi-square test has been performed on the number of genes expressed at each stage, genes enriched in RS or RS-specific genes for the X chromosome compared to representative autosomes. **b** Table presenting the number of Y-encoded single-copy genes and multicopy gene family expressed throughout spermatogenesis, enriched in round spermatids (RS) or round spermatids (RS) specific. A Chi-square test has been performed on the number of genes expressed at each stage, genes enriched in RS or RS-specific genes for the Y chromosome compared to representative autosomes. **c** Tables presenting the RPKM mean and RPKM sum of the Y-linked multicopy gene family expressed in round spermatids (RS).

Additional file 10. Graphic representation of the mean rank values obtained with Mann and Whitney tests and tables presenting the results of Mann and Whitney tests performed on the RPKM values of enriched genes in round spermatids (RS) and round spermatid (RS)-specific genes on the X and Y chromosomes compared to that of representative autosomes. P indicates the obtained p value (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; p < 0.001).

Additional file 11. List of the round spermatid-specific genes of the chromosome 14.

Additional file 12. Detailed protocol and information regarding the RNA-Seq and ChIP-Seq analysis.

Additional file 13. **a** RPKM threshold determination. Reads were mapped to Ensembl Genes (in blue) and to intergenic regions (in red). By comparing the expression levels of exons and intergenic regions, the intersection of the density plots was used to determine the threshold

value to consider a gene as expressed (in our study = 0.22). **b** The true number of expressed genes in each bin (black) was estimated from the observed numbers for Ensembl genes (blue, same as **a**) by multiplication of the latter by the false discovery rate. This estimate was converted to cumulative amount, and the false negative rate was estimated as a function of expression level using the formula described in [48]. **c**. Bins were converted to cumulative amounts of genes expressed above the expression levels for genes (cum_genes; blue) and controls (cum_background; red). A false discovery rate fdr (green) was calculated at each expression level as described in [48].

Abbreviations

ChIP Seq: chromatin immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing; H3K4me3: trimethylation of lysine 4 on histone H3; H3K9ac: acetylation of lysine 9 on histone H3; H3K9me3: trimethylation of lysine 9 on histone H3; H3K27ac: acetylation of lysine 27 on histone H3; H3K27me3: trimethylation of lysine 27 on histone H3; H4ac: acetylation of histone H4; H4K8_ac: acetylation of lysine 8 on histone H4; H4K8_hib: 2-hydroxyisobutyrylation of lysine 8 on histone H4; K_acetylation: lysine acetylation; Kcr: lysine crotonylation; MSC: meiotic sex chromosome inactivation; MSY: male-specific region of the Y chromosome; PMSC: post-meiotic sex chromatin, i.e., the X and Y chromatin in spermatids; PS: pachytene spermatocytes; PTM: posttranslational modifications; RPKM: reads per kilobase of transcript per million reads mapped; RNA Seq: high-throughput sequencing of RNA; RS: round spermatids; SB: spermatogonia B; TSS: transcription start site; uH2A: monoubiquitinated histone H2A.

Authors' contributions

JC and CM designed the study and prepared the manuscript. FT and JC developed the workflow to analyze ChIP-Seq data. CM analyzed RNA-Seq data. JC performed immunofluorescence experiments. DV provided experimental and statistical guidance. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1016, Institut Cochin, Paris, France. ² Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR8104, Paris, France. ³ Faculté de Médecine, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁴ INSERM U1163, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, 24 Boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France.

Acknowledgements

The authors wish to thank James Turner for critical reading of the manuscript, Sophie Rousseaux and Saadi Khochbin for sharing H4K8_hib ChIP-Seq data and for helpful discussions, and Christophe Antoniewski from the ARTbio bioinformatics analysis facility (Sorbonne Universités, UPMC Université, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine) for help with Mississippi Galaxy Web site. The authors also thank the Histology, Immunostaining and Laser Microdissection Facility, and the Cellular Imaging Facility of the Cochin Institute (INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Ethical approval and consent to participate

Animal procedures were subjected to local ethical review (Comité d'Éthique pour l'Expérimentation Animale, Université Paris Descartes; registration number CEEA34.JC.114.12).

Funding

This work was supported by Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Cnrs (Centre National de la Recherche Scientifique), Université Paris Descartes, the Agence Nationale de la Recherche program ANR-12-JSV2-0005-01 (to J.C.) and a Marie Curie fellowship FP7-PEOPLE-2010-IEF-273143 (to J.C.). The funding bodies did not have any role in the design of the study, the collection, analysis, and interpretation of data nor in the writing of the manuscript.

Received: 13 July 2016 Accepted: 17 October 2016

Published online: 27 October 2016

References

- Ellegren H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat Rev Genet.* 2011;12(3):157–66.
- Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Cho TJ, Koutseva N, Zaghlul S, Graves T, Rock S, et al. Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators. *Nature.* 2014;508(7497):494–9.
- Mueller JL, Skaletsky H, Brown LG, Zaghlul S, Rock S, Graves T, Auger K, Warren WC, Wilson RK, Page DC. Independent specialization of the human and mouse X chromosomes for the male germ line. *Nat Genet.* 2013;45(9):1083–7.
- Cortez D, Marin R, Toledo-Flores D, Froidevaux L, Liechti A, Waters PD, Grutzner F, Kaessmann H. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. *Nature.* 2014;508(7497):488–93.
- Deng X, Berletch JB, Nguyen DK, Distech CM. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. *Nat Rev Genet.* 2014;15(6):367–78.
- Rice W. Sexually antagonistic genes: experimental evidence. *Science.* 1992;256:1436–9.
- Li G, Davis BW, Raudsepp T, Peaks Wilkerson AJ, Mason VC, Ferguson-Smith M, O'Brien PC, Waters PD, Murphy WJ. Comparative analysis of mammalian Y chromosomes illuminates ancestral structure and lineage-specific evolution. *Genome Res.* 2013;23(9):1486–95.
- Soh YQ, Alföldi J, Pyntikova T, Brown LG, Graves T, Minx PJ, Fulton RS, Kremitzki C, Koutseva N, Mueller JL, et al. Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes. *Cell.* 2014;159(4):800–13.
- Turner JM. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development (Cambridge, England).* 2007;134(10):1823–31.
- van der Heijden GW, Eijpe M, Baarends WM. The X and Y chromosome in meiosis: how and why they keep silent. *Asian J Androl.* 2011;13(6):779–80.
- Turner JM. Meiotic silencing in mammals. *Annu Rev Genet.* 2015;49:395–412.
- Checchi PM, Engebrecht J. Heteromorphic sex chromosomes: navigating meiosis without a homologous partner. *Mol Reprod Dev.* 2011;78(9):623–32.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet.* 2001;27(4):422–6.
- Zhang YE, Vrbancovski MD, Landback P, Marais GA, Long M. Chromosomal redistribution of male-biased genes in mammalian evolution with two bursts of gene gain on the X chromosome. *PLoS Biol.* 2010;8(10): pii=1000494.
- Ichijima Y, Ichijima M, Lou Z, Nussenzweig A, Camerini-Otero RD, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH. MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev.* 2011;25(9):959–71.
- Royo H, Prosser H, Ruzankina Y, Mahadevaiah SK, Cloutier JM, Baumann M, Fukuda T, Hoog C, Toth A, de Rooij DG, et al. ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes Dev.* 2013;27(13):1484–94.
- Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers JHJ, Grootegoed JA. Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev Biol.* 1999;207:322–33.
- Baarends WM, Wassenaar E, van der Laan R, Hoogerbrugge J, Sleddens-Linkels E, Hoeijmakers JH, de Boer P, Grootegoed JA. Silencing of unpaired chromatin and histone H2A ubiquitination in mammalian meiosis. *Mol Cell Biol.* 2005;25(3):1041–53.
- Khalil AM, Boyar FZ, Driscoll DJ. Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101(47):16583–7.
- Cowell IG, Autcott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Wu R, et al. Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals. *Chromosoma.* 2002;111(1):22–36.
- Motzkus D, Singh PB, Hoyer-Fender S. M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet.* 1999;86:83–8.
- van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, Wansink DG, van der Vlag J, Peters AH, de Boer P. Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 2007;39(2):251–8.
- Handel MA. The XY body: a specialized meiotic chromatin domain. *Exp Cell Res.* 2004;296(1):57–63.
- Greaves IK, Rangasamy D, Devoy M, Marshall Graves JA, Tremethick DJ. The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z, containing facultative heterochromatin, following meiosis. *Mol Cell Biol.* 2006;26(14):5394–405.
- Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, Lee JT. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol.* 2006;16(7):660–7.
- Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ, Mitchell MJ, Burgoyne PS. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Dev Cell.* 2006;10(4):521–9.
- Khil PP, Smirnova NA, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet.* 2004;36(6):642–6.
- Reinke V, Gil IS, Ward S, Kazmer K. Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Development (Cambridge, England).* 2004;131(2):311–23.
- Odorisio T, Mahadevaiah SK, McCarrey JR, Burgoyne PS. Transcriptional analysis of the candidate spermatogenesis gene *Ube1x* and of the closely related *Ube1x* shows that they are coexpressed in spermatogonia and spermatids but are repressed in pachytene spermatocytes. *Dev Biol.* 1996;180:336–43.
- Hendriksen PJM, Hoogerbrugge JW, Themmen APN, Koken MHM, Hoeijmakers JHJ, Oostra BA, van der Lende T, Grootegoed JA. Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 1995;170:730–3.
- Wang PJ, Page DC, McCarrey JR. Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum Mol Genet.* 2005;14(19):2911–8.
- Reynard LN, Turner JM, Cocquet J, Mahadevaiah SK, Toure A, Hoog C, Burgoyne PS. Expression analysis of the mouse multi-copy X-linked gene *Xlr*-related, meiosis-regulated (*Xmr*), reveals that *Xmr* encodes a spermatid-expressed cytoplasmic protein. *Biol Reprod.* 2007;77(2):329–35.
- Reynard LN, Cocquet J, Burgoyne PS. The multi-copy mouse gene *Sycp3*-like *Y*-linked (*Sly*) encodes an abundant spermatid protein that interacts with a histone acetyltransferase and an acrosomal protein. *Biol Reprod.* 2009;81(2):250–7.
- Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Mahadevaiah SK, Affara NA, Ward MA, Burgoyne PS. The multicopy gene *Sly* represses the sex chromosomes in the male mouse germline after meiosis. *PLoS Biol.* 2009;7(11):e1000244.
- Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Riel JM, Karacs TP, Rattigan A, Ojarikre OA, Affara NA, Ward MA, Burgoyne PS. Deficiency in the multicopy *Sycp3*-like X-linked genes *Slx* and *Slx1* causes major defects in spermatid differentiation. *Mol Biol Cell.* 2010;21(20):3497–505.
- Yang F, Skaletsky H, Wang PJ. *Ubl4b*, an X-derived retrogene, is specifically expressed in post-meiotic germ cells in mammals. *Gene Expr Patterns.* 2007;7(1–2):131–6.
- Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC, Turner JM. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet.* 2008;40(6):794–9.
- Soboleva TA, Nekrasov M, Pahwa A, Williams R, Huttley GA, Tremethick DJ. A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;19(1):25–30.
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell.* 2011;146(6):1016–28.
- Montellier E, Rousseaux S, Zhao Y, Khochbin S. Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: Post-meiotic male-specific gene expression. *Bioessays.* 2011;34(3):187–93.
- Dai L, Peng C, Montellier E, Lu Z, Chen Y, Ishii H, Debernardi A, Buchou T, Rousseaux S, Jin F, et al. Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark. *Nat Chem Biol.* 2014;10(5):365–70.
- Baarends WM, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Schoenmakers S, Sun ZW, Grootegoed JA. Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the *Hr6b*-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 11):1841–51.
- Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH. RNFB regulates active epigenetic modifications

- and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Genes Dev.* 2012;26(24):2737–48.
44. Mulugeta Achame E, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Sleddens-Linkels E, Ooms M, Sun ZW, van Ijcken WJ, Grootegoed JA, Baarends WM. The ubiquitin-conjugating enzyme HR6B is required for maintenance of X chromosome silencing in mouse spermatocytes and spermatids. *BMC Genom.* 2010;11:367.
 45. Cocquet J, Ellis PJ, Mahadevaiah SK, Affara NA, Vaiman D, Burgoyne PS. A genetic basis for a postmeiotic X versus Y chromosome intragenomic conflict in the mouse. *PLoS Genet.* 2012;8(9):e1002900.
 46. Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Sutcliffe MJ, Palmer SJ. Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal “spermiogenesis” gene mapping to the long arm. *Cell.* 1992;71:391–8.
 47. Gan H, Wen L, Liao S, Lin X, Ma T, Liu J, Song CX, Wang M, He C, Han C, et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine during mouse spermatogenesis. *Nat Commun.* 1995;2013:4.
 48. Ramskold D, Wang ET, Burge CB, Sandberg R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(12):e1000598.
 49. Perche PY, Vourc’h C, Konecny L, Souchier C, Robert-Nicoud M, Dimitrov S, Khochbin S. Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol.* 2000;10(23):1531–4.
 50. Fallahi M, Getun IV, Wu ZK, Bois PR. A global expression switch marks pachytene initiation during mouse male meiosis. *Genes (Basel).* 2010;1(3):469–83.
 51. Hu YC, Namekawa SH. Functional significance of the sex chromosomes during spermatogenesis. *Reproduction* (Cambridge, England). 2015;149(6):R265–77.
 52. Toure A, Clemente EJ, Ellis P, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Ball PA, Reynard L, Loveland KL, Burgoyne PS, Affara NA. Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm. *Genome Biol.* 2005;6(12):R102.
 53. Comptour A, Moretti C, Serrentino ME, Auer J, Ialy-Radio C, Ward MA, Toure A, Vaiman D, Cocquet J. SSTY proteins co-localize with the post-meiotic sex chromatin and interact with regulators of its expression. *FEBS J.* 2014;281(6):1571–84.
 54. da Cruz I, Rodriguez-Casuriaga R, Santinaque FF, Farias J, Curti G, Capoaño CA, Folle GA, Benavente R, Sotelo-Silveira JR, Geisinger A. Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage. *BMC Genom.* 2016;17(1):294.
 55. Kimura H. Histone modifications for human epigenome analysis. *J Hum Genet.* 2013;58(7):439–45.
 56. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007;448(7153):553–60.
 57. Bryant JM, Donahue G, Wang X, Meyer-Ficca M, Luense LJ, Weller AH, Bartolomei MS, Blobel GA, Meyer RG, Garcia BA, et al. Characterization of BRD4 during mammalian postmeiotic sperm development. *Mol Cell Biol.* 2015;35(8):1433–48.
 58. Pezic D, Manakov SA, Sachidanandam R, Aravin AA. piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. *Genes Dev.* 2014;28(13):1410–28.
 59. Goudarzi A, Zhang D, Huang H, Barral S, Kwon OK, Qi S, Tang Z, Buchou T, Vitte AL, He T, et al. Dynamic competing histone H4 K5K8 acetylation and butyrylation are hallmarks of highly active gene promoters. *Mol Cell.* 2016;62(2):169–80.
 60. Flynn EM, Huang OW, Poy F, Oppikofer M, Bellon SF, Tang Y, Cochran AG. A subset of human bromodomains recognizes butyrylsine and crotonyllysine histone peptide modifications. *Structure.* 2015;23(10):1801–14.
 61. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1839(3):155–68.
 62. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(50):21931–6.
 63. Tu S, Shin Y, Zago WM, States BA, Eroshkin A, Lipton SA, Tong GG, Nakanishi N. Takusan: a large gene family that regulates synaptic activity. *Neuron.* 2007;55(1):69–85.
 64. Ellis PJ, Bacon J, Affara NA. Association of Sly with sex-linked gene amplification during mouse evolution: a side effect of genomic conflict in spermatids? *Hum Mol Genet.* 2011;20(15):3010–21.
 65. Helleu Q, Gerard PR, Montchamp-Moreau C. Sex chromosome drive. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(2):a017616.
 66. Spiess AN, Walther N, Muller N, Balvers M, Hansis C, Ivell R. SPEER—a new family of testis-specific genes from the mouse. *Biol Reprod.* 2003;68(6):2044–54.
 67. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M, et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol.* 2009;7(5):e1000112.
 68. Chang TC, Yang Y, Retzel EF, Liu WS. Male-specific region of the bovine Y chromosome is gene rich with a high transcriptomic activity in testis development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(30):12373–8.
 69. Skinner BM, Lachani K, Sargent CA, Yang F, Ellis P, Hunt T, Fu B, Louzada S, Churcher C, Tyler-Smith C, et al. Expansion of the HSFY gene family in pig lineages: HSFY expansion in suids. *BMC Genom.* 2015;16:442.
 70. Hammoud SS, Low DH, Yi C, Carrell DT, Guccione E, Cairns BR. Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell Stem Cell.* 2014;15(2):239–53.
 71. Erkek S, Hisano M, Liang CY, Gill M, Murr R, Dieker J, Schubeler D, van der Vlag J, Stadler MB, Peters AH. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(7):868–75.
 72. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26(5):589–95.
 73. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 2008;9(9):R137.
 74. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178–92.
 75. Dobin A, Gingeras TR. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Curr Protoc Bioinform.* 2015;51:11.14.1–19.
 76. Liao Y, Smyth GK, Shi W. FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923–30.
 77. Barlow AL, Benson FE, West SC, Hulten MA. Distribution of the RAD51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J.* 1997;16:5207–15.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Résultats

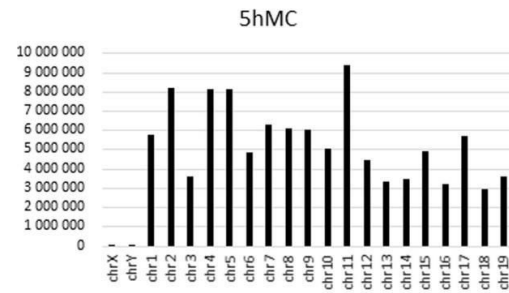
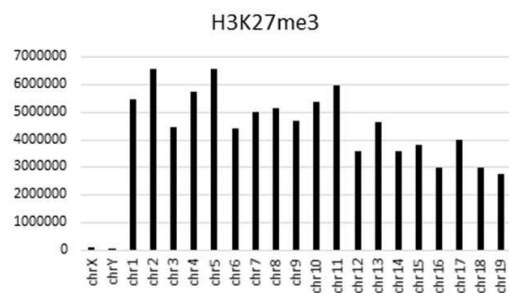
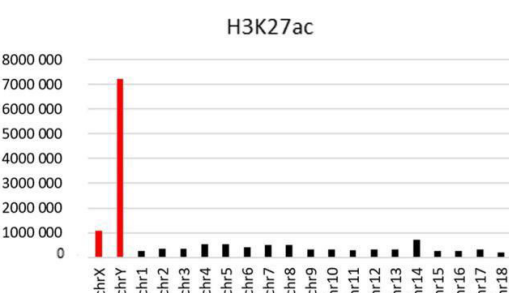
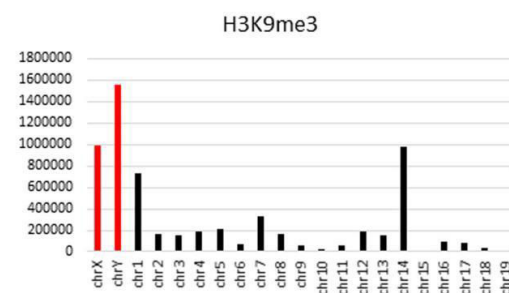
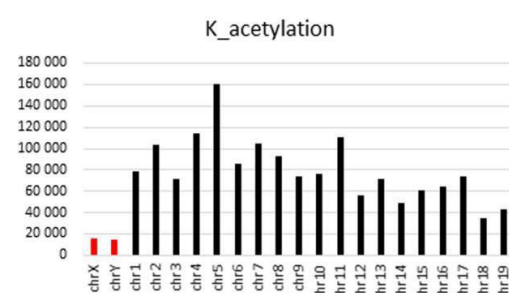
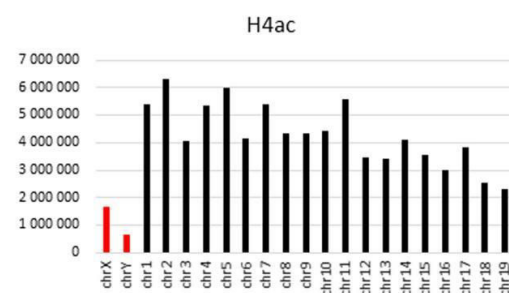
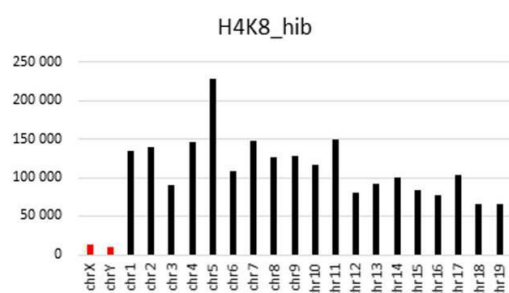
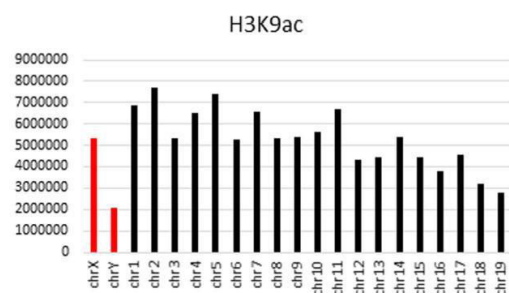
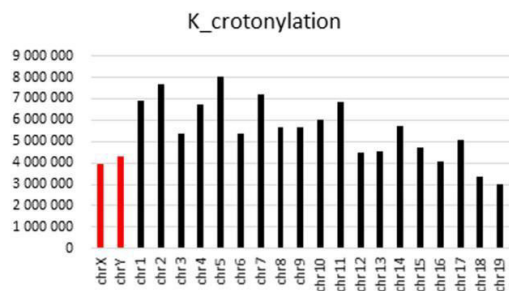
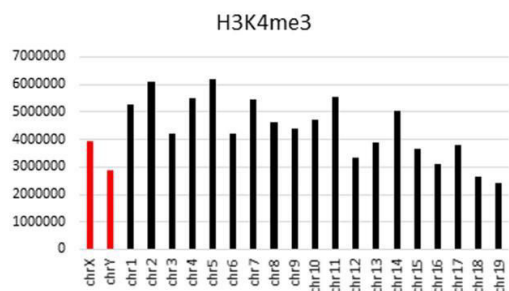
Chromosomes	X	Y	1	2	3	4	5	6	7	8
Length (Mb) including gaps	171	92	195	182	160	157	152	150	145	129
Nber of Genes	2607	1570	3431	3751	2891	2863	3250	2348	3472	1786
Nber of Genes expressed at some time during spermatogenesis	1310	358	1723	2119	1451	1763	1932	1207	1799	1239
% of Genes expressed at some point of spermatogenesis	50,25	22,80	50,22	56,49	50,19	61,58	59,45	51,41	51,81	69,37
p value of χ^2 test for X chromosome versus autosomes (% of expressed genes)		6,77E-69	9,81E-01	9,04E-07	9,65E-01	3,32E-17	1,97E-12	4,16E-01	2,27E-01	1,74E-36
p value of χ^2 test for Y chromosome versus autosomes (% of expressed genes)	6,77E-69		1,91E-74	8,37E-112	8,06E-71	6,88E-135	5,63E-126	9,30E-72	7,82E-83	5,10E-160

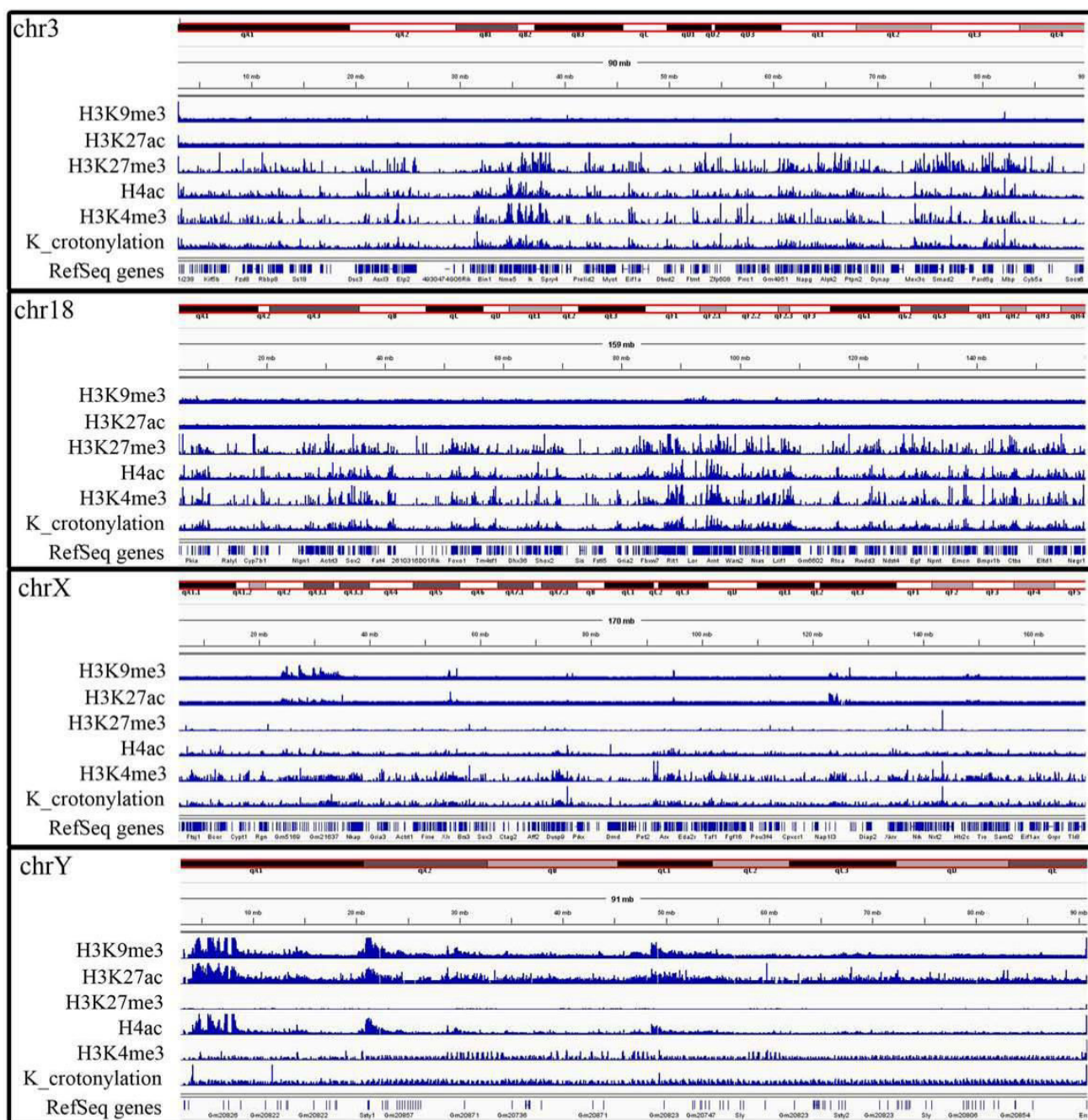
Table 1. Mouse chromosome statistics (from mm10/GRC38 Ensembl gene 81)

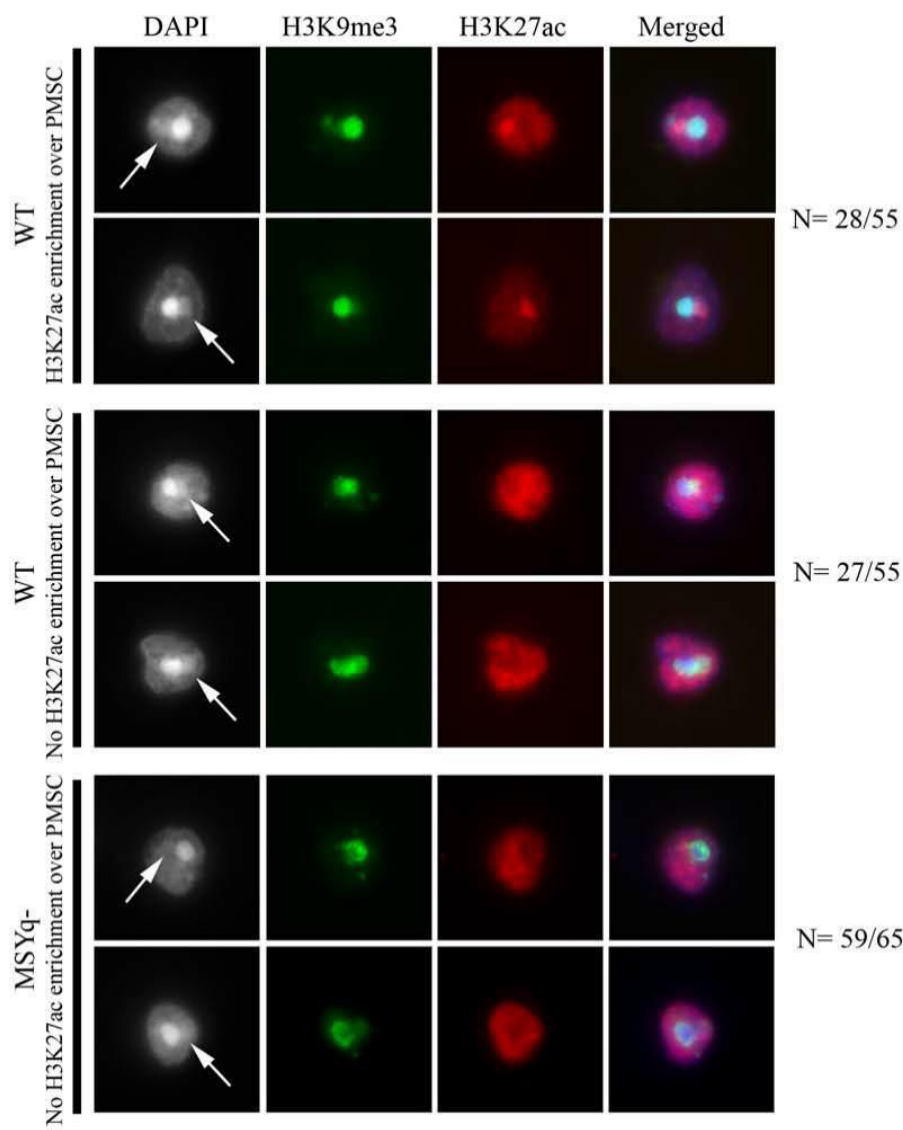
9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Autosomes
125	131	122	120	120	125	104	98	95	91	61	
2171	1619	2985	1536	1516	1792	1266	1174	1717	888	1036	
1355	1064	2024	826	919	1040	897	736	1159	584	717	
62,41	65,72	67,81	53,78	60,62	58,04	70,85	62,69	67,50	65,77	69,21	59,04
3,47E-17	6,61E-23	1,22E-40	2,82E-02	1,17E-10	3,64E-07	5,85E-34	5,12E-20	3,43E-29	1,10E-15	2,73E-25	
2,91E-127	3,08E-131	1,17E-183	1,21E-70	6,75E-101	5,27E-95	1,14E-144	5,65E-114	2,09E-145	2,49E-98	1,24E-122	

coverage per chromosome (normalized to chromosome length)										
	H3K4me3	K_crotonylation	H3K9me3	H3K27me3	H3K9ac	H3K27ac	H4K8_hib	H4ac	K_acetylation	5hMC
chrX	<u>0,023</u>	<u>0,023</u>	<u>0,0058</u>	<u>0,00068</u>	0,031	<u>0,006</u>	<u>0,00008</u>	<u>0,010</u>	<u>0,00009</u>	<u>0,0005</u>
chrY	0,031	0,047	<u>0,0170</u>	<u>0,00027</u>	<u>0,023</u>	<u>0,079</u>	<u>0,00011</u>	<u>0,007</u>	<u>0,00016</u>	<u>0,0005</u>
chr3	0,026	0,034	0,0010	0,02800	0,033	0,002	0,00056	0,025	0,00045	0,0228
chr6	0,028	0,036	0,0004	0,02949	0,035	0,003	0,00072	0,028	0,00057	0,0324
chr14	0,040	0,046	<u>0,0078</u>	0,02884	0,043	<u>0,006</u>	0,00080	0,033	0,00039	0,0278
chr16	0,031	0,042	0,0009	0,03061	0,039	0,003	0,00079	0,031	0,00066	0,0325
chr18	0,029	0,037	0,0004	0,03299	0,035	0,002	0,00073	0,028	0,00039	0,0324
genome	0,033	0,042	0,0023	0,032	0,040	0,006	0,00081	0,031	0,00057	0,0380
All chromosomes										
mean	0,034	0,043	0,0024	0,033	0,040	0,007	0,0008	0,031	0,00058	0,039
SD	0,006	0,008	0,0039	0,012	0,007	0,017	0,0003	0,009	0,00022	0,018
95% CI max value	0,045	0,058	0,0100	0,057	0,054	0,039	0,0014	0,049	0,00102	0,075
95% CI min value	0,023	0,028	-0,0053	0,009	0,027	-0,026	0,0002	0,013	0,00014	0,003
Autosomes only										
mean	0,034	0,044	0,0014	0,036	0,042	0,003	0,0009	0,033	0,00063	0,043
SD	0,005	0,007	0,0018	0,006	0,006	0,001	0,0002	0,005	0,00018	0,014
95% CI max value	<u>0,045</u>	<u>0,056</u>	<u>0,0049</u>	<u>0,048</u>	<u>0,053</u>	<u>0,005</u>	<u>0,0013</u>	<u>0,044</u>	<u>0,00097</u>	<u>0,070</u>
95% CI min value	<u>0,024</u>	<u>0,031</u>	<u>-0,0021</u>	<u>0,024</u>	<u>0,031</u>	<u>0,001</u>	<u>0,0005</u>	<u>0,023</u>	<u>0,00028</u>	<u>0,016</u>

Additional file 1







Additional file 5: Analysis of expressed genes for X and Y chromosomes throughout spermatogenesis

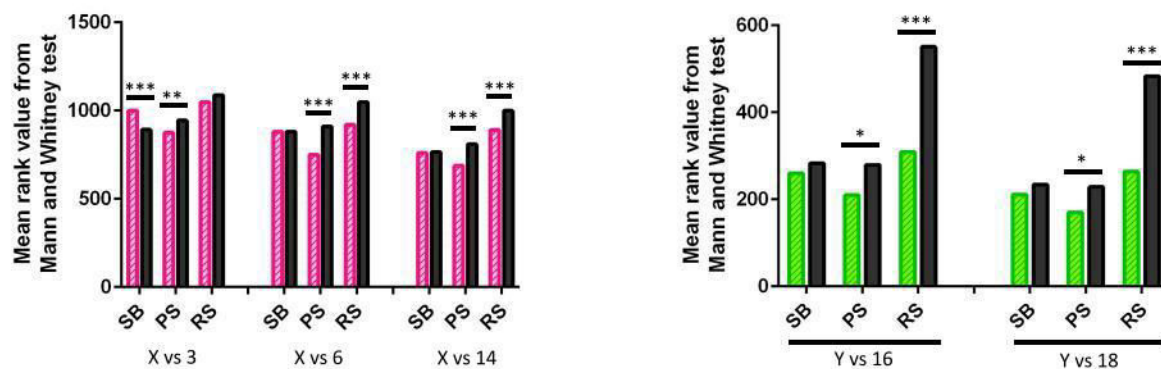
p value of χ^2 test for X chromosome vs autosomes	Y	3	6	14
For spermatogonia B cells	1.83E-88	4.67E-01	6.06E-03	1.74E-03
For pachytene stage cells	6.69E-76	2.13E-06	7.89E-07	9.74E-02
For round spermatids cells	3.95E-08	7.20E-01	2.40E-01	4.75E-05
For elongating cells	1.59E-04	2.86E-01	5.02E-01	9.58E-04

p value of χ^2 test for X chromosome stages	
For SB vs PS	1.65E-03
For PS vs RS	1.10E-17
For SB vs RS	4.80E-08
For RS vs ES	5.64E-02

p value of χ^2 test for Y chromosome vs autosomes	16	18
For spermatogonia B cells	1.29E-87	6.02E-86
For pachytene stage cells	3.02E-90	7.03E-87
For round spermatids cells	1.30E-03	8.88E-06
For elongating cells	4.14E-02	7.43E-03

p value of χ^2 test for Y chromosome stages	
For SB vs PS	3.96E-01
For PS vs RS	9.90E-111
For SB vs RS	2.49E-106
For RS vs ES	7.91E-03

Additional file 6: Mann and Whitney test on the RPKM values of X and Y chromosomes throughout spermatogenesis



SB	p
X vs 3	<.0001
X vs 6	0.5
X vs 14	0.3974

PS	p
X vs 3	0.0032
X vs 6	<.0001
X vs 14	<.0001

RS	p
X vs 3	0.0643
X vs 6	<.0001
X vs 14	<.0001

SB	p
16 vs Y	0.2297
18 vs Y	0.1841

PS	p
16 vs Y	0.0188
18 vs Y	0.0162

RS	p
16 vs Y	<.0001
18 vs Y	<.0001

Additional file 7: χ^2 test on the number of PS repressed genes and PS repressed genes that are not reactivated in RS for X and Y chromosomes

p value of χ^2 test for X chromosomes vs autosomes	Y	3	6	14
For the proportion of pachytene repressed genes	7.62E-02	1.22E-50	2.25E-46	2.15E-33
For the proportion PS repressed genes that are not reactivated in RS	4.20E-01	5.64E-01	5.83E-02	6.55E-09
p value of χ^2 test for Y chromosomes vs autosomes...	16	18		
For the proportion of pachytene repressed genes	2.24E-07	1.20E-06		
For the proportion PS repressed genes that are not reactivated in RS	7.46E-02	2.58E-01		

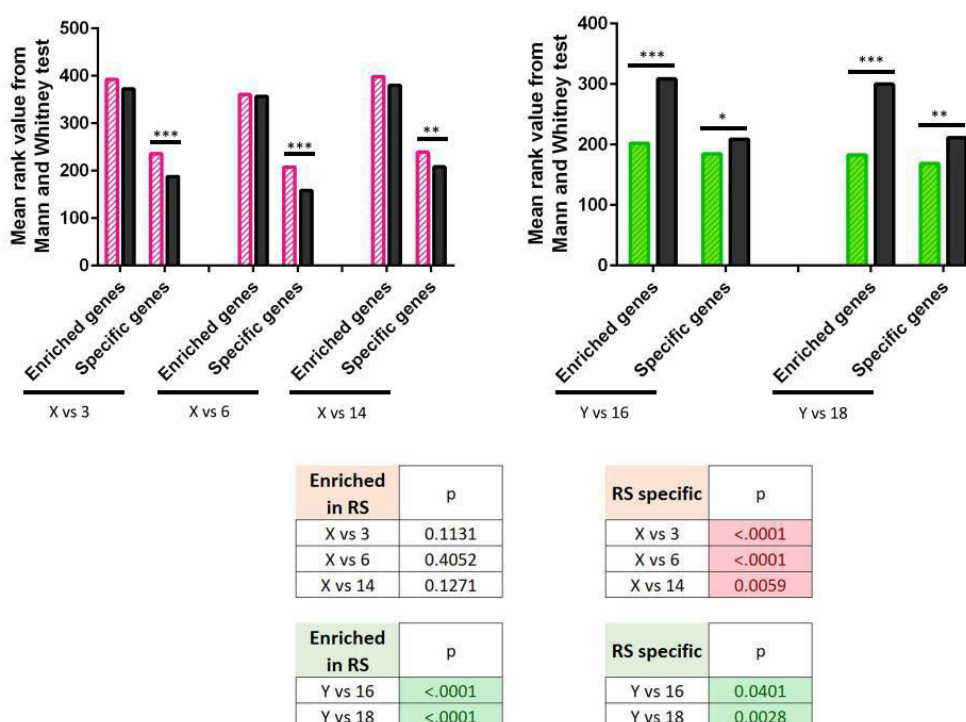
Additional file 8: χ^2 test on the number of genes enriched in RS and RS specific genes for X and Y chromosomes and chromosome 14

p value of χ^2 test for X chromosome vs autosomes	Y	3	6	14
For the proportion of genes enriched in RS	6.89E-75	2.15E-03	2.24E-02	2.20E-03
For the proportion of RS specific genes	3.91E-118	6.26E-06	4.12E-08	7.28E-01
p value of χ^2 test for Y chromosome vs autosomes	16	18		
For the proportion of genes enriched in RS	7.40E-78	9.09E-75		
For the proportion of RS specific genes	1.00E-124	5.76E-119		
p value of χ^2 test for chromosome 14	10			
For the proportion of genes enriched in RS	1.94E-12			
For the proportion of RS specific genes	1.02E-12			

Additional file 9: Analysis of single copy genes and collapsed multicopy gene family of the sex chromosomes.

a. X-linked genes	Single copy genes	Multicopy gene family	% of expressed genes
<i>Expressed at some point during spermatogenesis</i>	1140	50	49,17
<i>Expressed in spermatogonia B cells</i>	806	32	70,42
<i>Expressed in pachytene stage cells</i>	726	35	63,95
<i>Expressed in round spermatids cells</i>	855	48	75,88
<i>Enriched in RS</i>	308	48	29,92
<i>RS specific</i>	176	21	16,55
p value of χ^2 test for X chromosome vs autosomes	3	6	
For spermatogonia B cells	3,83E-01	2,42E-01	
For pachytene stage cells	6,16E-04	2,28E-04	
For round spermatids cells	2,78E-01	6,44E-02	
For genes enriched in RS	7,11E-03	5,19E-02	
For RS specific genes	4,07E-03	8,40E-05	
b. Y-linked genes	Single copy genes	Multicopy gene family	% of expressed genes
<i>Expressed at some point during spermatogenesis</i>	12	4	94,12
<i>Expressed in spermatogonia B cells</i>	8	1	56,25
<i>Expressed in pachytene stage cells</i>	8	1	56,25
<i>Expressed in round spermatids cells</i>	10	4	87,50
<i>Enriched in RS</i>	3	3	37,50
<i>RS specific</i>	3	3	37,50
p value of χ^2 test for Y chromosome vs autosomes	3	6	
For spermatogonia B cells	1,58E-01	1,05E-01	
For pachytene stage cells	1,79E-01	1,40E-01	
For round spermatids cells	6,27E-01	4,14E-01	
For genes enriched in RS	2,37E-01	1,81E-01	
For RS specific genes	8,22E-04	6,86E-05	
c. Y-linked genes multicopy gene family	RPKM mean in RS	RPKM sum in RS	
<i>Sly</i> (32 out of 126 copies)	1,16	37,09	
<i>Ssty1/2</i> (28 out of 306 copies)	0,92	25,91	
<i>Rbmy</i> (9 out of 30 copies)	3,32	29,92	
<i>Srsy</i> (zero out of 197 copies)			

Additional file 10: Mann and Whitney test on the RPKM values of enriched genes in RS and RS-specific genes of X and Y chromosome



Additional file 11: List of the round spermatid specific genes of the chromosome 14

Gm2888	Gm8024	Gm3072	Gm25517	Gm9780
Gm10340	Gm17124	Gm3676	4930444M15Rik	Slmapos2
Gm5795	Gm5929	Gm8065	1700108F19Rik	mmu-mir-6947
Gm10413	Gm3008	Gm8068	Zfp957	1700087M22Rik
Gm3012	Gm10377	Gm7929	Gm25115	Colq
Gm3002	Gm21977	Gm7980	Cdhr1	Slc18a3
Gm3095	Gm10376	Gm6401	1700120O09Rik	3425401B19Rik
Gm3099	Gm8094	Gm3543	4930596D02Rik	1810011H11Rik
Gm8108	Gm8122	Gm2930	Gm7853	Fam170b
Gm3127	Gm8127	Gm7991	4930474N05Rik	Gm26228
Gm3138	1700001F09Rik	1700091H14Rik	Pnma2	Gm5460
Gm3159	Gm8138	Gm7951	4930578I07Rik	Gm7945
Gm3182	Gm17654	Gm17027	Gm27647	Gm6482
Gm3030	Gm10375	Gm3573	Antxrl	Gm7954
Gm8159	Gm8046	Gm17026	A630023A22Rik	Gm3486
Gm7876	Gm8165	Gm9611	Gm17116	Gm7970
Gm9602	Gm16506	Gm8005	Chrna2	4930438E09Rik
Gm3269	Gm8180	Gm8020	Gm37034	Gm10860
Gm3264	Ear-ps8	Pcdh9	Gzmd	Gm31748
Gm3278	Gm16545	4921530L21Rik	Gzmg	Gm16549
Gm3298	Gm3327	Gm15515	Gzmn	4930564B18Rik
4930555G01Rik	Gm8212	4930517O19Rik	Gjb6	Gm3715
Gm3339	Gm8220	Slain1os	4930563I02Rik	Gm3727
Gm3542	Gm8229	4930449E01Rik	Amer2	Gm3752
Gm8246	Gm8232	Mir6390	Arl11	Gm3558
Gm3187	BC061237	1700128A07Rik	1700109G14Rik	Dnase1l3
Gm9603	Gm8247	Slitrk1	Gm27928	Fhitos
Gm3424	Gm8256	4930505G20Rik	Blk	Gm3848
Gm17158	Gm21754	Gm26791	Gm21430	Gm8582
Gm3242	Gm16976	1700044C05Rik	4930578I06Rik	Gm9637
Gm8206	Gm10101	Gm27198	Prss55	Dusp13
Gm26991	1700011H14Rik	1700006F04Rik	Prss51	Gm17175
Gm21560	Olfr731	Hs6st3	4930471C04Rik	Gm17174
Gm16440	Olfr732	Gm17613	Prss52	Gm17078
Gm3594	Olfr733	Zic5	E330034G19Rik	Gm4181
Gm8356	Gm21718	2610528A11Rik	4930542C16Rik	Gm17079
Gm3642	Gm3719	Nrg3os	4931403M11Rik	Gm5800
Gm6356	Vmn2r88	Gm20642	4930428N03Rik	AY358078
Gm6676	Vmn2r-ps111	1700109I08Rik	1700054O19Rik	Olfr1508
Gm16434	Gm7247	Sh2d4b	Anxa11os	Olfr1507
				Mhrt

Additional file 12 - 1/2**RNA-Seq analyses**

datasets from [47]

Mapping with STAR 2.4.2a [75] on Mouse Genome version GRCm38 mm10.

Command line: `STAR --outSAMstrandField intronMotif --outFilterMismatchNmax 2 --outFilterMultimapNmax 10 --genomeDir $Starindex --readFilesIn $File1 --runThreadN $threads --outSAMunmapped Within --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --outStd BAM_SortedByCoordinate --genomeLoad NoSharedMemory --chimSegmentMin 15 --limitBAMsortRAM $starlimitRAM`

FPKM count using FeatureCounts (Subread package version 1.4.6-p5) [76]

Command line: `featureCounts -a Mus_musculus.GRCm38.81.gtf -o counts.txt -A chrnames.txt -t exon -g gene_id --primary -T 30 GSM860181.bam GSM860182.bam GSM860183.bam GSM860184.bam GSM860185.bam GSM860186.bam GSM860187.bam GSM860188.bam`

Sample	cell type	Number of reads	Uniquely mapped reads number	Number of reads mapped to multiple loci	Number of reads mapped to too many loci	% of unmapped reads	% of mapped reads
GSM860181	prSG-A	46 531 667	36 259 756	4 731 871	217 517	0,5%	99,5%
GSM860182	SG-A	40 616 823	32 616 138	3 698 384	176 306	0,4%	99,6%
GSM860183	SG-B	30 856 488	24 464 384	2 801 768	125 578	0,4%	99,6%
GSM860184	lepSC	39 869 596	31 960 883	3 334 547	144 071	0,4%	99,6%
GSM860185	pacSC	32 436 551	26 541 732	2 453 985	84 493	0,3%	99,7%
GSM860186	rST	38 101 736	31 668 437	2 022 790	101 116	0,3%	99,7%
GSM860187	eST	30 363 718	25 706 211	1 562 476	63 762	0,2%	99,8%
GSM860188	SE	36 991 035	30 380 459	3 444 961	158 240	0,4%	99,6%

Additional file 12 - 2/2**ChIP-Seq analyses**

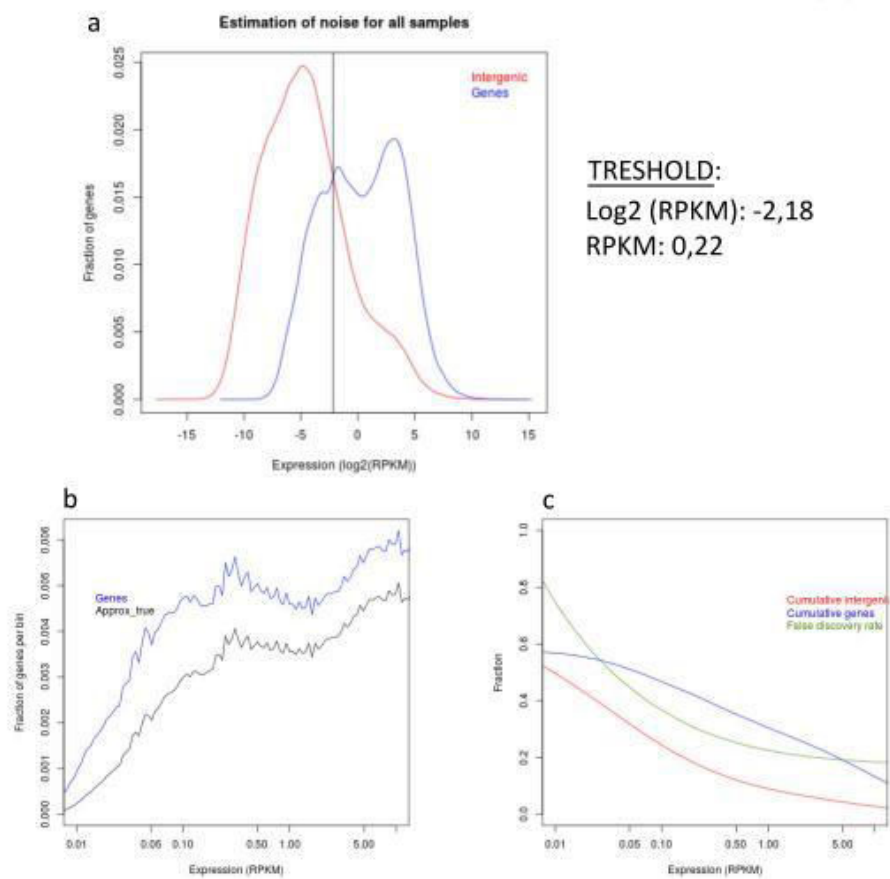
Mapping with Heng Li Burros-Wheeler aligner BWA [72] version 0.7.5a-r405 with "mem" command against Mouse Genome version GRCm38 mm10

Command line: `bwa mem -t 6 ref_mouse.fa sample.fastq`

Peak calling using MACS [73] v1.4

Command line: `macs14 -t chip_sample.bam -c input_sample.bam -f BAM -g mm -n MACS_sample_mem`

Sample ID (NCBI)	Mark	Number of reads	Number of peaks	% of mapped reads	Reference
GSM1046840-GSM1046841	H3K4me3 (duplicate)	40783145-225974316	32058-40767	78,92-89,84%	[71]
GSM1046842-GSM1046843	H3K27me3 (duplicate)	33620246-225140169	30472-38805	83,11%-93,42%	[71]
GSM810678	K_crotonylation	133 523 062	40 211	80,67%	[39]
GSM810677	K_acetylation	51 481 906	7 099	84,08%	[39]
GSM810676	Corresponding Input file	43 928 317	N/A	82,34%	[39]
Courtesy of S. Rousseaux	H4K8_hib	26 649 536	14 908	91,70%	[41]
Courtesy of S. Rousseaux	Corresponding Input file	31 177 064	N/A	95,25%	[41]
GSM1519003	H3K9me3	84 339 867	11 659	90,34%	[57]
GSM1519004	H3K9ac	67 856 707	47 333	92,04%	[57]
GSM1519009	H4ac	70 049 830	44 966	93,37%	[57]
GSM1519010	Corresponding Input file	54 990 464	N/A	94,38%	[57]
SRR948811/GSM1202715	H3K27ac	245 489 610	123 434	64,51%	[70]
SRR948814/GSM1202718	ShMC	52 517 270	125 719	96,79%	[70]
SRR948825/GSM1202725	Corresponding Input file	153 674 411	N/A	81,15%	[70]



Article n°3 : SLY interacts with TBL1XR1 and regulates genes involved in chromatin remodeling during sperm differentiation

Comment SLY régule-t-il l'expression de plus d'une centaine de gènes pendant la spermiogenèse ? Comment expliquer les anomalies de compaction observées dans les souris Sly-KD ? Afin de répondre à ces questions, nous avons mis en place deux approches différentes : 1) des co-immunoprécipitations suivies d'analyses en spectrométrie de masse pour déterminer les partenaires de SLY, 2) des immunoprécipitations de la chromatine suivies de séquençage à haut-débit pour établir la liste des gènes cibles de SLY.

Nous avons découvert que SLY interagit avec TBL1XR1, un membre du complexe répressif Ncor/SMRT. Trois autres membres de ce complexe ont également été mis en évidence grâce à l'analyse en spectrométrie de masse. Ce complexe, très conservée chez l'Homme, qui n'a pas encore étudié dans le contexte de la spermiogenèse, est très probablement responsable de l'action répressive de SLY.

Nous avons également mis en évidence que SLY régule des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine. Nos données suggèrent un lien entre H3K79me2 et H4Ac. La baisse quantitative de ces marques est associée avec une forte rétention des histones dans les spermatozoïdes Sly-KD et une plus grande sensibilité de l'ADN au stress oxydatif.

Finalement, ces travaux ont permis d'identifier des nouveaux facteurs à l'origine des anomalies de la compaction et de la dérégulation des gènes des chromosomes sexuels dans les souris WT et Sly-KD.

*N.B. Cet article a été soumis au journal *Cell Death & Differentiation*.*

1

2 **SLY interacts with TBL1XR1 and regulates genes involved in chromatin remodeling during**
3 **sperm differentiation**

4

5 **Running title: SLY controls sperm chromatin reorganization**

6

7 Charlotte Moretti^{1,2,3,*}, Maria-Elisabetta Serrentino^{1,2,3*}, Côme Ialy-Radio^{1,2,3}, Marion Delessard^{1,2,3},
8 Tatiana Soboleva⁴, Frederic Tores⁵, Marjorie Leduc⁶, Patrick Nitschké⁵, Joel R Drevet⁷, David
9 Tremethick⁴, Daniel Vaiman^{1,2,3}, Ayhan Kocer⁷, and Julie Cocquet^{1,2,3,8}

10

11

12 1 INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France;

13 2 CNRS, UMR8104, Paris, France;

14 3 Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine, Paris, France

15 4 The John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, PO Box 334,

16 Canberra, ACT 2601, Australia

17 5 Bioinformatics facility, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris,

18 France

19 6 3P5 proteomic facility, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris,

20 France.

21 7 Genetic Reproduction and Development, CNRS UMR6293–INSERM U1103–Clermont Université,

22 63178 Aubière Cedex, France

23 8 Corresponding author: julie.cocquet@inserm.fr

24

25 *These authors contributed equally to the work

26

27

Abstract

Sperm differentiation requires unique transcriptional regulation and chromatin remodeling after meiosis to ensure proper compaction and protection of the paternal genome. Abnormal sperm chromatin remodeling can induce sperm DNA damage, embryo lethality and male infertility, yet, little is known about the factors which regulate this process.

Deficiency in *Sly*, a mouse Y chromosome-encoded gene expressed only postmeiotically, has been shown to result in the deregulation of hundreds of genes associated with multiple sperm differentiation defects and subsequent male infertility. The underlying mechanism remained, to date, unknown. Here, we show that SLY interacts with the transcriptional regulator TBL1XR1 and other members of the SMRT/N-CoR repressor complex. We also demonstrate that SLY is a regulator of sperm chromatin remodeling, and binds to the promoter of genes highly expressed postmeiotically and involved in chromatin regulation. Specifically, *Sly* knockdown directly induces deregulation of postmeiotic H2A variants and of the H3K79 methyltransferase DOT1L. Altogether the modifications induced by loss of *Sly* alter the postmeiotic chromatin structure and ultimately result in abnormal sperm chromatin remodeling with negative consequences on the sperm genome integrity.

Keywords

Chromatin remodeling, spermatogenesis, sperm differentiation, sex chromosomes, postmeiotic male germ cells, spermatids, sperm DNA oxidation, sperm DNA damage, SLY, TBL1XR1, DOT1L, H3K79 methylation, H2A.B3, H2A.L1, histone modification, male infertility

51 Introduction

52 The postmeiotic phase of spermatogenesis is a fascinating process in term of transcriptional
 53 regulation and chromatin re-organization. Indeed, after meiosis, during which the genetic
 54 material is recombined and then partitioned in haploid cells, round spermatids experience a
 55 dramatic differentiation program characterized by profound morphological changes: elongation,
 56 nucleus condensation and acquisition of new structures such as the acrosome and the flagellum.
 57 In many organisms including mammals, this process involves transcriptional regulation by
 58 several well-characterized master genes expressed in round spermatids, such as *Crem* or *Taf7l*
 59 [for review see (1, 2)]. In total, thousands of genes are expressed in round and early elongating
 60 spermatids (3-6), before the spermatid chromatin is compacted and transcription is progressively
 61 shut down. Several messenger RNAs (mRNAs), in particular those encoding protamines, are
 62 selectively stored to be translated during later stages of spermatid elongation (7) [for review see
 63 (8)].

64 Chromatin compaction is achieved by a transition from a nucleosome-based organization
 65 to a unique genome-packaging structure based on non-histones proteins, called protamines. The
 66 replacement of histones by protamines starts with remodeling of the spermatid chromatin
 67 characterized by incorporation of spermatid-enriched histone variants and post translational
 68 modifications (PTMs) of histone residues, the most predominant of which is histone H4
 69 hyperacetylation. These steps are thought to open the chromatin in order to facilitate the action
 70 of topoisomerases and the removal of histones; then, transition proteins are incorporated and
 71 finally replaced by protamines [for review, see (8)]. In mice, haploinsufficiency of genes coding
 72 for protamines (i.e. *Prm1* or *Prm2*) is sufficient to result in male infertility and leads to sperm DNA
 73 damage and embryo lethality (9, 10); protamines are therefore essential to mammalian fertility
 74 with a function in compaction, as well as protection of the paternal genome until after fertilization.
 75 Little is known about the factors and molecular mechanisms which regulate chromatin
 76 remodeling during sperm differentiation. Studies of mouse genetic models have identified a few
 77 nuclear factors, histone variants and chromatin remodelers required for histone-to-protamine

78 transition, such as BRDT (Bromodomain testis specific) protein (11), histone H2B variant TH2B
79 (12) , and the Chromodomain helicase DNA-binding protein 5, CHD5 (13).

80 We and others have also shown that the mouse Y chromosome long arm (MSYq) encodes
81 genetic information required for normal chromatin compaction during sperm differentiation:
82 males with large deletions of MSYq have severe sperm differentiation defects and produce
83 deformed spermatozoa with poorly compacted chromatin, which are unable to fertilize oocytes *in*
84 *vivo* and *in vitro* (14). *Sly*, a multicopy gene of MSYq region which is only expressed in postmeiotic
85 cells (15, 16), largely contributes to these phenotypes since males with *Sly* specifically knocked-
86 down (*Sly*-KD males) also present abnormal sperm differentiation, including abnormal chromatin
87 compaction and increased sperm DNA damage (16, 17). It has been shown that *Sly* knockdown
88 leads to the upregulation of ~100 sex chromosome-encoded genes in round spermatids but, at the
89 protein level, SLY lacks any conserved domain except for a COR1 region identified in SYCP3, a
90 protein involved in the meiotic synaptonemal complex (15, 18). Therefore, the mechanism by
91 which SLY controls gene expression and the origin of the sperm differentiation defects observed
92 in its absence remain unclear.

93 In the present study, we investigated the molecular function of SLY by performing co-
94 immunoprecipitation followed by mass spectrometry analyses and by chromatin
95 immunoprecipitation followed by high-throughput sequencing (ChIP-Seq). We found that SLY is
96 part of the SMRT/N-CoR complex and directly interacts with TBL1XR1. We also discovered that
97 SLY associates with the transcriptional start sites of thousands of genes expressed
98 postmeiotically, many of which are involved in gene regulation or chromatin remodeling. We
99 focused on SLY-target genes which could be relevant to the chromatin defects observed in *Sly*-
100 deficient sperm, and found that SLY controls the expression of genes coding for spermatid-specific
101 histone variants and for chromatin regulators such as the H3K79 methyl transferase, DOT1L.
102 Finally, we show that *Sly* deficiency leads to changes in the chromatin composition just prior to
103 histone removal, which impact on histone-to-protamine exchanges and, ultimately, on sperm
104 chromatin content and function, as well as on its genome integrity.

105 Altogether our data identify for the first time the molecular role of SLY and link the sperm
106 chromatin compaction phenotype observed in *Sly*-deficient males to molecular pathways
107 important for chromatin remodeling during sperm differentiation, in particular, the regulation of
108 H3K79 methylation.
109

110 **RESULTS**111 **SLY marks the sperm differentiation genetic program**

112 To investigate the molecular mechanism by which SLY controls postmeiotic gene expression, we
 113 performed ChIP-Seq analyses on purified round spermatids from wild-type (WT) males with anti-
 114 SLY antibody. We found that SLY protein preferentially binds to the start of genes, in the 1kb
 115 region surrounding the transcription start site (TSS) and, overall, occupies the TSS of ~16% of
 116 mouse genes (6,381 genes with SLY at TSS, 7,280 genes with SLY at +/- 1 kb of TSS) (Figure 1A,
 117 Supplementary Figure 1A, Table 1). No particular bias towards the sex chromosomes was
 118 observed (Figure 1B and Supplementary Figure 1B). ChIP followed by real time PCR (ChIP-qPCR)
 119 confirmed the ChIP-Seq results (Figure 1C). Strikingly, comparison with published RNAseq data
 120 (6, 19) showed a strong correlation between SLY-genomic targets and genes expressed in round
 121 spermatids (~89% vs. 41% of all mouse genes, χ^2 , $p < 0.0001$) (Figure 1D, E), and more specifically
 122 with a high expression level (91% of SLY-associated genes are among the 50% most expressed
 123 genes, χ^2 , $p < 0.0001$; 36% among the 10% most expressed genes, χ^2 , $p < 0.0001$). Interestingly, SLY
 124 was found to bind to the TSS of master genes of spermatid transcriptional regulation such as *Crem*,
 125 *Creb1*, *Crebbp*, *Kif17*, *Taf7l*, *Terf2*, *Tbpl1*, *Papalb*, *Piwil1* or *Brd4* (1, 2, 20). SLY presence appears as
 126 an excellent marker of genes essential to the spermatid differentiation program. This was
 127 confirmed by gene ontology analyses in which one of the most significant hits was “spermatids”
 128 ($p = 1.46 \times 10^{-39}$) (Supplementary Figure 1C). Of note, *Sly* promoter itself is occupied by SLY protein
 129 (Figure 1F).

130 Next, we compared SLY ChIP-Seq data with published ChIP-Seq data of chromatin marks
 131 performed in round spermatids (20-23). SLY profile was found to be very similar to that of active
 132 marks (χ^2 , $p < 0.03$) (Figure 1G, Supplementary Figure 2A), i.e. chromatin marks associated with
 133 the promoter of expressed genes (20, 22, 24, 25), such as H3K4me3 (trimethylation of histone H3
 134 lysine 4), Kcr (histone lysine crotonylation), H3K9ac (acetylation of histone H3 lysine 9), H3K27ac
 135 (acetylation of histone H3 lysine 27) and H4ac (acetylation of histone H4). It also correlates with
 136 BRD4 genomic localization (χ^2 , $p = 0.0015$), which has been shown to be enriched at

spermatogenesis-specific genes (20). On the other hand, it differed significantly from chromatin marks associated with transcriptional repression such as the repressive marks H3K27me3 (trimethylation of histone H3 lysine 27) and H3K9me3 (trimethylation of histone H3 lysine 9) (χ^2 , $p=0.33$ and $p=0.3$ respectively) (Figure 1G, Supplementary Figure 2A). Benayoun et al. have described that broad H3K4me3 regions correlate with a specific cell identity (26). Here, of the broadest H3K4me3 domains of round spermatids, 74% intersect with SLY domains, confirming that SLY is a good marker of sperm differentiation program/spermatid identity (χ^2 , $p=0.0005$) (Figure 1G).

SLY controls the expression of genes involved in transcriptional regulation, chromatin remodeling and the ubiquitin pathway

Gene ontology analyses for molecular and biological functions of the list of 7,280 SLY-bound genes identified by ChIP-Seq revealed a clear enrichment for genes encoding nuclear proteins involved in the regulation of gene expression, chromatin binding, ubiquitin ligase activity, stress, genomic/chromosomal instability and DNA repair pathway (Figure 1H, Supplementary Figure 1C).

To compare SLY ChIP-Seq gene list with the list of genes deregulated in *Sly*-deficient round spermatids (*Sly*-KD), we first re-analyzed our previously published microarray data (16) using the most recent version of the mouse genome (GRCm38/mm10) since it is more complete in term of sequence length and annotation, especially of the Y chromosome, than the previous version GRCm37/mm9 (i.e. in mm9 version, only 15% of the Y chromosome was assembled). Over 400 genes were found deregulated more than 1.5-fold (p -value <0.05), a majority of which are encoded by the sex chromosomes, in agreement with our previous observations (16). Since many of those genes are present in multiple copies in the mouse genome, we included closely related paralogous genes and obtained a total of 752 deregulated genes, again with a strong bias towards X- and Y-encoded upregulated genes (Table 2). Comparison with SLY-associated genes (i.e. the 7,280 SLY ChIP-Seq genes) showed a higher proportion of upregulated genes *versus* downregulated genes

164 (χ^2 , $p=0.005$) (Table 2, Supplementary Figure 2B). When including all 1,171 significantly
 165 deregulated genes (no threshold, $p<0.05$), a higher proportion of autosomal upregulated and
 166 downregulated genes was found and, this time, there were more downregulated than upregulated
 167 genes among the genes enriched in SLY at their TSS (χ^2 , $p=0.012$) (Table 2, Supplementary Figure
 168 2B).

169 Next, we investigated why some autosomal genes had SLY at their TSS and yet were not
 170 found deregulated in Sly-KD round spermatids by microarray. Since real time PCR is a more
 171 sensitive technique than expression microarrays (27), we re-examined by quantitative real time
 172 PCR (RT-qPCR) the expression level of those autosomal genes, focusing on those with the highest
 173 SLY enrichment at their gene start (10% of genes with highest SLY peak, Supplementary Figure
 174 3). In this gene list are several members of the *Speer* gene cluster, multicopy genes of chromosome
 175 14 with yet unknown functions and, interestingly, genes coding for proteins with a known role in
 176 chromatin regulation, such as *Dot1l* which encodes an H3K79 methyl transferase (Figure 2A,
 177 Supplementary Figure 3). By RT-qPCR we found several of those autosomal genes significantly
 178 deregulated (up or downregulated) in Sly-KD spermatids compared to WT spermatids (Figure
 179 2B). With the same approach, we identified additional sex chromosome-encoded genes
 180 significantly upregulated in Sly-KD spermatids such as *Spin2d*, *Gmcl1l*, *Ube2a*, *Kdm5c* and genes
 181 coding for spermatid-specific histone variants, such as *H2afb3*, *H2a1l* (aka *1700012L04Rik*) or
 182 *H1fnt* (Figure 2B, 2C) (8, 28-31). Their closely related paralog *H2afb1* encoded by an autosome, is
 183 not regulated by SLY (Figure 2B, 2C). Since *Sly* knockdown leads to increased transcription of
 184 *H2afb3*, we checked whether it affects H2A.B3 incorporation in the spermatid chromatin by ChIP-
 185 qPCR and found that H2A.B3 level is higher at the TSS of expressed genes in Sly-KD compared to
 186 WT round spermatids (Figure 2D).

187

188 All in all, our data show that sex chromosome-encoded genes, among which are genes
 189 coding for H2A variants, are upregulated in Sly-KD spermatids while autosomal genes are either
 190 up or downregulated.

191

192 ***Sly*-dependent deregulation of the H3K79 histone methyl transferase DOT1L impairs**

193 **H3K79 methylation prior to histone-to-protamine exchange**

194 One of the genes with highest enrichment of SLY at its start is *Dot1l* (Figure 2A) which encodes
 195 the only known H3K79 histone methyl transferase. It is presumed to be important for gene
 196 regulation and chromatin remodeling during sperm differentiation, because high levels of H3K79
 197 methylation precede histone removal during spermatid elongation (32, 33). Besides, analyses of
 198 published RNASeq and microarray data show that *Dot1l* is particularly expressed after meiosis in
 199 mice (Figure 3A) and humans (Figure 3B). Immunofluorescence experiments on postmeiotic male
 200 germ cells of wild-type mice show that DOT1L protein is particularly enriched at the sex
 201 chromatin in round spermatids (post meiotic sex chromatin, PMSC) and appears as nuclear
 202 punctuated signals in step 9 to 11 elongating spermatids (Figure 3C, Supplementary Figure 4).
 203 High H3K79 dimethylation (H3K79me2) levels were also observed in round spermatids and at
 204 the onset of spermatid elongation (step 10 to step 12 elongating spermatids, Supplementary
 205 Figure 5) just prior to histone-to-protamine exchange, as described by (32, 33). Since *Dot1l* is
 206 downregulated in *Sly*-KD spermatids (Figure 2B), we looked at H3K79me2 expression in *Sly*-KD
 207 and WT spermatids. By immunofluorescence, there was a notable decrease in H3K79me2 levels
 208 in step 10 to 12 elongating spermatids from *Sly*-KD males compared to WT elongating spermatids
 209 (Figure 4A, B; Supplementary Figure 5). In parallel, we performed ChIP-qPCR and western blot
 210 quantification on elongating/condensing spermatid fractions. Despite an elevated intra-genotype
 211 variability which is likely due to the heterogeneity of those fractions containing step10-16
 212 spermatids, we confirmed that H3K79 dimethylation is reduced in *Sly*-KD compared to WT
 213 elongating/condensing spermatids (Figure 4C; Supplementary Figure 6A, C). Finally, we observed
 214 by immunofluorescence that H3K79me2 persists in spermatozoa (Figure 4D; Supplementary
 215 Figure 7). Quantification of H3K79me2 revealed that the decrease observed in *Sly*-KD
 216 elongating/condensing spermatids persists in spermatozoa (when normalized to histone H3 level,
 217 see below, and Supplementary Figure 6B and D).

218

219 ***Sly* deficiency leads to reduced histone H4 acetylation prior to histone-to-protamine**
 220 **exchange**

221 Extensive acetylation of histone H4 is a hallmark of chromatin remodeling during spermatid
 222 differentiation and is detected at the same postmeiotic stages than H3K79 dimethylation, just
 223 prior to nucleosome eviction (32, 33). It has recently been demonstrated that DOT1L-mediated
 224 H3K79 dimethylation facilitates histone H4 acetylation (34). We therefore tested whether H4
 225 acetylation (acH4) was impacted by *Sly* deficiency and found reduced level of acH4 in *Sly*-KD
 226 versus WT step 10 to 12 elongating spermatids by immunofluorescence (Figure 5A, B;
 227 Supplementary Figure 8). This was confirmed by ChIP-qPCR analyses in all tested sites (Figure
 228 5C). Together, these data show that *Sly* deficiency affects chromatin remodeling during spermatid
 229 differentiation.

230

231 **Defects in postmeiotic chromatin remodeling lead to a higher proportion of residual**
 232 **histones and increased DNA oxidation in *Sly*-deficient spermatozoa**

233 Approximately 1-5% of histones remain in wild-type (WT) mouse spermatozoa (35). To
 234 determine whether abnormal chromatin marks in elongating spermatids have consequences on
 235 chromatin content in spermatozoa, we next compared the quantity of remaining histones in sperm
 236 and observed a ~2.5 fold increase in histone H3 and a ~2.3 fold increase in TH2B in *Sly*-KD
 237 compared to WT spermatozoa (Figure 6A and 6B). Using antibody against protamine 2 (Hup2B)
 238 we also detected a small (~20%) but significant decrease in the quantity of protamine 2 in *Sly*-KD
 239 compared to WT sperm (Figure 6C). No significant difference was observed for protamine 1 (data
 240 not shown).

241 Finally, we tested whether abnormal chromatin content could alter spermatozoa genome
 242 integrity by measuring the proportion of spermatozoa showing oxidation of their DNA
 243 (measurement of oxidized deoxy-guanosine, 8-oxo-dG). We found an average of ~34% of WT

spermatozoa with 8-oxo-dG staining, as described in other studies (36), and a significant increase to ~53% of 8-oxo-dG positive spermatozoa in Sly-KD epididymis (Figure 6D).

SLY interacts with TBL1XR1 and other members of the nuclear repressor complex

To understand how SLY controls gene expression during sperm differentiation, we searched for its protein partners by co-immunoprecipitation followed by mass spectrometry analyses. We used FLAG antibody to immunoprecipitate SLY and its partners on two types of materials: i) testicular cells from a transgenic mouse model expressing SLY protein fused to a FLAG tag (see Supplementary Figure 9) and ii) a spermatogonia cell line (GC1) transfected with a FLAG-SLY construct. Wild type mouse testes and GC1 cells transfected with an empty vector were used as negative controls. Immunoprecipitated proteins were analyzed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC MS/MS). Two complementary approaches (i.e. MASCOT and label-free quantification Maxquant analysis) were used to analyze LC MS/MS data. They showed that TBL1XR1 and several other members of the SMRT/N-CoR repressive complex, i.e. TBL1X, NCOR1 and HDAC3, were specifically immunoprecipitated with SLY (Table 3). Interaction of SLY and TBL1XR1 was confirmed in wild type and FLAG-SLY transgenic testes by western blot following immunoprecipitation using anti-SLY antibody, anti-FLAG antibody or anti-TBL1XR1 antibody (Figure 7).

264

265 **DISCUSSION**

266 In the present paper, we investigated the molecular role of SLY and the consequences of its
 267 absence on chromatin structure; based on acquired data we identified novel regulators of
 268 postmeiotic gene expression and of chromatin remodeling during mammalian sperm
 269 differentiation.

270 **SLY and the regulation of postmeiotic gene expression**

271 Firstly, we found that SLY protein is present at the TSS of thousands of genes relevant to
 272 postmeiotic cell identity, with a known role during postmeiotic differentiation and/or
 273 significantly upregulated postmeiotically. We also showed that SLY overlaps with chromatin
 274 marks associated with gene expression, such as H3K4me3 or histone lysine crotonylation, Kcr.
 275 Comprehensive transcriptome analyses of *Sly*-deficient postmeiotic germ cells demonstrated that
 276 *Sly* deficiency does not switch on genes normally silent in postmeiotic cells but rather modulates
 277 the expression level of >1,000 genes expressed postmeiotically. *Sly* deficiency chiefly induces
 278 upregulation of XY genes (37% of all significantly deregulated genes) with no XY gene found
 279 downregulated, while hundreds of autosomal genes are either upregulated or downregulated
 280 (respectively 30% and 33% of all significantly deregulated genes). The consequences of *Sly*
 281 deficiency on postmeiotic gene expression are therefore different for XY genes compared to
 282 autosomal genes, suggesting distinct regulatory mechanisms, probably due to a different
 283 chromatin environment. Indeed, postmeiotically, the XY chromatin significantly differs from that
 284 of autosomes as a consequence of the meiotic silencing of sex chromosomes [for review see (37,
 285 38)].

286 How does SLY control gene expression? Despite the fact that SLY is related to SYCP3, a
 287 protein of the meiotic synaptonemal complex which has been proven to bind double-stranded
 288 DNA (15, 18, 39), the mechanism by which SLY regulates genes remained elusive. Indeed, SLY-
 289 SYCP3 conservation is relatively low (28% of identity) and SLY, contrary to SYCP3, is very acidic
 290 (with an isoelectric point ~ 4.8); this most likely precludes direct DNA binding and rather suggests

that SLY is part of a protein complex able to recruit regulators of gene expression, including proteins with DNA binding domains. In that respect, our findings that SLY interacts with TBLX1R1 and other members of the SMRT/N-CoR complex provide a very interesting trail to further investigate. This complex, expressed in many tissues, contains five proteins (i.e. NCOR1, HDAC3, GPS2, TBLX1R1 and TBLX1) and has been shown to interact with other proteins such nuclear hormone receptors, transcription factors or chromatin modifying enzymes (40-43). Nuclear receptors and transcription factors can fulfil their function by recruiting co-activator and co-repressor complexes; the balance between those complexes defines gene transcription levels. TBLX1R1 and its homolog TBLX1 are known as core components of the SMRT/N-CoR co-repressor complex but also as nuclear co-repressor exchange (NCoEx) factors (44). The recruitment and release of SMRT/N-CoR complex on repressed gene promoters is a dynamic process (44, 45) on which SLY could act to limit the expression of hundreds of genes. Further studies will be required to precisely determine the impact of SLY and the composition of the SMRT/N-CoR complex in the context of sperm differentiation.

By gene ontology analyses, we showed that many of SLY-target genes are involved in gene regulation, chromatin modification and the ubiquitin pathway. Focusing on genes involved in chromatin structure and regulation, we found that SLY directly regulates the expression of sex chromosome-encoded H2A variants and of the histone methyl transferase DOT1L, which is a very promising candidate for the chromatin remodeling defects observed in Sly-KD postmeiotic cells (see below).

The X and Y chromosome encode several H2A variants, all of which are particularly, if not specifically, expressed in male postmeiotic germ cells, whether in round and/or in elongating spermatids (8, 28-30). We found that all of them are upregulated in Sly-KD vs. WT round spermatids. Among them is H2A.B3, a H2A variant enriched at the start of active genes in spermatids (28) which we found more incorporated in Sly-KD than in WT spermatid chromatin by ChIP-qPCR. Several other genes/gene clusters encoding histones are also targets of SLY (that is, enriched in SLY at their TSS and deregulated when *Sly* is knocked-down), such as *Hist1h3* and

318 *Hist1h4* clusters (16), *H1fnt*, etc. These changes in histone levels likely induce modifications in the
 319 spermatid chromatin structure and, as such, could contribute to the gene deregulation and
 320 abnormal chromatin remodeling observed during the sperm differentiation of *Sly*-deficient males.

321 It is quite intriguing that SLY controls the expression of essential and evolutionary
 322 conserved genes but is itself not conserved throughout evolution (16, 46, 47). Indeed, *Sly* has been
 323 shown to be involved, together with its X-linked homolog *Slx*, in an intragenomic conflict in which
 324 an unbalanced number of *Sly* versus *Slx* gene copies leads to transmission distortion (48). Our
 325 observation that SLY regulates chromatin components can be placed in the context of the
 326 evolution of transmission distorters which are often involved in gene and/or chromatin
 327 regulation processes (49). It will be interesting to determine whether SLX protein can also directly
 328 act on the same set of genes, and if it interacts with the same protein complex.

329

330 **SLY and chromatin remodeling during sperm differentiation**

331 We particularly investigated *Dot1l* and the consequence of its downregulation, as it
 332 appears to be an interesting new candidate gene involved in spermatid chromatin remodeling and
 333 histone-to-protamine replacement. DOT1L is the principal H3K79 methyl transferase identified
 334 to date and is ubiquitously expressed and conserved throughout evolution (50, 51). During male
 335 gametogenesis, it has been shown to be expressed in mouse spermatocytes (52) and in spermatids
 336 (32, 33); here, we show that, in wild-type testes, *Dot1l* is actually expressed at a higher level in
 337 spermatids compared to spermatocytes or spermatogonia. We also found that DOT1L protein is
 338 enriched at the postmeiotic sex chromatin in round spermatids and at specific regions observed
 339 as very bright dots in the nuclei of step 9 to 11 elongating spermatids. During those stages and
 340 beyond (in step 9 to 12 spermatids), just prior to histone removal, high H3K79 dimethylation
 341 coincides with histone H4 hyperacetylation (32, 33), a step essential for histone-to-protamine
 342 transition (for review, see (8)). Using our mouse model, we showed that postmeiotic
 343 downregulation of *Dot1l* induced by *Sly* deficiency leads to reduction in H3K79me2 level in
 344 elongating spermatids, concomitant with a decrease in acetylated histone H4. At the end of the

differentiation process, Sly-KD spermatozoa display a moderate but significant alteration in spermatozoa chromatin content, with more residual histones, and less protamination (~20% reduction). We propose that it is a direct consequence of the abnormal composition and structure of the spermatid chromatin, which results from the deregulation of genes essential for chromatin remodeling during sperm differentiation, in particular of DOT1L. It has recently been shown that, in the context of MLL leukemia, DOT1L-mediated H3K79 dimethylation facilitates histone H4 acetylation (34). We therefore propose that, in the context of postmeiotic chromatin remodeling, DOT1L and H3K79 dimethylation play a critical role in histone H4 acetylation which itself is required for an open chromatin state enabling nucleosome removal prior to protamine incorporation (see Figure 8). It is worth noting that a recent study has demonstrated that BRD4-mediated acetylation promotes chromatin decompaction and nucleosome eviction (53).

Finally, we show that abnormal chromatin content and compaction of Sly-KD spermatozoa is associated with increased susceptibility to oxidative stress. The high incidence of oxidized sperm we observed here could be at the basis of the increase in sperm DNA breaks (damage) that was previously observed (17). A modest reduction in protamine levels (~33%) in mice haploinsufficient for *Prm1* or *Prm2* gene results in reduced sperm compaction, increased DNA damage and embryo lethality (10). Experiments in which Sly-KD sperm were directly injected into the oocytes (i.e. intracytoplasmic sperm injection, ICSI) have shown that *Sly* deficiency does not dramatically impair the early post-fertilization events and does not lead to gross paternal chromosome breaks in the zygotes (17). But, in light of the high incidence of sperm with oxidized DNA in Sly-KD males that we reported here, ICSI with Sly-KD sperm may produce offspring with altered DNA integrity and increased mutational load. If not properly repaired, DNA lesions such as oxidized deoxy-guanosine (8-oxo-dG) can indeed lead to mutations and alter DNA integrity of the zygote and future embryo. Despite the existence of DNA repair strategies in the mammalian zygote, studies have shown deleterious consequences on genome integrity and embryo development when the system is overwhelmed (i.e. when incidence of DNA lesions is too high)(14, 36, 54). Oxidative damage to sperm DNA resulting from age, environmental or lifestyle factors

372 (such as smoking), has been shown to be associated with increased incidence of diseases (such as
373 cancers, neurological disorders, etc.) in the progeny (55). Oxidative stress associated with
374 impaired chromatin remodeling and compaction in case of male infertility could similarly have
375 negative consequences on the health of children conceived using assisted reproductive
376 technologies, such as ICSI, to bypass the father's infertility. Further studies using relevant models
377 will be needed to address this clinically relevant question.

378 **Material and methods**

379 **ChIP-Seq analyses**

380 SLY ChIP-Seq was performed by Active Motif ChIP-Sequencing service, as follow: ~10 million of
 381 FACS-sorted enriched fractions of round spermatids (with a purity >90%) were fixed with 1%
 382 formaldehyde for 15 minutes then quenched with 0.125 M glycine. Chromatin was isolated by
 383 adding lysis buffer, followed by disruption with a Dounce homogenizer. Lysates were sonicated
 384 and the DNA sheared to an average length of 300-500 bp. Genomic DNA (input) was prepared by
 385 treating aliquots of chromatin with RNase, proteinase K and heat for de-crosslinking, followed by
 386 ethanol precipitation. Pellets were resuspended and the resulting DNA was quantified on a
 387 NanoDrop spectrophotometer. Extrapolation to the original chromatin volume allowed
 388 quantitation of the total chromatin yield. An aliquot of chromatin (30 ug) was precleared with
 389 protein A agarose beads (Life technologies). Genomic DNA regions of interest were isolated using
 390 12 micrograms of anti-SLY antibody (15). Complexes were washed, eluted from the beads with
 391 SDS buffer, and subjected to RNase and proteinase K treatment. Crosslinks were reversed by
 392 incubation overnight at 65°C, and ChIP DNA was purified by phenol-chloroform extraction and
 393 ethanol precipitation. Illumina sequencing libraries were prepared from the ChIP and input DNAs
 394 using the Apollo 324 system (WaferGen). After a final PCR amplification step, the resulting DNA
 395 libraries were quantified and sequenced on HiSeq 2500 (37 and 26 million of reads were obtained
 396 for ChIP and input DNAs, respectively).

397 **Bioinformatics**

398 SLY ChIP and input sequences (50 nt reads, single end) were aligned to the mouse genome
 399 (GRCm38/mm10) using BWA algorithm (56), and filtered by mapping quality using Samtools -q0
 400 (57). For reads with multiple good alignments, one alignment was reported at random.
 401 Alignments were extended in silico at their 3'-ends to a length of 200 bp, which is the average
 402 genomic fragment length in the size-selected library, and assigned to 32-nt bins along the genome.
 403 The resulting histograms (genomic "signal maps") were stored in BAR and bigWig files. Datasets
 404 have been submitted to SRA <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra> with accession number SRP055115.

405 Sly peak locations were determined using the MACS algorithm (v1.4.2) (58) with a cutoff of p-
 406 value = $1e-7$. Annotation of SLY-enriched genomic regions (Figure 1A and Supplementary Figure
 407 1A) was performed using Cis-regulatory Element Annotation System (CEAS) available at
 408 <http://liulab.dfci.harvard.edu/CEAS/index.html>. P-values for the significance of the relative
 409 enrichment with respect to the background were calculated using one-sided binomial test. BED
 410 files containing SLY ChIP-Seq regions and H2A.B3 ChIP-Seq regions (WT and Sly-KD) were
 411 intersected with Ensembl80 gene coordinates (gene start, or gene start $\pm$ 1kb). Graphical
 412 representation of enrichment around the start of genes (expressed and not expressed in round
 413 spermatids) was done using Profiler and ComputeMatrix tools (59) available at the Galaxy website
 414 <https://mississippi.snv.jussieu.fr/>. Round spermatids ChIP-Seq datasets for H3K4me3, H3K27me,
 415 Kcr and H3K9me3 were obtained from GSE42629, GSE32663 and GSE56526 (20-22). All datasets
 416 were re-analyzed using the last version of the mouse genome (GRCm38/mm10) as described
 417 above. Overlap comparison was achieved by intersecting the intervals of two ChIP-Seq datasets.
 418 Graphic representations of ChIP-Seq data were performed using IGV (Integrative Genomics
 419 Viewer, <https://www.broadinstitute.org/igv/>). Gene ontology analyses were performed using
 420 Genomatix (<https://www.genomatix.de/>), GSEA (<http://www.broadinstitute.org/gsea/>) (60)
 421 and EnrichR (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) (61).

422

423 **Microarray and RNA-Seq analyses**

424 From Illumina microarray WG6 v2 of Sly-KD vs. WT round spermatids (16), all genes >1.5x fold
 425 deregulated (i.e. Log2 ratio < -0.58 or > 0.58) with a p-value ≤ 0.05 were converted to ENSEMBL ID
 426 using Biomart (<http://www.ensembl.org/biomart>) and the last version of the mouse genome
 427 (GRCm38/mm10). Close paralogs (>70% identity) were added to >1.5x extended to close paralog
 428 list (752 genes in total). All genes significantly deregulated with a p-value ≤ 0.05 were converted
 429 to ENSEMBL ID using Biomart and mm10 version of the mouse genome. This gave a list of 1171
 430 deregulated genes (see Table 1). Gene expression data from human testicular biopsies were
 431 obtained from published microarray data set (ArrayExpress: E-TABM-234) (62). Gene expression

data of mouse purified germ cells were obtained from RNASeq datasets GSE35005 and GSE43717 (6, 19) and analyzed by GenoSplice (<http://www.genosplice.com>) using the following parameters: reads were aligned onto the mouse genome (Ensembl 75, mm10) using STAR v.2.3.0, with an exon-exon junction database built using annotations from Ensembl version 75. For each gene present in ENSEMBL, reads aligning on constitutive regions (that are not prone to alternative splicing) were counted. Based on these read counts, normalization and differential gene expression were performed using DESeq (v1.12.0 on R v3.0.0).

Mice

All animals used in the present study were on > 90% C57BL/6 background and processed at adult age (between 2- and 6-month old males). Sly-KD mice were obtained as described in (16). FLAG-SLY1 transgenic mice were obtained by pronuclear micro-injection of a linearized construct containing *Sly1* open reading frame (i.e *Sly* long and main isoform, see (17) fused with *Flag* sequence, under the control of the spermatid-specific promoter SP-10 (aka ACRV1) (63, 64). Fertilized eggs from CBA/Ca x C57BL/10 mating were microinjected with the construct, using standard protocols. Transgenic founders carrying the SP10-FLAG-SLY1 construct were identified by PCR using the following primers (35 cycles, annealing temperature 60°C): Flag-F primer: 5'-GGA CTA CAA GGA CGA CGA TGA CAA-3' and Flag-R primer: 5'- GCA GCC TGC ACC TGA GGA GT-3' (711bp).

Several founders were obtained and crossed with XYRIII males on a random-bred MF1 albino (National Institute for Medical Research colony) background. One line (called FLAG-SLY) was established from a male founder which transmitted the transgene with a ~similar expression of FLAG-SLY1 compared to endogenous SLY1 protein. The line was maintained by further backcrossing transgenic males and females to B6/N mice and generate XYRIII males with (tsgic) and without (neg sib) the transgene. RT-qPCR and Western blot experiments showed a ~2-fold increase in *Sly* transcript and protein level in FLAG-SLY compared to WT testes. By immunofluorescence on FLAG-SLY and WT testicular tubules it was observed that FLAG-SLY transgene was only expressed in round spermatids (see supplementary Figure 9).

For all experiments, WT controls were of same age and background (i.e. non-transgenic siblings from the same mating). Animal procedures were subjected to local ethical review (*Comite d’Ethique pour l’Experimentation Animale, Universite Paris Descartes*; registration number CEEA34.JC.114.12).

Germ cell purification by FACS

Testicular cells were isolated from one adult male per experiment following a protocol adapted from (65) with some modifications previously described in (66). Cell purity was assessed for each collected fraction by microscope observation following DAPI (4,6-diamidino-2- phenylindole) staining (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vectorlab) of cells spread onto glass slides and fixed with 4% buffered paraformaldehyde. Round spermatids and elongating spermatids were collected with a purity > 90%.

Germ cell purification by elutriation

Enriched fractions of round spermatids and elongating/condensing spermatids were obtained using 2 to 3 mice per experiment (i.e. 4 to 6 testes) by centrifugal elutriation as described previously (16). Cell purity was assessed for each collected fraction as described above. Only fractions with >90% purity were used for ChIP-Seq and ChIP-qPCR analyses. It has previously been shown that Sly-KD and WT testicular tubules contain the same proportion of each type of round spermatids (16), elutriated Sly-KD and WT round spermatid fractions can therefore be compared.

Collection of epididymal spermatozoa

Cauda epididymides were dissected out from 2 to 6 month-old males, freed of connective tissues and fat, and transferred to a small petri dish containing 1mL of M2 medium (Sigma-Aldrich). Using small pipette tips, spermatozoa cells were very gently squeezed out of cauda epididymides, to limit contamination with somatic cells. Following 5 minutes of incubation at 37°C, sperm suspensions were collected and counted using a Malassez hemocytometer. Sperm cell purity was assessed for each sample by microscope observation following DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) staining (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vectorlab) of sperm cells

spread onto glass slides and fixed with 4% buffered paraformaldehyde. All samples used in our analyses contained $\geq 99\%$ of spermatozoa. Samples were aliquoted to five millions of spermatozoa per tube then centrifuged (600g for 5 minutes) and washed once in 1X PBS (Life technologies). Pellets were flash-frozen in liquid nitrogen.

SLY ChIP prior to qPCR

About 5×10^6 elutriated round spermatids (collected from 2 to 3 mice per sample) were crosslinked for 10 minutes at room temperature in 1x PBS containing 1% PFA. Reaction was stopped by adding 125 mM Glycine and incubating for 5 minutes at room temperature. Cells were washed twice with ice-cold PBS and centrifuged at 500 g, 4°C for 10 minutes. Cells were resuspended in 600 μ l of Lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1% DOC, 1mM DTT) with Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-free (Roche), 1mM PMSF 1 mM and 10mM Aprotinin added extemporaneously, and incubated on ice for 30 minutes. The suspension was then sonicated using PICO-Diagenode to obtain fragments of approximate size of 500bp (as verified by 2100 Bioanalyzer, Agilent). The lysate was centrifuged at 10,000g at 4°C for 5minutes. Twenty μ l of supernatant were taken as input and the remaining supernatant was incubated on a rotating wheel at 4°C overnight with Protein G Dynabeads (Life Technologies) which were previously coupled with antibody against SLY (15), as recommended by the manufacturer. The following day beads were washed subsequently in Lysis buffer, wash buffer n°2 (50 mM Hepes pH7.4, 0.5M NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton, 0.1% NaDeoxycholate), wash buffer n°3 (10mM Tris-HCl pH8, 0.25 M LiCl, 0,5% NP-40, 0.5% NaDeoxycholate , 5mM EDTA ph8), and in TE buffer. Supernatant was completely removed and beads were resuspended in Elution buffer containing 1% SDS. Input was defrosted on ice and diluted in Elution buffer. Samples were incubated for 15 minutes at 65°C with gentle mix every two minutes. IP and input were reverse crosslinked overnight at 65°C. Samples were then treated with Proteinase K and incubated for 1h at 37°C. IP and input DNAs were purified using NucleoSpin Kit (MachereyNagel) and eluted in 50 μ l of distilled water. Experiments were repeated on independent pools of elutriated round

spermatids (each representing 2 to 3 mice) three to six times. T-test was used for statistical analyses.

H2A.B3 ChIP prior to qPCR

Mononucleosomes were prepared from elutriated round spermatids (>90% purity) as previously described in (12) with some modifications. Briefly, about 5×10^6 round spermatids purified by elutriation were lysed by incubation with 300 μ l of Lysis buffer (KCl 60mM, NaCl 15mM, Tris HCl pH 7.4 15mM, Saccharose 0.34M, EDTA 2mM, EGTA 0.5mM, Spermidine 0.65mM, DTT 1mM, Triton 0.03%, Glycerol 1%, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Roche EDTA-free, PMSF 1mM, Aprotinin 10mM) for 20 minutes on ice, followed by centrifugation at 500g at 4°C for 10minutes. The pellet was gently resuspended in 200 μ l of Wash buffer (KCl 60 mM, NaCl 15 mM, Tris HCl pH 7.4 15 mM, Saccharose 0.34M, spermidine 0,65mM, DTT 1mM, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Roche EDTA-free, PMSF 1mM, Aprotinin 10mM) and centrifuged again. Nuclei were resuspended in 200 μ l of MNase buffer (Tris HCl pH7.5 10mM, KCl 10mM, CaCl₂ 2mM) and 5U of Micrococcal Nuclease (ThermoFisher) were added. Samples were immediately incubated in a waterbath at 37°C for 10minutes. MNase reaction was stopped by adding EDTA to 5mM final concentration. The nucleosome fraction was isolated by centrifugation at 10,000 g, 4°C, for 5minutes. ChIP were performed by adding LSDB 250 (glycerol 20%, Hepes 50mM, MgCl₂ 3mM, KCl 250mM, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Roche, PMSF 1mM, Aprotinin 10 mM) to the nucleosome fraction to a final volume of 500 μ l. Twenty μ l of this suspension were kept as input and immediately frozen at -20°C and the remaining volume was incubated on a rotating wheel at 4°C overnight with the beads (Dynabeads protein G, Life technologies) previously coupled with 5 μ l of anti-H2A.B3 (28)]. Samples were processed as described above. Experiments were repeated twice on independent pools of elutriated round spermatids (each representing 2 to 3 mice) and gave similar results.

ChIP of chromatin marks on elongating/condensing spermatids

Elongating/condensing spermatids were collected by centrifugal elutriation. Aliquots of about 1×10^7 elongating/condensing spermatids were used for chromatin preparation as described

previously by (12) with some modifications. Briefly, aliquots were suspended in 75 µl of Lysis Buffer (Tris pH 7.4 50 mM, NaCl 300 mM, NP-40 0.1%, DOC 0.1%, DTT 1 mM, Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets EDTA-free Roche, PMSF 1 mM, Aprotinin 10 mM, Sodium Butyrate 5 mM) for 15 minutes on ice with gentle shaking every 3 minutes. Spermatids were centrifuged at 10,000g at 4°C for 10 minutes. Supernatant was kept on ice and the pellet was resuspended in 100 µl of Lysis buffer and sonicated on PICOdiagenode for 4 minutes (30sec ON – 30 sec OFF) to allow the suspension of larger chromatin fragment. Spermatids were centrifuged again at 10,000g at 4°C for 10 minutes and supernatant was pooled with the first supernatant for MNase digestion. Seventy five µl of MNase Buffer (Tris, pH 7.5 10 mM, KCl 10 mM, and CaCl₂ 1 mM) were added and MNase digestion was performed by adding 10 U of MNase. Digestion was performed for exactly 10 minutes in a waterbath at 37°C. Digestion was stopped by adding 5mM EDTA. Five µl were kept to check MNase digestion on Agilent's 2100 Bioanalyzer. The remaining volume was diluted with Lysis buffer and 20 µl were kept as input. The remaining volume was incubated on a rotating wheel, 4°C overnight with magnetic beads (Dynabeads Protein G, Life technologies) previously coupled with the appropriate antibody [5 µl of anti-H3K79me2 (ab-3594 from Abcam), or 9 µl of anti-H4panAcetyl antibody (06-866 from Millipore)]. IP and input were further processed as described above. Experiments were repeated three to four times on independent pools of elutriated elongating/condensing spermatids (each representing 2 to 3 mice). T-test was used for statistical analyses.

Real time quantitative PCR

Real time PCR was performed using Roche LightCycler 480 and SYBRgreen Mastermix (Roche). ChIP-qPCR were performed on purified round spermatids or on elongating/condensing spermatids obtained by elutriation. Each sample represents a pool of 2-3 animals. Primers were designed to amplify regions across the TSS of indicated genes, except for NC which represents a negative control region (used to normalize) located 170kb away from any TSS. The sequences and qPCR condition of Akap4 and Actrt1 ChIP primers can be found in (28); for other primers, see Supplementary Figure 10.

RT-qPCR were performed on RNA extracted from WT and Sly-KD elutriated round spermatids and reversed-transcribed as described in (16) using primers listed in Supplementary Figure 10. The sequences and qPCR condition of *Jmjd1c* primers can be found in (67), of *β -actin* primers in (16), of *Dot1l* H9LAN primers in (33), of *H2afb3* primers in (28), of *H2al1*, *H2al2y* and *H2afb1* (aka *H2al2*) primers in (68). For the quantification of Flag-Sly transgene expression, RT-qPCR was performed on whole testes as described in (16) using Sly global primers (which amplify *Sly1* and other *Sly* isoforms), *Sly1* primers and *Acrv1* primers (see (16, 17)). Student t-test was used for all qPCR statistical analyses.

Immunofluorescence

Immunofluorescence on sections and on surface-spread testicular cells were performed as previously described (16, 66). Antibody against DOT1L (ab-64077 from Abcam), H3K79me2 (ab-3594 from Abcam) or Ach4 (06-866 from Millipore) were diluted 1/100 to 1/200. Pictures were taken with an Olympus BX63 microscope. Quantification was performed on pictures obtained from 6 samples per genotype using ImageJ 1.48v (<http://imagej.nih.gov/ij/>). T-tests were performed with GraphPad Prism 5.02.

Quantification of DNA oxidation

Detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) was carried out on spermatozoa from cauda epididymis. Spermatozoa were resuspended in a decondensing buffer consisting of 2 mM DTT and 0.5% Triton X-100 in PBS 1X and incubated for 30 min at room temperature. After centrifugation at 800 g for 5 min at room temperature, spermatozoa were washed in 1X PBS and smeared on a glass plate (250,000 cells/plate). The 8-oxo-dG immunostaining were performed as previously described by (69) using a monoclonal antibody against 8-oxo-dG (15A3, Novus biological, Interchim, France). To evaluate the percentage of spermatozoa with 8-oxo-dG staining, 300 spermatozoa per sample were scored, and 5 to 7 samples per genotype were analyzed. A positive control consisting in pre-treating spermatozoa with H2O2 was included in the analysis (n=3). Mann-Whitney nonparametric tests were performed using GraphPad Prism 5.02.

Transfection and protein extraction of GC1 cells

593 The open reading frames of Sly1 (17) was cloned in-frame with an N-terminal FLAG tag under the
 594 control of the CMV promoter of the pCDNA3.1 vector (Invitrogen). GC1-spg cells were transfected
 595 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with
 596 pCDNA3.1-CMV-FLAG-SLY vector (i.e. FLAG SLY) and pCDNA3.1 empty vector. Cells were
 597 collected for protein extraction 24h after transfection and pelleted by centrifugation for 5 min at
 598 100g. Proteins were extracted using ice-cold lysis buffer [150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8.0,
 599 5 mM EDTA, 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-aldrich), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1mM
 600 sodium orthovanadate and 1X cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail] at 4°C for
 601 30 min on a rotating platform. After centrifugation at 13,000g at 4 °C for 5min, the supernatant
 602 was collected and immediately used for the *in vitro* immunoprecipitation assay and mass
 603 spectrometry analysis.

604 **Protein extraction from testes**

605 Nuclear and cytosolic fractions were obtained from adult testes as described in (48). Protein
 606 extraction prior to immunoprecipitation was performed as follow: flash-frozen testes were
 607 ground and resuspended in 1 : 9 w/v ice-cold extraction buffer [150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl
 608 pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-aldrich), 1X protease inhibitor cocktail (Sigma-
 609 Aldrich), 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride and 1mM sodium orthovanadate]. After
 610 homogenization and incubation at 4 °C for 30 min, tissue lysates were centrifuged at 13,000 g at
 611 4 °C for 10 min. The supernatant was collected and immediately used for the immunoprecipitation
 612 assays.

613 **Co-immunoprecipitation**

614 For immunoprecipitation assays in GC1 cells, 60 µL of anti-FLAG® M2 magnetic beads (Sigma-
 615 aldrich) were washed three times in 1X TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.4) and incubated
 616 with 600 µL of protein extract from transiently transfected cells for 2h at 4°C. The magnetic beads
 617 were then washed two times in 500 µL of TBS with 0.5% Tween-20 and then incubated for a long
 618 wash for 5 minutes at room temperature in TBS only. For non-denaturing elution, beads were
 619 resuspended in 150 µL elution buffer (0.1 M glycine/HCl, pH 3.0), and incubated at room

620 temperature for 5 min. The pH was neutralized using triethylammonium bicarbonate buffer (pH
621 8.4).

622 For immunoprecipitation assays in whole testicular extracts, 40µL of Bio-Adembeads PAG
623 (Ademtech) or were washed two times in 80µL of PBS 0.65% Tween 20 and resuspended with
624 4µg of anti-SLY antibody, anti-TBLX1R1 antibody (ab 24550, Abcam) and purified rabbit IgG (02-
625 6102, Invitrogen) for 30min at room temperature to allow binding of the antibody. Beads were
626 washed two times in PBS 0.65% Tween 20, incubated with 200µL of 20 mM of
627 dimethylpimelimidate to covalently coupled the antibodies to the beads for 30min at room
628 temperature and the reaction was stopped by resuspended the beads with 40µL of 50 mM Tris pH
629 7.5 for 15 min. Bio-Adembeads PAG beads and 40 µL of anti-FLAG® M2 magnetic beads (Sigma-
630 aldrich) were incubated with 400 µL of protein extract for 2h at 4°C, and washed two times in PBS
631 0.65% Tween 20 and then incubated for a long wash for 5 minutes in PBS only. For non-
632 denaturing elution, Bio-Adembeads PAG beads were resuspended in 30 µL elution buffer and anti-
633 FLAG® M2 magnetic beads were resuspended in 100 µL elution buffer, and incubated at room
634 temperature for 5 min. The pH was neutralized using triethylammonium bicarbonate buffer (pH
635 8.4).

636 Alternatively, Dynabeads Protein G (Life technologies) were used as instructed by the
637 manufacturer and resuspended in 800 µL binding buffer with anti-SLY antibody or purified rabbit
638 IgG (Life technologies), and incubated overnight at 4 °C to allow binding of the antibody. Beads
639 were washed twice 0.2 M sodium borate (pH 9.0), incubated in 30 mM dimethylpimelimidate for
640 30 min at room temperature to covalently couple the antibodies to the beads, washed three times
641 in 0.2 M ethanolamine (pH 8.0), and then washed twice in 1 mL binding buffer. Antibody-coupled
642 beads were incubated with whole testis extracts for 1 h, and washed three times in extraction
643 buffer and once in 1X TBS with 0.05% Triton X-100 for 5 minutes. Elution was performed using
644 0.1 M glycine/HCl, pH 3.0. The pH was neutralized using triethylammonium bicarbonate buffer
645 (pH 8.4).

646 **Western blot**

Protein extraction and western blot experiments on whole testes and elutriated spermatids were performed as described in (66). Briefly, 15 μ L of each immunoprecipitated or HIS-pulldown sample and a volume of input sample corresponding to 10% of IP/Pulldown sample were denatured using 4X NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies) with 10% β -mercaptoethanol, boiled for 10 min at 95 °C and loaded. Extraction of sperm proteins was as follow: five millions of spermatozoa (purity $\geq$ 99%) were resuspended in 200 μ L of 4X NuPAGE LDS sample buffer (Life Technologies) and boiled for 10 min at 95°C. Ten μ L of sample were loaded per lane. Antibody against SLY (15) and antibody against SLX/SLXL1 (70) were diluted 1/3000, 1/6000, anti-Tubulin antibody (T-9026 from Sigma-Aldrich), anti-panH3 antibody (05-928 from Abcam), anti-FLAG (M5 from Sigma-Aldrich) and anti-Hup2B antibody (Briar Patch Biosciences), 1/1000.

Sample digestion and LC-MS/MS

Co-immunoprecipitated samples were subjected to a bottom-up analysis at the 3P5 university platform. After, cysteines reduction with dithiothreitol and alkylation with chloroacetamide, proteins were digested using trypsin and analysed by LC-MS/MS using method described in (71).

Spectra Processing, Peptide Identification

The software Proteome discoverer 1.3 was used to generate .mgf files. The threshold of signal to noise for extraction values was 3. MS/MS spectra were submitted to MASCOT version 2.5.1 and Maxquant version 1.5.2.8. The database used was a concatenation of Mouse sequence of NCBI database. Oxidation of methionine was permitted partially, whereas carbamidomethylation of cysteine was considered complete. Label-free quantification option without match between runs was used in Maxquant. Two independent anti-FLAG co-immunoprecipitation assays were performed respectively on whole testis and on transiently transfected GC1 cells. For whole testis experiment, duplicate mass spectrometry analyses were performed and were independently analyzed with MASCOT; Table 3 shows the results of MASCOT analysis of the second experiment. The results of the two duplicate experiments were pooled for Maxquant analysis. In MASCOT analyses, the protein score is the sum of the highest MS/MS ions score for each distinct peptide sequence. So the highest the protein score, the more it is represented in the sample. However, for

an identical mole of protein, a larger protein can give more peptides than a smaller one. EmPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) value provides a complementary information as it depends on the number of detected peptides compared to the total number of detectable peptides. The higher the EmPAI, the more abundant the protein. In Table 3, only Maxquant label free quantification (LFQ) is more accurate than EmPAI because it reflects the total LC-MS intensity of peptides for the proteins.

680

681 **Acknowledgements**

The authors wish to thank Monika Ward for helpful discussions, Aine Rattigan and Anne-Marie Lachages for help with elutriation settings, Sophie Wood and other members of the NIMR transgenesis facility for pronuclear injections. We also thank Matthieu Benard and other staff members of the Cochin Institute Mouse House Facility, Antoine Gueraud for DNA extraction, Franck Letourneur, Florent Dumont and Juliana Pipoli from the Genomic Facility, Evangeline Bennana and François Guillonnet from the 3P5 proteomic facility, as well as the Histology, Immunostaining and Laser Microdissection Facility, the Cellular Imaging Facility and the Cytometry and Immunobiology Facility of the Cochin Institute (INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes). This work was supported by Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), the Agence Nationale de la Recherche program ANR-12-JSV2-0005-01 (to J.C.) and a Marie Curie fellowship FP7-PEOPLE-2010-IEF-273143 (to J.C.).

693

694 **Conflict of interest**

695 None

696

References

1. Yan W. Male infertility caused by spermiogenic defects: lessons from gene knockouts. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;306(1-2):24-32.
2. White-Cooper H, Davidson I. Unique aspects of transcription regulation in male germ cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(7).
3. Schultz N, Hamra FK, Garbers DL. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12201-6.
4. Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, Griswold MD. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biology of reproduction*. 2004;71(1):319-30.
5. Chalmel F, Rolland AD, Niederhauser-Wiederkehr C, Chung SS, Demougin P, Gattiker A, et al. The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(20):8346-51.
6. Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X, Gu H, et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell reports*. 2013;3(6):2179-90.
7. Braun RE, Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD. Protamine 3'-untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localization of growth hormone in spermatids of transgenic mice. *Genes & development*. 1989;3:793-802.
8. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(3):155-68.
9. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nature genetics*. 2001;28(1):82-6.
10. Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biology of reproduction*. 2003;69(1):211-7.
11. Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, et al. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *The EMBO journal*. 2012;31(19):3809-20.
12. Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, et al. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes & development*. 2013;27(15):1680-92.
13. Li W, Wu J, Kim SY, Zhao M, Hearn SA, Zhang MQ, et al. Chd5 orchestrates chromatin remodelling during sperm development. *Nature communications*. 2014;5:3812.
14. Yamauchi Y, Riel JM, Stoytcheva Z, Burgoyne PS, Ward MA. Deficiency in mouse Y chromosome long arm gene complement is associated with sperm DNA damage. *Genome biology*. 2010;11(6):R66.
15. Reynard LN, Cocquet J, Burgoyne PS. The multi-copy mouse gene Sycp3-like Y-linked (Sly) encodes an abundant spermatid protein that interacts with a histone acetyltransferase and an acrosomal protein. *Biology of reproduction*. 2009;81(2):250-7.
16. Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Mahadevaiah SK, Affara NA, Ward MA, et al. The multicopy gene Sly represses the sex chromosomes in the male mouse germline after meiosis. *PLoS biology*. 2009;7(11):e1000244.
17. Riel JM, Yamauchi Y, Sugawara A, Li HY, Ruthig V, Stoytcheva Z, et al. Deficiency of the multi-copy mouse Y gene Sly causes sperm DNA damage and abnormal chromatin packaging. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 3):803-13.
18. Yuan L, Liu J-G, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine *SCP3* gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Molecular Cell*. 2000;5:73-83.
19. Gan H, Wen L, Liao S, Lin X, Ma T, Liu J, et al. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine during mouse spermatogenesis. *Nature communications*. 2013;4:1995.

20. Bryant JM, Donahue G, Wang X, Meyer-Ficca M, Luense LJ, Weller AH, et al. Characterization of BRD4 during mammalian postmeiotic sperm development. *Mol Cell Biol.* 2015;35(8):1433-48.
21. Erkek S, Hisano M, Liang CY, Gill M, Murr R, Dieker J, et al. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology.* 2013;20(7):868-75.
22. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell.* 2011;146(6):1016-28.
23. Hammoud SS, Low DH, Yi C, Carrell DT, Guccione E, Cairns BR. Chromatin and transcription transitions of mammalian adult germline stem cells and spermatogenesis. *Cell stem cell.* 2014;15(2):239-53.
24. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell.* 2005;120(2):169-81.
25. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(50):21931-6.
26. Benayoun BA, Pollina EA, Ucar D, Mahmoudi S, Karra K, Wong ED, et al. H3K4me3 breadth is linked to cell identity and transcriptional consistency. *Cell.* 2014;158(3):673-88.
27. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39(1):75-85.
28. Soboleva TA, Nekrasov M, Pahwa A, Williams R, Huttley GA, Tremethick DJ. A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nature structural & molecular biology.* 2011.
29. Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, et al. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *The Journal of cell biology.* 2007;176(3):283-94.
30. Ferguson L, Ellis PJ, Affara NA. Two novel mouse genes mapped to chromosome Yp are expressed specifically in spermatids. *Mamm Genome.* 2009;20(4):193-206.
31. Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, et al. 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.* 2005;102(8):2808-13.
32. Dottermusch-Heidel C, Gartner SM, Tegeder I, Rathke C, Barckmann B, Bartkuhn M, et al. H3K79 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-protamine transition in *Drosophila* and rat. *Biol Open.* 2014;3(6):444-52.
33. Dottermusch-Heidel C, Klaus ES, Gonzalez NH, Bhushan S, Meinhardt A, Bergmann M, et al. H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology.* 2014;2(5):655-65.
34. Gilan O, Lam EY, Becher I, Lugo D, Cannizzaro E, Joberty G, et al. Functional interdependence of BRD4 and DOT1L in MLL leukemia. *Nature structural & molecular biology.* 2016;23(7):673-81.
35. Brykczynska U, Hisano M, Erkek S, Ramos L, Oakeley EJ, Roloff TC, et al. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature structural & molecular biology.* 2010;17(6):679-87.
36. Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, et al. Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2009;119(7):2074-85.
37. Turner JM. Meiotic Silencing in Mammals. *Annual review of genetics.* 2015;49:395-412.
38. van der Heijden GW, Eijpe M, Baarends WM. The X and Y chromosome in meiosis: how and why they keep silent. *Asian journal of andrology.* 2011.
39. Syrjanen JL, Pellegrini L, Davies OR. A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *Elife.* 2014;3.

- 797 40. Li J, Wang J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, et al. Both corepressor proteins SMRT and N-CoR
798 exist in large protein complexes containing HDAC3. The EMBO journal. 2000;19(16):4342-50.
- 799 41. Zhang J, Kalkum M, Chait BT, Roeder RG. The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor
800 complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. Mol Cell. 2002;9(3):611-23.
- 801 42. Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent
802 repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. Mol Cell. 2003;12(3):723-34.
- 803 43. Zhang D, Yoon HG, Wong J. JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in
804 repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2). Mol Cell
805 Biol. 2005;25(15):6404-14.
- 806 44. Perissi V, Scafoglio C, Zhang J, Ohgi KA, Rose DW, Glass CK, et al. TBL1 and TBLR1
807 phosphorylation on regulated gene promoters overcomes dual CtBP and NCoR/SMRT transcriptional
808 repression checkpoints. Mol Cell. 2008;29(6):755-66.
- 809 45. Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG. Deconstructing repression: evolving models of co-
810 repressor action. Nat Rev Genet. 2010;11(2):109-23.
- 811 46. Ellis PJ, Bacon J, Affara NA. Association of Sly with sex-linked gene amplification during mouse
812 evolution: a side effect of genomic conflict in spermatids? Human molecular genetics.
813 2011;20(15):3010-21.
- 814 47. Soh YQ, Alfoldi J, Pyntikova T, Brown LG, Graves T, Minx PJ, et al. Sequencing the mouse Y
815 chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes. Cell.
816 2014;159(4):800-13.
- 817 48. Cocquet J, Ellis PJ, Mahadevaiah SK, Affara NA, Vaiman D, Burgoyne PS. A genetic basis for a
818 postmeiotic X versus Y chromosome intragenomic conflict in the mouse. PLoS Genet.
819 2012;8(9):e1002900.
- 820 49. Helleu Q, Gerard PR, Montchamp-Moreau C. Sex chromosome drive. Cold Spring Harbor
821 perspectives in biology. 2015;7(2):a017616.
- 822 50. Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, et al. Methylation of H3-
823 lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. Curr Biol. 2002;12(12):1052-
824 8.
- 825 51. Zhang W, Hayashizaki Y, Kone BC. Structure and regulation of the mDot1 gene, a mouse histone
826 H3 methyltransferase. The Biochemical journal. 2004;377(Pt 3):641-51.
- 827 52. Ontoso D, Kauppi L, Keeney S, San-Segundo PA. Dynamics of DOT1L localization and H3K79
828 methylation during meiotic prophase I in mouse spermatocytes. Chromosoma. 2014;123(1-2):147-64.
- 829 53. Devaiah BN, Case-Borden C, Gegonne A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, et al. BRD4 is a histone
830 acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. Nature structural & molecular biology.
831 2016;23(6):540-8.
- 832 54. Lord T, Aitken RJ. Fertilization stimulates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine repair and antioxidant
833 activity to prevent mutagenesis in the embryo. Developmental biology. 2015;406(1):1-13.
- 834 55. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive
835 health. Asian journal of andrology. 2014;16(1):31-8.
- 836 56. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform.
837 Bioinformatics. 2010;26(5):589-95.
- 838 57. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map
839 format and SAMtools. Bioinformatics. 2009;25(16):2078-9.
- 840 58. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis
841 of ChIP-Seq (MACS). Genome biology. 2008;9(9):R137.
- 842 59. Ramirez F, Dundar F, Diehl S, Gruning BA, Manke T. deepTools: a flexible platform for exploring
843 deep-sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014;42(Web Server issue):W187-91.
- 844 60. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set
845 enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.
846 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
847 2005;102(43):15545-50.

- 848 61. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, et al. Enrichr: interactive and
849 collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. BMC bioinformatics. 2013;14:128.
- 850 62. Spiess AN, Feig C, Schulze W, Chalmel F, Cappallo-Obermann H, Primig M, et al. Cross-platform
851 gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response.
852 Human reproduction (Oxford, England). 2007;22(11):2936-46.
- 853 63. Reddi PP, Flickinger CJ, Herr JC. Round spermatid-specific transcription of the mouse SP-10
854 gene is mediated by a 294-base pair proximal promoter. Biology of reproduction. 1999;61(5):1256-66.
- 855 64. Reddi PP, Shore AN, Shapiro JA, Anderson A, Stoler MH, Acharya KK. Spermatid-specific
856 promoter of the SP-10 gene functions as an insulator in somatic cells. Developmental biology.
857 2003;262(1):173-82.
- 858 65. Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I, et al. Flow cytometric
859 characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis.
860 Cytometry A. 2005;65(1):40-9.
- 861 66. Comptour A, Moretti C, Serrentino ME, Auer J, Ialy-Radio C, Ward MA, et al. SSTY proteins co-
862 localize with the post-meiotic sex chromatin and interact with regulators of its expression. The FEBS
863 journal. 2014;281(6):1571-84.
- 864 67. Kuroki S, Akiyoshi M, Tokura M, Miyachi H, Nakai Y, Kimura H, et al. JMJD1C, a JmjC domain-
865 containing protein, is required for long-term maintenance of male germ cells in mice. Biology of
866 reproduction. 2013;89(4):93.
- 867 68. Ellis PJI, Clemente EJ, Ball P, Toure A, Ferguson L, Turner JMA, et al. Deletions on mouse Yq
868 lead to upregulation of multiple X- and Y-linked transcripts in spermatids. Human molecular genetics.
869 2005;14:2705-15.
- 870 69. Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, et al. DNA
871 oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? Free
872 radical biology & medicine. 2013;65:719-23.
- 873 70. Reynard LN, Turner JM, Cocquet J, Mahadevaiah SK, Toure A, Hoog C, et al. Expression analysis
874 of the mouse multi-copy X-linked gene Xlr-related, meiosis-regulated (Xmr), reveals that Xmr encodes
875 a spermatid-expressed cytoplasmic protein, SLX/XMR. Biology of reproduction. 2007;77(2):329-35.
- 876 71. Lahouassa H, Blondot ML, Chauveau L, Chougui G, Morel M, Leduc M, et al. HIV-1 Vpr degrades
877 the HLTF DNA translocase in T cells and macrophages. Proceedings of the National Academy of
878 Sciences of the United States of America. 2016;113(19):5311-6.
- 879 72. Montellier E, Rousseaux S, Zhao Y, Khochbin S. Histone crotonylation specifically marks the
880 haploid male germ cell gene expression program: Post-meiotic male-specific gene expression.
881 Bioessays. 2011.

882

883

884

885 **Figure legend**

886 **Figure 1. SLY marks the sperm differentiation program and co-localizes with active**
887 **epigenetic marks**

888 (A) Annotation of SLY-enriched genomic regions (right) compared to whole genome (left), using
889 Cis-regulatory Element Annotation System (CEAS). (B) Graphic representation of the percentage
890 of genes found occupied by SLY protein by ChIP-Seq on each chromosome. (C) Validation of SLY
891 target genes by ChIP-qPCR on round spermatids using antibody against SLY. The TSS of *Slx*, *Rbmx*,
892 *Rhox11*, *Actrt1*, *Ctag2* and *Hist1h3a* were found enriched in SLY by ChIP-Seq (present study) and
893 were previously found deregulated in Sly-KD versus WT samples by micro-array and/or RT-qPCR
894 analyses (16). The TSS of *H2afb3*, *Jmjd1c* and *Dot1l* were found enriched in SLY by ChIP-Seq
895 (present study) and were found deregulated in Sly-KD versus WT round spermatids by RT-qPCR
896 (present study, cf. Figure 2B). Sex chromosome-encoded genes are represented in black and
897 autosomal genes, in grey. The Y-axis represents the mean enrichment (% IP/input) +/- standard
898 error of means (SEM) normalized to a negative control region (NC) located at ~170kb from a TSS.
899 All regions shown were found significantly enriched in SLY compared to the negative control
900 region (t-test, $p < 0.05$; $n = 3-6$ samples). (D) Graphic representation of SLY ChIP-Seq profile
901 showing the average enrichment of SLY around the TSS of genes expressed (in red) and not
902 expressed (in black) in round spermatids. (E) Graphic representation of the percentage of genes
903 that are expressed (in red) and not expressed (in black) in round spermatids, among all mouse
904 genes (mm10 genome version) or among SLY-associated genes. SLY is significantly enriched at
905 the start (i.e. TSS+/-1kb) of genes expressed in round spermatids (χ^2 , $p < 0.0001$). (F)
906 Representation of SLY ChIP-Seq and input profiles at *Sly* gene locus. (G) Graphic representation of
907 the comparison between SLY ChIP-Seq dataset and ChIP-Seq datasets from chromatin marks (Kcr,
908 H3K4me3, H3K9ac, H4ac, H3K27ac, H3K27me3, H3K9me3) and from BRD4, in round spermatids.
909 In red is represented the percentage of SLY-enriched genomic regions which overlaps with that
910 of the chromatin mark-/factor-enriched genomic regions; in black is represented the percentage

of the genome covered by the chromatin mark/factor. A star indicates a significant enrichment at SLY-covered regions compared to global genomic coverage (χ^2 , $p < 0.03$). Note how SLY genomic localization correlates with that of chromatin marks/factor known to be associated with gene expression. (H) Table recapitulating the results of gene ontology analyses of SLY ChIP-Seq genes using EnrichR. See also Supplementary Figure 1C.

916

Figure 2. SLY controls the expression of genes involved in chromatin regulation during postmeiotic sperm differentiation.

(A) Representation of SLY ChIP-Seq, its input, H3K4me3 ChIP-Seq, Kcr ChIP-Seq, H3K27me3 ChIP-Seq and H3K9me3 ChIP-seq at the TSS of *Dot1l*, one of the genes found to have the highest enrichment of SLY by ChIP-Seq. (B) Transcript level of autosomal genes found to be highly enriched in SLY protein at their TSS (10% of genes with highest SLY peak, see Supplementary Figure 3) and of XY-encoded genes, measured by RT-qPCR in *Sly*-knockdown (*Sly*-KD) and wild-type (WT) round spermatids. The graph represents the geometric mean $\pm$ standard error of means (after normalization with β -actin, $n=3-6$ samples per genotype). For all except two genes (*H2afb1* and *Ube2b*, labeled with 'ns' for non-significant), a significant difference between *Sly*-KD and WT samples was found with a p -value < 0.05 (t-test). Note how all XY-encoded genes are upregulated in *Sly*-KD round spermatids, while autosomal genes are either upregulated, downregulated or unchanged. (C) Representation of SLY ChIP-Seq, its input, H3K4me3 ChIP-Seq, Kcr ChIP-Seq, H3K27me3 ChIP-Seq and H3K9me3 ChIP-seq. SLY co-localizes with active epigenetic marks H3K4me3 and Kcr at the TSS of *H2afb3* (located in an intron of *Pdch11x*) but not of its autosomal-encoded homolog, *H2afb1*. (D) ChIP-qPCR experiments on wild-type (WT) and *Sly*-knockdown (*Sly*-KD) round spermatids using antibody against H2A.B3. The TSS of expressed genes was found enriched in H2A.B3 in *Sly*-KD compared to WT round spermatids ($n=3$ samples per genotype). The Y-axis represents the mean enrichment (IP/input) normalized to the corresponding WT value. A significant increase in H2A.B3 level at the TSS was found in *Sly*-KD compared to WT samples when considering all genes tested (t-test, p -value < 0.05).

Figure 3. DOT1L is highly expressed in postmeiotic germ cells

(A). Schematic of *Dot1l* expression as found by RNA-Seq on Sertoli cells (SE) and mouse purified germ cells fractions (SG: spermatogonia; SC: spermatocytes; rST: round spermatids; eST: elongating spermatids). (B) Schematic diagram of *DOT1L* expression (Affymetrix HG-U133_Plus_2 probe n° 231297_at) in humans as found by micro-array analyses of testicular biopsies with different germ cell contents (SG: spermatogonia; SC: spermatocytes; rST: round spermatids; eST: elongating spermatids). (C) Immunofluorescence detection of DOT1L protein (red) in germ cells at 4 stages of postmeiotic differentiation (from left to right: round spermatid, early elongating spermatid, late elongating spermatid, spermatozoa). DAPI (blue) was used to stain nuclei. H3K9me3 (in green) marks the chromocenter (i.e. the constitutive pericentromeric heterochromatin) and the X or Y chromosome (i.e. the post meiotic sex chromatin, PMSC, indicated by an arrow) (72). Note how DOT1L is enriched at the PMSC in round spermatids and appears as nuclear punctuated signals, in elongating spermatids. Scale bar indicates 10µm. See also Supplementary Figure 4.

Figure 4. DOT1L-mediated H3K79 dimethylation is affected by Sly knockdown.

(A) Immunofluorescence detection of H3K79 dimethylation (H3K79me2) in stage X testicular sections from wild-type (WT) and Sly-knockdown (Sly-KD) mice. Scale bar indicates 20µm. Pictures were taken using the same image capture parameters. See also Supplementary Figure 5. (B) Schematic showing H3K79me2 level quantified by immunofluorescence in Sly-KD and WT step 10-12 elongating spermatids. The graph represents mean +/- standard error of means. The difference between the two genotypes is statistically significant (t-test on 6 samples per genotype, $p=0.0002$). (C) ChIP-qPCR experiments on elongating/condensing spermatids from wild-type (WT) and Sly-knockdown (Sly-KD) mice, using antibody against H3K79me2. The Y-axis represents the mean enrichment (% IP/input) +/- standard error of means (SEM) normalized to a negative control region (NC) located at ~170kb from a TSS, and to the corresponding WT value. A significant decrease of H3K79me2 level at gene TSS was found in Sly-KD compared to WT

samples when considering all genes tested genes (t-test, p-value<0.05, n= 3-4 samples per genotype). (D) Immunofluorescence detection of H3K79me2 (red) in WT epididymal spermatozoa. Hoechst (blue) was used to stain nuclei. Scale bar indicates 5µm.

954

955 **Figure 5. *Sly* deficiency impairs histone H4 hyperacetylation during postmeiotic sperm**
 956 **differentiation.**

(A) Immunofluorescence detection of histone H4 acetylation (acH4) in stage XII testicular sections from wild-type (WT) and *Sly*-knockdown (*Sly*-KD) mice. Scale bar indicates 20µm. Pictures were taken using the same image capture parameters. See also Supplementary Figure 8) Schematic showing acH4 level quantified by immunofluorescence in *Sly*-KD and WT step 10-12 elongating spermatids. The difference between the two genotypes is statistically significant (t-test on 5-6 samples per genotype, p=0.00012). (C) ChIP-qPCR experiments on elongating/condensing spermatids from wild-type (WT) and *Sly*-knockdown (*Sly*-KD) mice, using antibody against acH4. The Y-axis represents the mean enrichment (% IP/input) +/- standard error of means (SEM) normalized to the corresponding WT value. A significant decrease of acH4 level was found in *Sly*-KD compared to WT samples when considering all genes tested genes (t-test, p-value<0.01, n= 3-4 samples per genotype).

957

958 **Figure 6. *Sly* deficiency leads to abnormal chromatin content and increased DNA oxidation**
 959 **in spermatozoa.**

(A) Western blot quantification of histone H3 (using anti-pan-H3) in protein extracts from wild-type (WT) and *Sly*-knockdown (*Sly*-KD) spermatozoa. Antibody against TUBULIN was used to normalize the signal. The scatter plot on the right represents histone H3 level normalized with TUBULIN (mean value +/- standard deviation). The difference between the two genotypes is statistically significant (t-test on 8-9 samples per genotype, p=0.0047). (B) Western blot detection and quantification of TH2B in protein extracts from WT and *Sly*-KD (KD) spermatozoa. Antibody against TUBULIN was used to normalize the signal. The right panel is a schematic diagram

showing quantification of TH2B (normalized to TUBULIN level) in Sly-KD and WT spermatozoa. The graph represents the mean level +/- standard error of means. The difference between the two genotypes is statistically significant (t-test, n=3-5 samples per genotype, p=0.009). (C) Western blot quantification of protamine 2 (using anti-Hup2B) in protein extracts from wild-type and Sly-knockdown spermatozoa. Antibody against TUBULIN was used to normalize the signal. The scatter plot on the right represents Protamine 2 level normalized with TUBULIN (mean value +/- standard deviation). The difference between the two genotypes is statistically significant (t-test on 5-6 samples per genotype, p=0.0199). The variability was elevated among Sly-KD samples and when excluding one outsider value, the p-value dropped to 0.0003. (D) Representative pictures obtained using antibody against 8-oxo-dG in WT and Sly-KD epididymal spermatozoa. WT picture shows two 8-oxo-dG negative spermatozoa while Sly-KD picture shows two 8-oxo-dG positive spermatozoa. Pictures were taken using the same image capture parameters. Scale bar indicates 5 μ m. The scatter plot on the right represents the percentage of oxidized spermatozoa (mean +/- standard deviation) measured using antibody against 8-oxo-dG in WT and Sly-KD epididymis. Ctl+ indicates values obtained when spermatozoa were pre-incubated with H2O2 (positive control). Mann-Whitney nonparametric test showed significant difference between WT and Sly-KD samples (5-7 samples per genotype, p= 0.01) and between WT and Ctl+ (p=0.025).

960

961 **Figure 7. SLY protein interacts with TBL1XR1 protein.**

962 (A) SLY and TBL1XR1 antibody detection of wild-type (WT) and *Sly*-deficient (Sly-KD) whole
963 testicular extracts (INPUT) and of corresponding extracts immunoprecipitated with SLY antibody
964 (IP:SLY). SLY immunoprecipitation performed on Sly-KD testicular extracts and
965 immunoprecipitation with purified rabbit IgG on WT extracts (IP:IgG) were used as negative
966 controls. (B) SLY and TBL1XR1 antibody detection of whole testicular extracts from WT and FLAG-
967 SLY mice (INPUT) and of corresponding extracts immunoprecipitated with FLAG antibody
968 (IP:FLAG). FLAG immunoprecipitation performed on WT testicular extracts was used as a
969 negative control. (C) SLY and TBL1XR1 antibody detection of WT whole testicular extracts

(INPUT) and immunoprecipitated with TBL1XR1 antibody (IP:TBL1XR1). TBL1XR1 immunoprecipitation performed on Sly-KD testicular extracts and immunoprecipitation with purified rabbit IgG on WT extracts (IP:IgG) were used as negative controls. Arrows indicate the specific band (at expected sizes of 38kDa for SLY and 64kDa for TBL1XR1) and stars, non-specific bands (which disappear in negative controls).

975

Figure 8. Model presenting the mechanism by which SLY controls gene expression and chromatin remodeling during sperm differentiation.

In wild-type round spermatids (left panel), SLY (in blue) interacts with the SMRT/N-CoR complex (which comprises TBL1XR1, TBL1X, NCOR1 and HDAC3) and is located at the start of genes involved in gene regulation, chromatin regulation and the ubiquitin pathway. In particular, SLY directly controls the expression of genes encoding histone variant H2A.B3 and H3K79 methyltransferase DOT1L. H2A.B3 (in red) is an H2A variant incorporated preferentially at the TSS of expressed genes in round spermatids. When SLY is knocked down (right panel), H2A.B3 is upregulated and more incorporated in the spermatid chromatin, while DOT1L is downregulated. DOT1L downregulation leads to a decrease in dimethylated H3K79 (orange circles) and acetylated histone H4 (green circles) in elongating spermatids. Alterations in the spermatid chromatin structure affect the replacement of nucleosomes (light pink oval) by protamines (dark purple oval) and lead to a higher proportion of nucleosomes and a decreased proportion of protamines. As a result, *Sly*-deficient spermatozoa are abnormally shaped, less compact and present a higher susceptibility to DNA damage than WT spermatozoa.

991

992 Tables

993 **Table 1. SLY ChIP-Seq details.**

994 **Table 2. Microarray analyses of Sly-KD versus WT round spermatids.**

995 **Table 3. Mass spectrometry results from MASCOT and label-free quantification (LFQ)**

996 **Maxquant analysis.** Top panel: MASCOT analysis of the second co-immunoprecipitation assay

997 performed on whole testis and of the co-immunoprecipitation assay performed on GC1 cells. The
998 protein score is the sum of the highest MS/MS ions score for each distinct peptide sequence. The
999 highest the protein score, the more it is represented in the sample. However, for an identical mole
1000 of protein, a larger protein can give more peptides than a smaller one. EmPAI (Exponentially
1001 Modified Protein Abundance Index) value provides a complementary information as it depends
1002 on the number of detected peptides compared to the total number of detectable peptides. The
1003 higher the EmPAI, the more abundant the protein.

1004 Bottom panel: Maxquant label free quantification (LFQ) analyses of the two co-
1005 immunoprecipitation assays performed on whole testis and of the co-immunoprecipitation assay
1006 performed on GC1 cells. Maxquant analysis is more accurate than EmPAI because it reflects the
1007 total LC-MS intensity of peptides for the proteins.

1008

1009

	SLY ChIP DNA	Input DNA
Total number of reads	37 495 530	26 337 788
Total number of alignments	23 699 247	25 636 677
Final number of tags (no duplicate reads)	9 754 313	20 829 154
Normalized	9 754 313	9 754 313
MACS 1.4.2 peak calling		
Paired peaks	3 631	
Predicted fragment length	147	
Final MACS peaks	13 664	
Negative peaks	99	
False Discovery Rate	0.72%	
Annotation		
SLY-enriched genomic regions	13 664	
Percentage of intervals within 10Kb of NCBI genes (mm10)	67.8%	
Percentage of Intervals within Promoter Region (-7500/+2500 bp of NCBI Gene Start)	46.8%	
Percentage of NCBI genes (mm10) with SLY at TSS	16%	
Percentage of NCBI genes (mm10) with SLY at +/- 1kb of TSS	19%	

Table 1. SLY ChIP-Seq details

	Total Nb of genes	Nb of upregulated genes in Sly-KD round spermatids		Nb of downregulated genes in Sly-KD round spermatids	
		XY (%)	autosomal (%)	XY (%)	autosomal (%)
Minimal list >1.5x deregulation	413	276 (66,8%)	96 (23,2%)	0 (0%)	41 (10%)
List extended to close paralogs >1.5x deregulation	752	465 (61,8%)	232 (30,9%)	0 (0%)	55 (7,3%)
All deregulated genes (p<0.05)	1171	433 (37%)	353 (30%)	0 (0%)	385 (33%)

Table 2. microarray analysis of Sly-KD vs WT round spermatids

Mascot Data	IP:FLAG on whole testis							
	IP:FLAG on FLAGSLY testis				IP:FLAG on WT testis			
	Score	Nber Peptides	% Sqce Covery	EmPAI	Score	Nber Peptides	% Sqce Covery	EmPAI
HDAC3	0	0	0	0	0	0	0	0
TBL1XR1	34	1	4,5	0,09	0	0	0	0
NCOR1	33	2	0,9	0,04	0	0	0	0
SLY	276	11	23,9	1,56	0	0	0	0
TBL1X	0	0	0	0	0	0	0	0

Mascot Data	IP:FLAG on transiently transfected cells							
	IP:FLAG on FLAGSLY cells				IP:FLAG on empty-pcDNA3.1 cells			
	Score	Nber Peptides	% Sqce Covery	EmPAI	Score	Nber Peptides	% Sqce Covery	EmPAI
HDAC3	86	1	3	0,1	0	0	0	0
TBL1XR1	143	4	11	0,8	0	0	0	0
NCOR1	0	0	0	0	0	0	0	0
SLY	566	16	51	8,56	0	0	0	0
TBL1X	273	7	0,8	24	0	0	0	0

MaxQuant Data	IP:FLAG on whole testis				IP:FLAG on transiently transfected cells			
	IP:FLAG on FLAGSLY testis		IP:FLAG on WT testis		IP:FLAG on FLAGSLY cells		IP:FLAG on empty- pcDNA3.1 cells	
	LFQ		LFQ		LFQ		LFQ	
HDAC3	0		0		141110		0	
TBL1XR1	0		0		45558		0	
NCOR1	92305		0		0		0	
SLY	6544900		0		5026100		0	
TBL1X	0		0		754720		0	

Table 3

Figure 1 Moretti et al

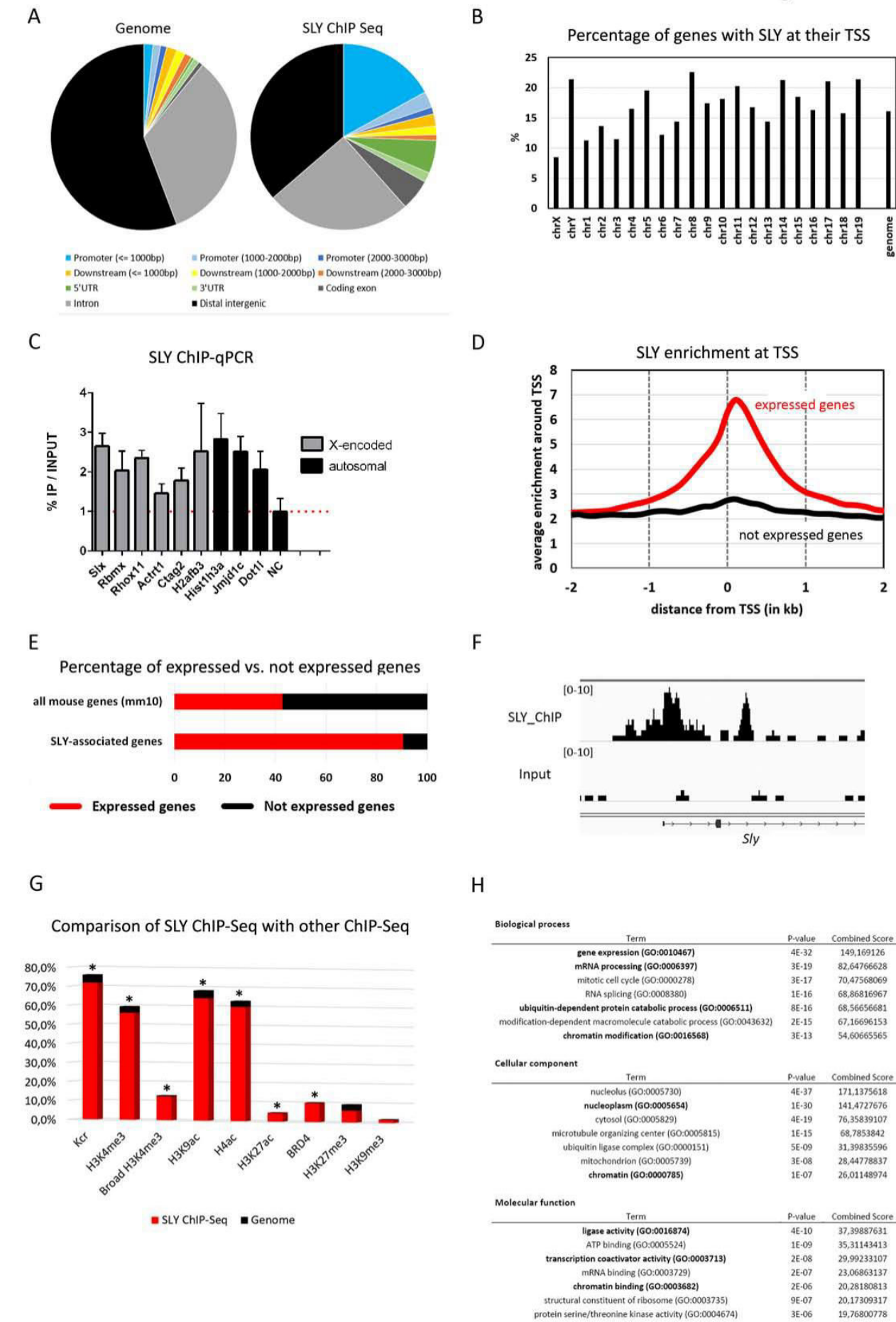


Figure 2. Moretti et al.

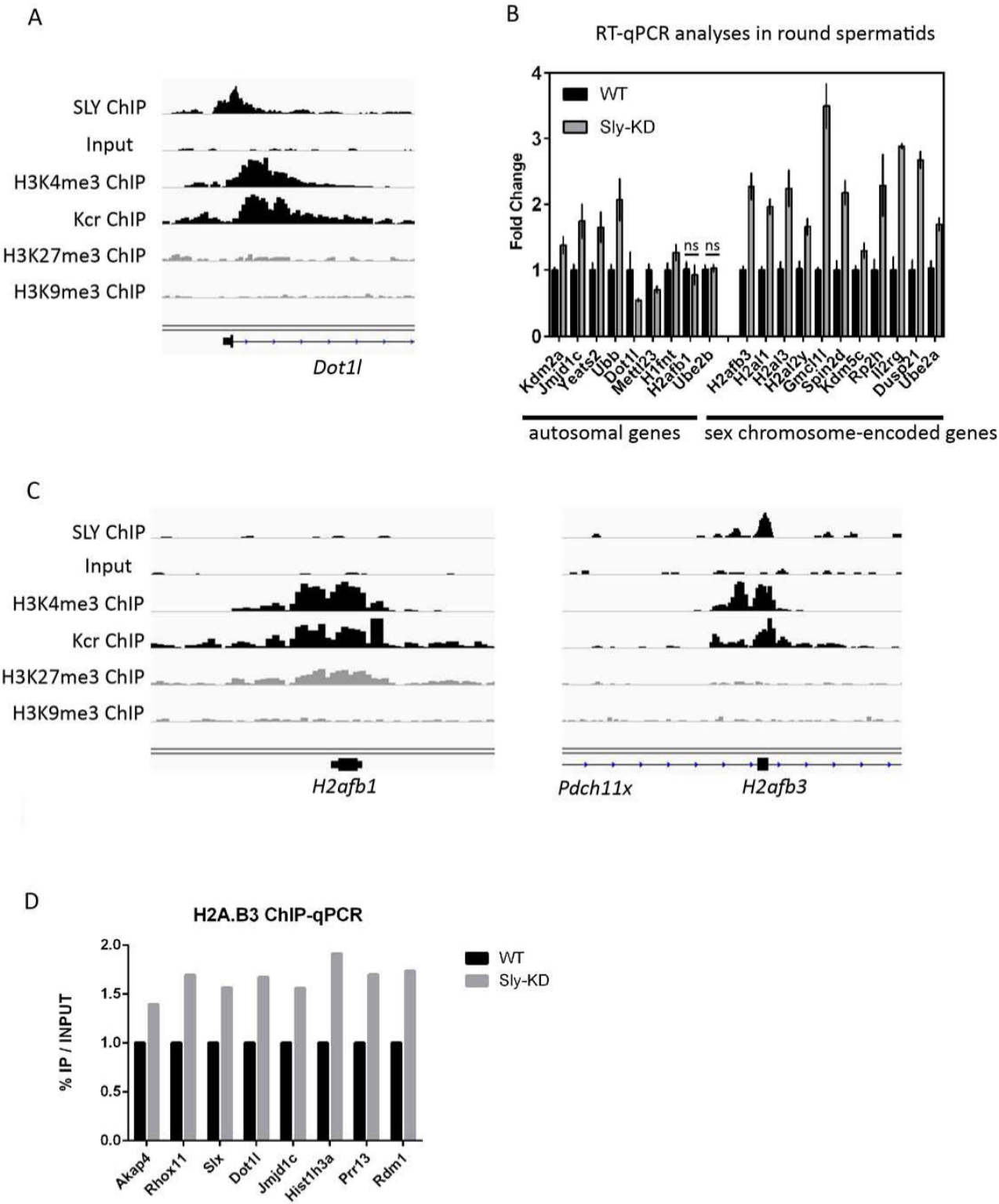


Figure 3. Moretti et al.

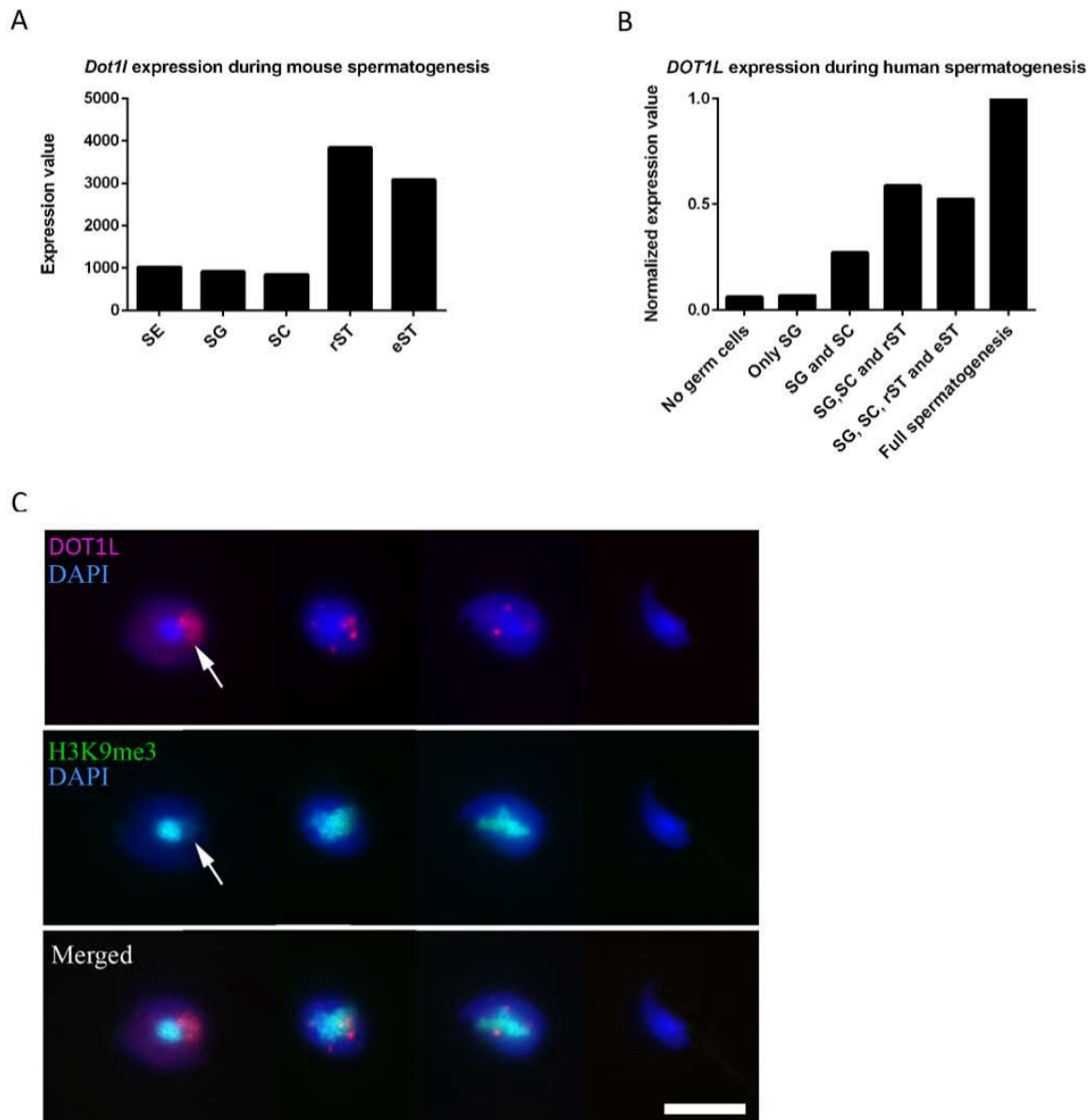


Figure 4. Moretti et al.

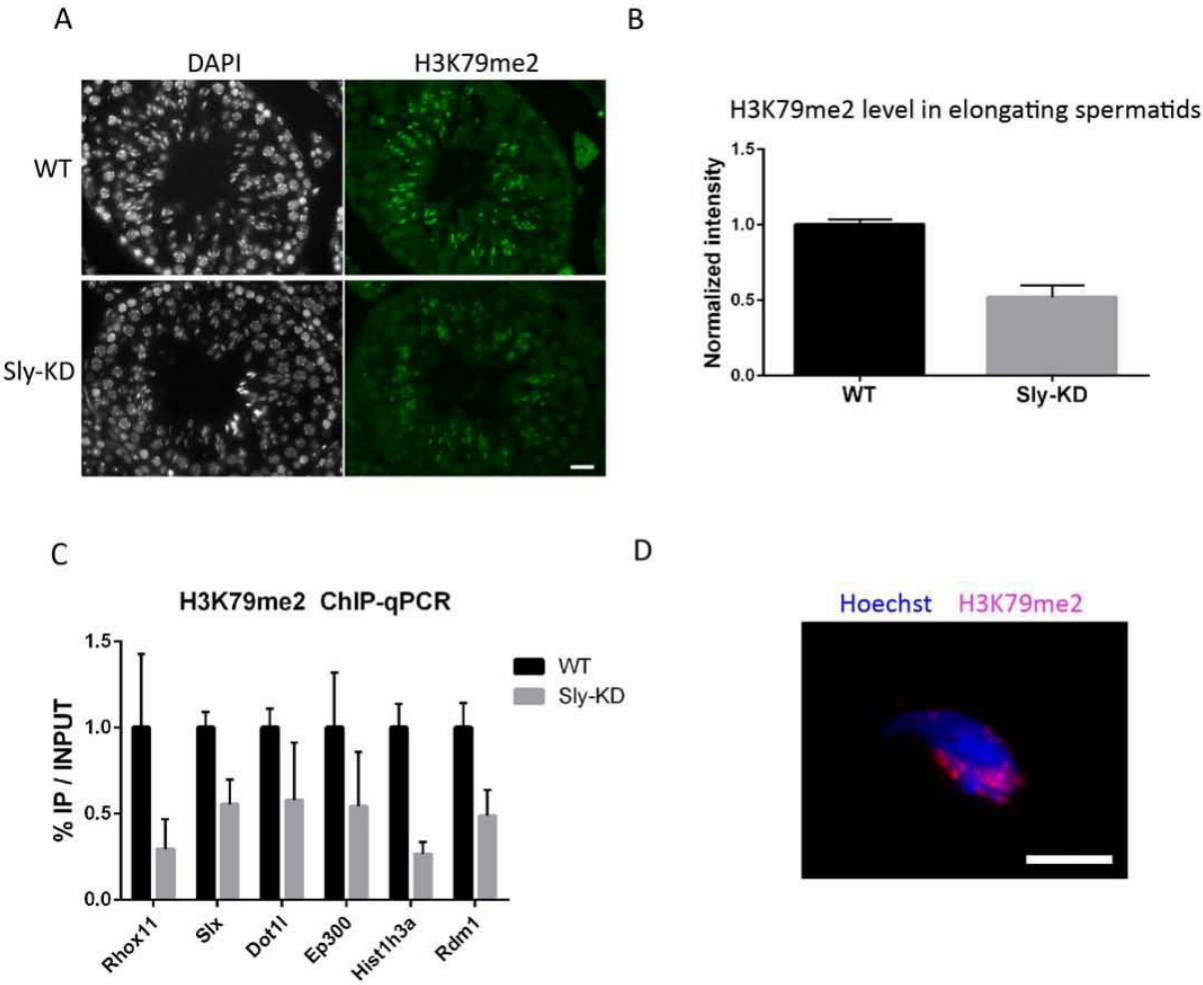


Figure 5. Moretti et al.

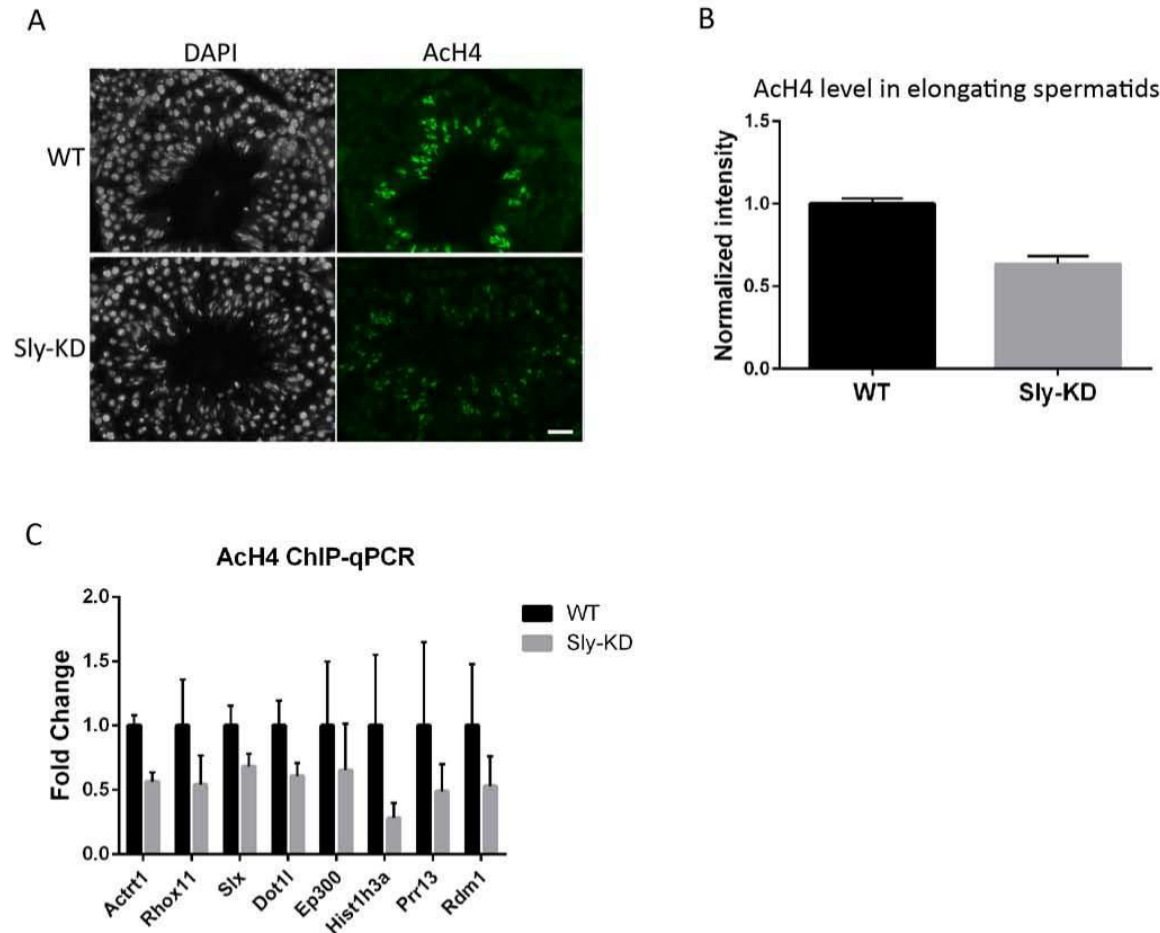


Figure 6. Moretti et al.

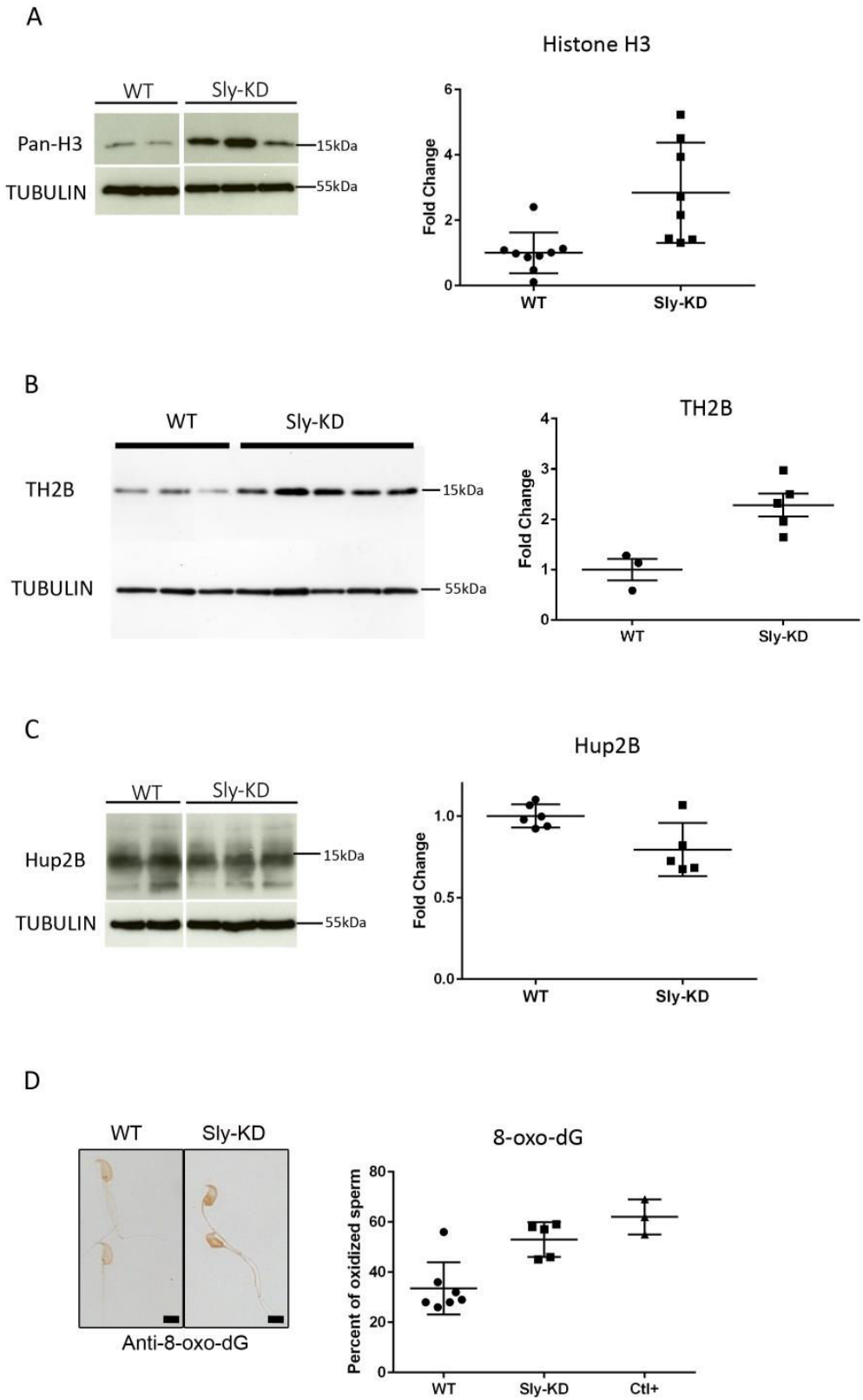


Figure 7. Moretti et al.

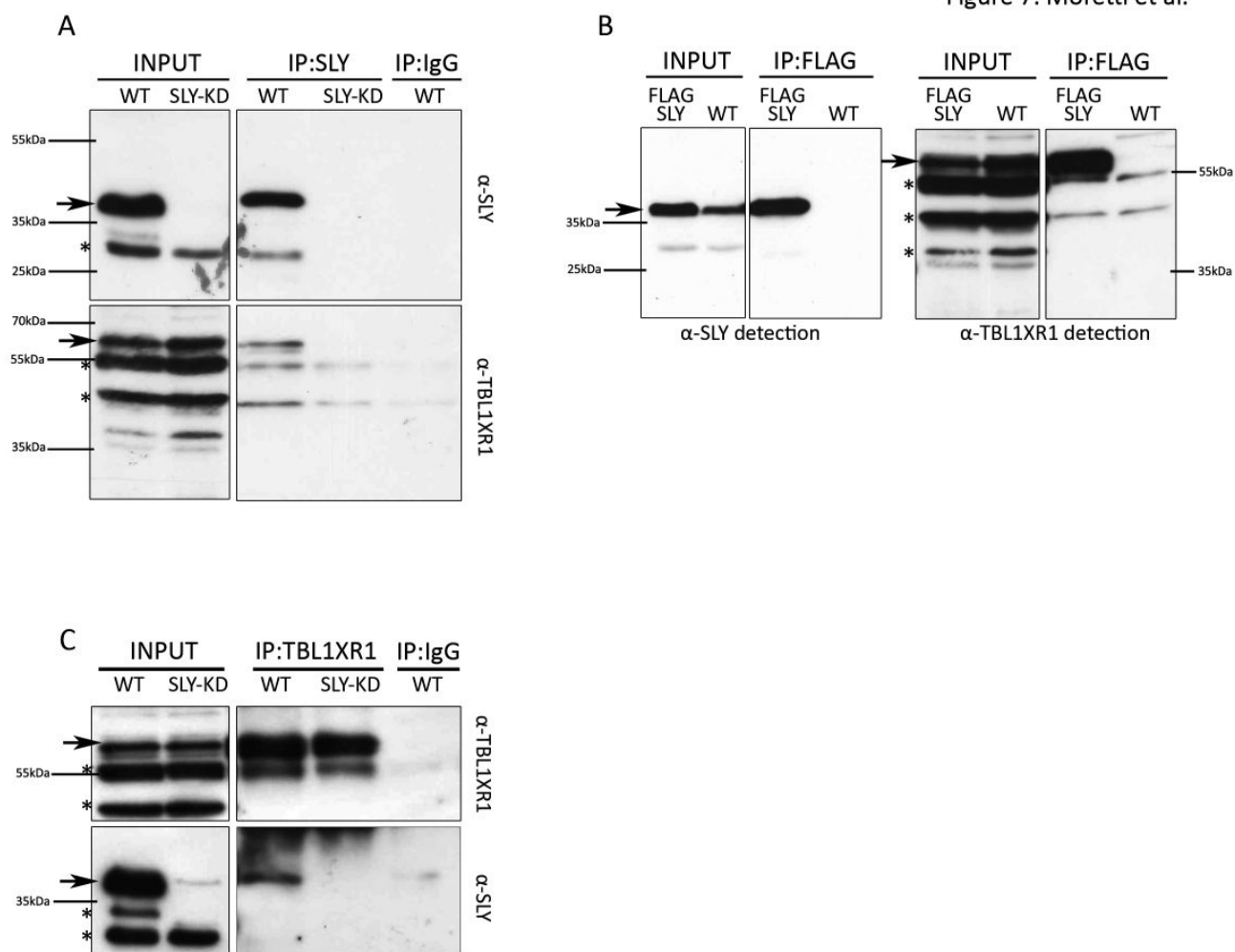
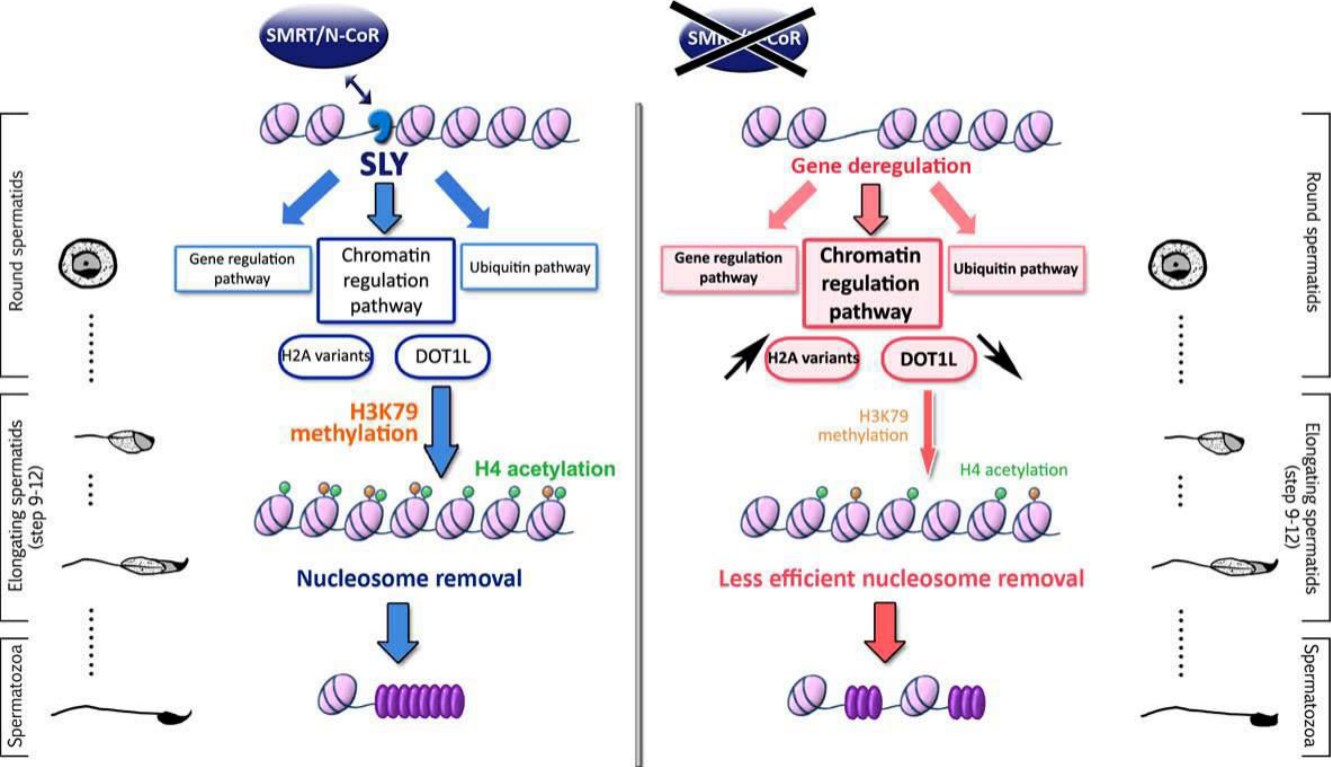


Figure 8. Moretti et al.



Moretti et al.

Supplementary Material

Supplementary Figure 1. SLY ChIP-Seq extended panel.

(A) Graphic representation of the percentage of SLY-enriched genomic regions (pink) and of the genome (blue) which are promoters (i.e. 1kb region upstream of TSS) calculated by Cis-regulatory Element Annotation System (CEAS). P-value for the significance of the relative enrichment with respect to the background was calculated using one-sided binomial test. (B) Graphic representation of the percentage of each chromosome found occupied by SLY protein by ChIP-Seq. (C) Results from ontology analyses of SLY ChIP-Seq genes using Genomatix.

Supplementary Figure 2. SLY co-localizes with active epigenetic marks.

(A) Graphic representation of ChIP-Seq profile showing the average enrichment of SLY, H3K4me3, Kcr, H3K27me3 and H3K9me3 around the TSS of genes expressed (in red) and not expressed (in black) in round spermatids. (B) Percentage of genes with SLY present at their TSS (TSS +/- 500bp) among all mouse genes (mm10 version, in black) or among different categories of genes which are deregulated in Sly-KD spermatids (green or red). For genes significantly deregulated more than 1.5 fold, a higher proportion of upregulated genes (most of them XY-encoded genes) *versus* downregulated genes was found (χ^2 , $p=0.005$). When including all 1,171 significantly deregulated genes (no threshold, $p<0.05$), there were more downregulated than upregulated genes (χ^2 , $p=0.012$). All downregulated genes are autosomal genes. See also Table 2.

Supplementary Figure 3. List of the genes with highest SLY peaks (Top 10%).

Supplementary Figure 4. DOT1L protein pattern of expression in WT and Sly-KD testicular sections.

Representative immunodetection images obtained using antibody against DOT1L protein on testicular sections from wild-type (WT) and Sly-knockdown (Sly-KD) mice, at stage XII (stage

where DOT1L co-localizes with the sex body in spermatocytes), stage IV (where DOT1L is detected in round spermatids) and stage X (where DOT1L is detected in elongating spermatids). The black and white images represent DAPI staining of the nuclei. DOT1L was detected in green. Lectin (red) was used to stain acrosomes in order to determine tubule stage. Pictures were taken using the same image capture parameters. No detectable changes in pattern of expression was observed in Sly-KD versus WT spermatids, but the intensity of DOT1L signal over background in round and elongating spermatids (stage IV and stage X pictures) appears fainter in Sly-KD versus WT sections. Scale bar indicates 20µm.

Supplementary Figure 5. H3K79me2 pattern of expression in WT and Sly-KD testicular sections.

Representative immunodetection images obtained using antibody against H3K79me2 on testicular sections from wild-type (WT) and Sly-knockdown (Sly-KD) mice, at stage X and XI (where H3K79me2 is detected in elongating spermatids) and at stage IV (where H3K79me2 signal is detected in round spermatids). The black and white images represent DAPI staining of the nuclei. H3K79me2 was detected in green. Lectin (red) was used to stain acrosomes in order to determine tubule stage. Pictures were taken using the same image capture parameters. No detectable changes in term of timing of expression was observed in Sly-KD versus WT spermatids, however the intensity of H3K79me2 signal over background in elongating spermatids (stage XII and stage X pictures) is markedly reduced in Sly-KD versus WT sections, as measured in Figure 6. Scale bar indicates 20µm.

Supplementary Figure 6. H3K79me2 quantification by western blot.

(A) Western blot detection of H3K79me2 in protein extracts from WT and Sly-KD (KD) elongating/condensing (ES/CS) spermatids. Antibody against TUBULIN was used to normalize the signal. Since the variability among samples from the same genotype was elevated we show here all the results we obtained in 3 independent experiments. (B) Western blot detection of

H3K79me2 in protein extracts from WT and Sly-KD spermatozoa. A higher proportion of histones (notably of histone H3) is retained in Sly-KD spermatozoa compared to WT spermatozoa (see Figure 7), therefore, we also detected the same protein extracts with anti-Pan-H3 antibody. For both detection (H3K79me2 and Pan-H3), antibody against TUBULIN was used to normalize the signal. (C and D) Schematics showing western blot quantification of H3K79me2 (normalized to TUBULIN level) in Sly-KD and WT elongating/condensing spermatids (C) and in Sly-KD and WT spermatozoa (D). For spermatozoa, normalized H3K79me2 level was reported to that of normalized histone H3 level (detected with Pan-H3 antibody). The graphs represent the mean level +/- standard error of means. The star indicates significant different between the two genotypes by t-test [n = 7-8 samples per genotype, p=0.01 for (C); n= 4-5 samples per genotype, p=0.03 for (D)].

Supplementary Figure 7. H3K79me2 detection in spermatozoa.

Immunofluorescence detection of H3K79me2 (red) in WT epididymal spermatozoa. Hoechst (blue) was used to stain nuclei.

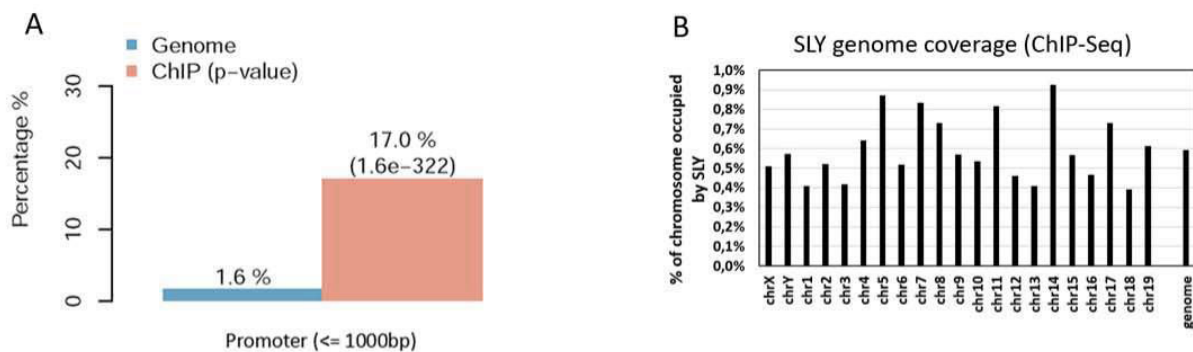
Supplementary Figure 8. Ach4 pattern of expression in WT and Sly-KD testicular sections.

Representative immunodetection images obtained using antibody against Ach4 on testicular sections from wild-type (WT) and Sly-knockdown (Sly-KD) mice, from stage X to XII. The black and white images represent DAPI staining of the nuclei. Ach4 was detected in green. Lectin (red) was used to stain acrosomes in order to determine tubule stage. Pictures were taken using the same image capture parameters. No detectable changes in pattern of expression was observed in Sly-KD versus WT spermatids, however the intensity of Ach4 signal over background in elongating spermatids (stage X to stage XII) is markedly reduced in Sly-KD versus WT sections, as measured in Figure 6. Scale bar indicates 20µm.

Supplementary Figure 9. Characterization of FLAG-SLY transgenic mice.

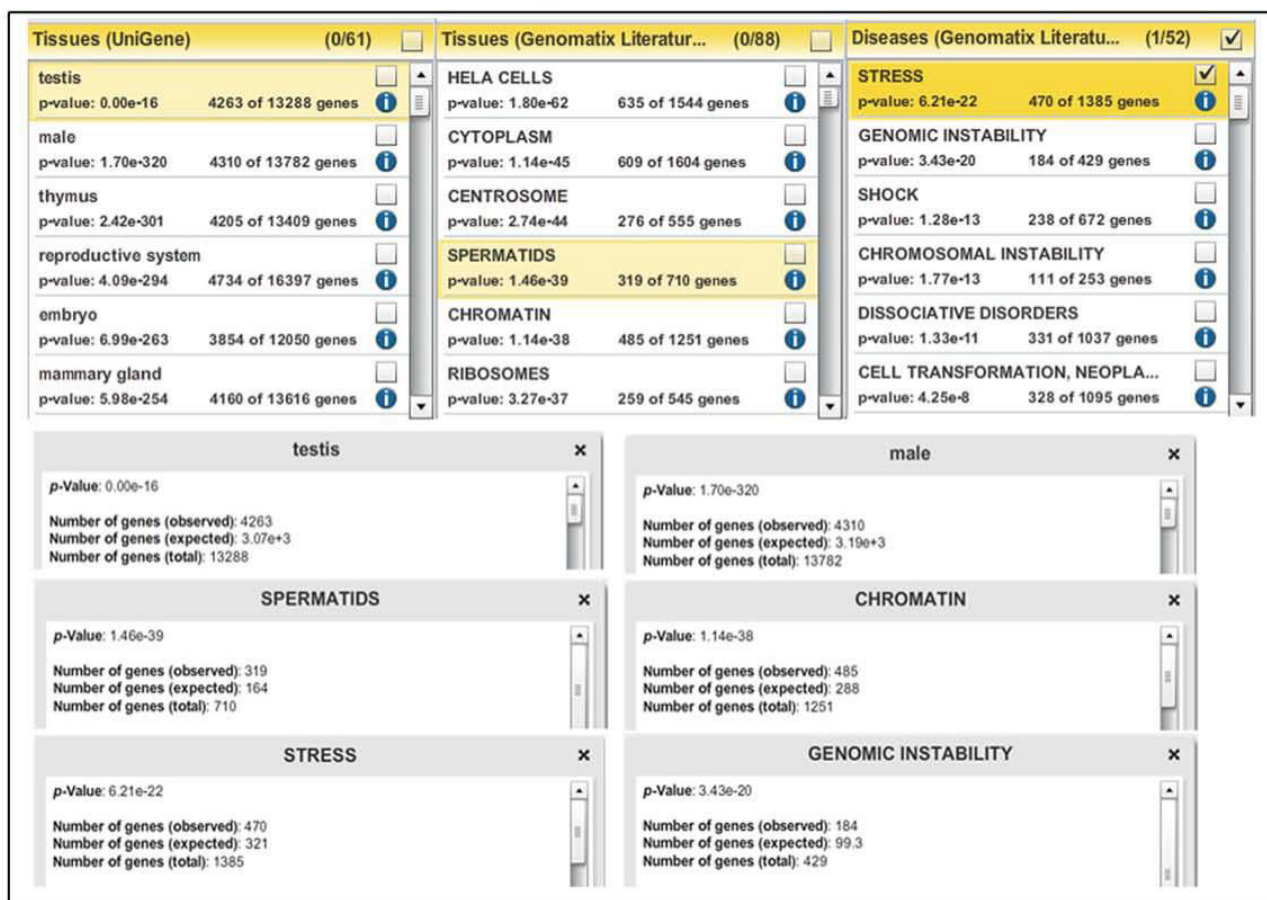
(A) Transcript level of *Sly1* isoform and of *Sly* all isoforms (*Sly* global) measured by RT-qPCR in wild-type (WT) and FLAG-SLY transgenic whole testes. The graph represents the mean $\pm$ standard error of means (after normalization with *Acrv1*, n=4 samples per genotype). A significant difference between FLAG-SLY and WT samples was found by t-tests with both types of primers (p-value<0.0005). (B) Western blot detection of SLY protein in cytosolic and nuclear fractions of adult FLAG-SLY and WT testes, using anti-FLAG, anti-SLY and anti-SLX/SLXL1 antibodies. Anti-FLAG only detects FLAG-SLY recombinant protein. Anti-SLY detects endogenous SLY and FLAG-SLY recombinant protein. Anti-SLX/SLXL1 was used to control the purity of the nuclear fraction. Arrows indicate the specific band (at expected sizes of ~38kDa for SLY/FLAG-SLY, and ~34KDa for SLX/SLXL1) and stars, non-specific bands. Ponceau staining was used to control the quantity of protein loaded in each lane. (C) Immunodetection using antibody against FLAG on stage VII testicular sections from FLAG-SLY and WT mice. FLAG was detected in green. DAPI (in blue) was used to stain the nuclei. Lectin (red) was used to stain acrosomes in order to determine tubule stage. RS indicates 'round spermatids', SC indicates 'spermatocytes'. In the upper panel, the scale bar indicates 20 μ m. The bottom panel represents a 2x magnification of the insets. Pictures were taken using the same image capture parameters. The recombinant FLAG-SLY protein is only detected in FLAG-SLY transgenic round spermatids.

Supplementary Figure 10. List of the primers designed for the present study.



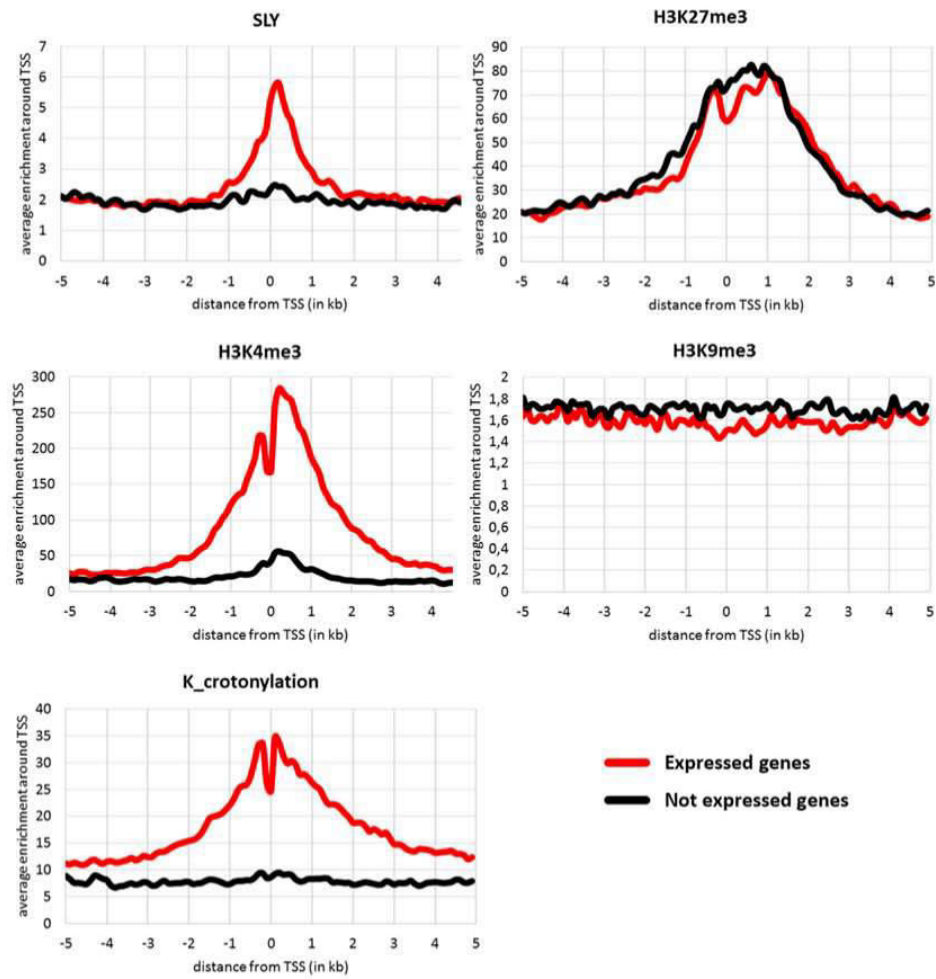
C

Genomatix ontology analysis of SLY ChIP-Seq genes



Supplementary Figure 2 Moretti et al

A



B

Percentage of genes with SLY at their TSS

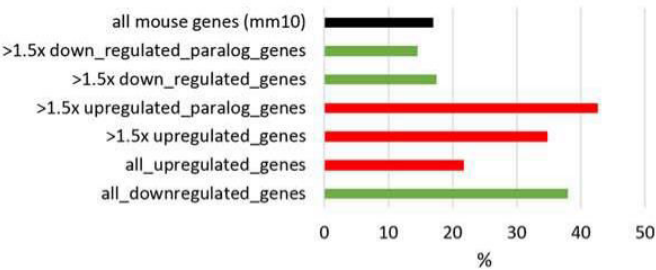


Fig S3. Moretti et al.

chromosome location	gene name	chromosome location	gene name
chr1	4930594C11Rik	chr10	Ctdsp2
chr1	Abl2	chr10	Ddx50
chr1	Actr3	chr10	Dot1l
chr1	Boll	chr10	Dtx3
chr1	Desi2	chr10	Eef2
chr1	Dis3l2	chr10	F420014N23Rik
chr1	Dnah14	chr10	Fzr1
chr1	Efcab2	chr10	Gm8540
chr1	Fbxo28	chr10	Gucd1
chr1	Fbxo36	chr10	Jmjd1c
chr1	Fcgr3	chr10	Lats1
chr1	Gm16067	chr10	Mex3d
chr1	Gm16094	chr10	Pcmt1
chr1	Gm25911	chr10	Pcnt
chr1	Gpatch2	chr10	Pttg1ip
chr1	H3f3a	chr10	Rrp1
chr1	Hjurp	chr10	Snord37
chr1	Inpp4a	chr10	Snrpd3
chr1	Kdm5b	chr10	Snrpf
chr1	Lmbrd1	chr10	Speer5-ps1
chr1	mmu-mir-6546	chr10	Stk11
chr1	Pask	chr10	Uhrf1bp1l
chr1	Ppp1r7	chr11	1700016P03Rik
chr1	Prrc2c	chr11	1700024J04Rik
chr1	Rc3h1	chr11	1700064E03Rik
chr1	Sp110	chr11	1700106J16Rik
chr1	Sp140	chr11	Arhgap23
chr1	Spata17	chr11	Cdk12
chr1	Stk17b	chr11	Cep95
chr1	Suco	chr11	Cltc
chr1	Tor1aip1	chr11	Csnk1d
chr1	Tor1aip2	chr11	Cyb5d1
chr1	Trip12	chr11	Ddx5
chr1	Trpm8	chr11	Efcab5
chr1	Zfp451	chr11	Eif4a1
chr2	1700003F12Rik	chr11	Epn2
chr2	2900097C17Rik	chr11	Gas2l1
chr2	Adnp	chr11	Gga3
chr2	Cse1l	chr11	Ggnbp2
chr2	Ddx31	chr11	Gm11423
chr2	Gabpb1	chr11	Gm12061
chr2	Gm10800	chr11	Gm12204
chr2	Gm10801	chr11	Gm12206
chr2	Gm11458	chr11	Gm12209
chr2	Gm13345	chr11	Gm12279
chr2	Gm13483	chr11	Gsg2
chr2	Gm13532	chr11	Hexim2
chr2	Gm23969	chr11	Jmjd6

chr2	Gm27003	chr11	Kansl1
chr2	GNAS-AS1_4	chr11	Kpna2
chr2	GNAS-AS1_5	chr11	Lig3
chr2	Gtf3c4	chr11	Lsmd1
chr2	Med22	chr11	Med13
chr2	Mllt10	chr11	Mettl23
chr2	Mmadhc	chr11	Mir132
chr2	Naif1	chr11	Mir212
chr2	Nespos	chr11	Mnt
chr2	Ntmt1	chr11	Morc2a
chr2	Odf2	chr11	Mrps7
chr2	Ppp4r1l-ps	chr11	Msl1
chr2	Qsox2	chr11	Nploc4
chr2	Rab22a	chr11	Papolg
chr2	Rpl7a	chr11	Phf23
chr2	Slc25a25	chr11	Poldip2
chr2	Spo11	chr11	Ppp1r9b
chr2	Ttc30a1	chr11	Rptor
chr2	Ttc30b	chr11	Slc43a2
chr2	Zbtb34	chr11	Tekt3
chr2	Zfp335	chr11	Tlk2
chr3	1700125G22Rik	chr11	Tmem199
chr3	4930539J05Rik	chr11	Tmem88
chr3	4930577N17Rik	chr11	Tug1
chr3	4933429H19Rik	chr11	TUG1_1
chr3	Adad1	chr11	Ubb
chr3	Arnt	chr11	Ube2b
chr3	Atxn7l2	chr11	Ubtd2
chr3	Chtop	chr11	Ulk2
chr3	Ect2	chr11	Usp34
chr3	Elf2	chr11	Ybx2
chr3	Gar1	chr12	4930555J06Rik
chr3	Gm17402	chr12	Angel1
chr3	Gm20632	chr12	Arl4a
chr3	Hist2h2aa2	chr12	Cpsf2
chr3	Hist2h3c2	chr12	Crip2
chr3	Hspa4l	chr12	D130020L05Rik
chr3	Mfn1	chr12	Dcaf5
chr3	Mlf1	chr12	Eif5
chr3	Mtx1	chr12	Hsp90aa1
chr3	Naa15	chr12	Otub2
chr3	Pgrmc2	chr12	Pnpla8
chr3	Polr3c	chr12	Rab10
chr3	Pygo2	chr12	Rtn1
chr3	Rnf115	chr12	Smek1
chr3	Rsbn1	chr12	Tmed10
chr3	Sec62	chr12	Wdr20a
chr3	Thbs3	chr12	Yy1
chr3	Ube2d3	chr12	Zc3h14
chr4	1700095A21Rik	chr13	Arid4b

chr4	2610301B20Rik	chr13	BC005537
chr4	4933438K21Rik	chr13	Btf3
chr4	Akirin2	chr13	Fars2
chr4	D4Wsu53e	chr13	Ggps1
chr4	Fam229a	chr13	Gm24187
chr4	Fam76a	chr13	Gm9828
chr4	Gm10580	chr13	Hnrnpk
chr4	Gm12905	chr13	Lyrn4
chr4	Gm13034	chr13	Nup153
chr4	Gm13135	chr13	Rmi1
chr4	Gm13136	chr13	Rnf44
chr4	Gm13140	chr13	Ssr1
chr4	Gm13165	chr14	1700001F09Rik
chr4	Gm13169	chr14	1700049E17Rik1
chr4	Gm13231	chr14	1700049E17Rik2
chr4	Gm13236	chr14	1700091H14Rik
chr4	Gm13238	chr14	3110083C13Rik
chr4	Gm13241	chr14	4930444M15Rik
chr4	Gm13275	chr14	4931440J10Rik
chr4	Gm13278	chr14	BC061237
chr4	Gm13285	chr14	D14Abb1e
chr4	Gm13287	chr14	Ddhd1
chr4	Gm13288	chr14	Fgf9
chr4	Gm13289	chr14	Gm10128
chr4	Gm13290	chr14	Gm10340
chr4	Gm21953	chr14	Gm10375
chr4	Gm21980	chr14	Gm10376
chr4	Gm26525	chr14	Gm10377
chr4	Gm26606	chr14	Gm15918
chr4	Gm26763	chr14	Gm16241
chr4	Gm26867	chr14	Gm16506
chr4	Lrrc41	chr14	Gm17026
chr4	Mycbp	chr14	Gm17027
chr4	Pigv	chr14	Gm17078
chr4	Rbm12b1	chr14	Gm17079
chr4	Rbm12b2	chr14	Gm17093
chr4	Sfpq	chr14	Gm17124
chr4	Smarca5-ps	chr14	Gm17174
chr4	Spata6	chr14	Gm17175
chr4	Tmem222	chr14	Gm17654
chr4	Tmem67	chr14	Gm21560
chr4	Tssk3	chr14	Gm21738
chr4	Ube2j2	chr14	Gm21754
chr4	Uqcrh	chr14	Gm21977
chr4	Vcp	chr14	Gm2237
chr4	Zcchc11	chr14	Gm2832
chr4	Zfp37	chr14	Gm2930
chr5	4930449I24Rik	chr14	Gm2951
chr5	4930572O03Rik	chr14	Gm2974
chr5	5031410I06Rik	chr14	Gm3002

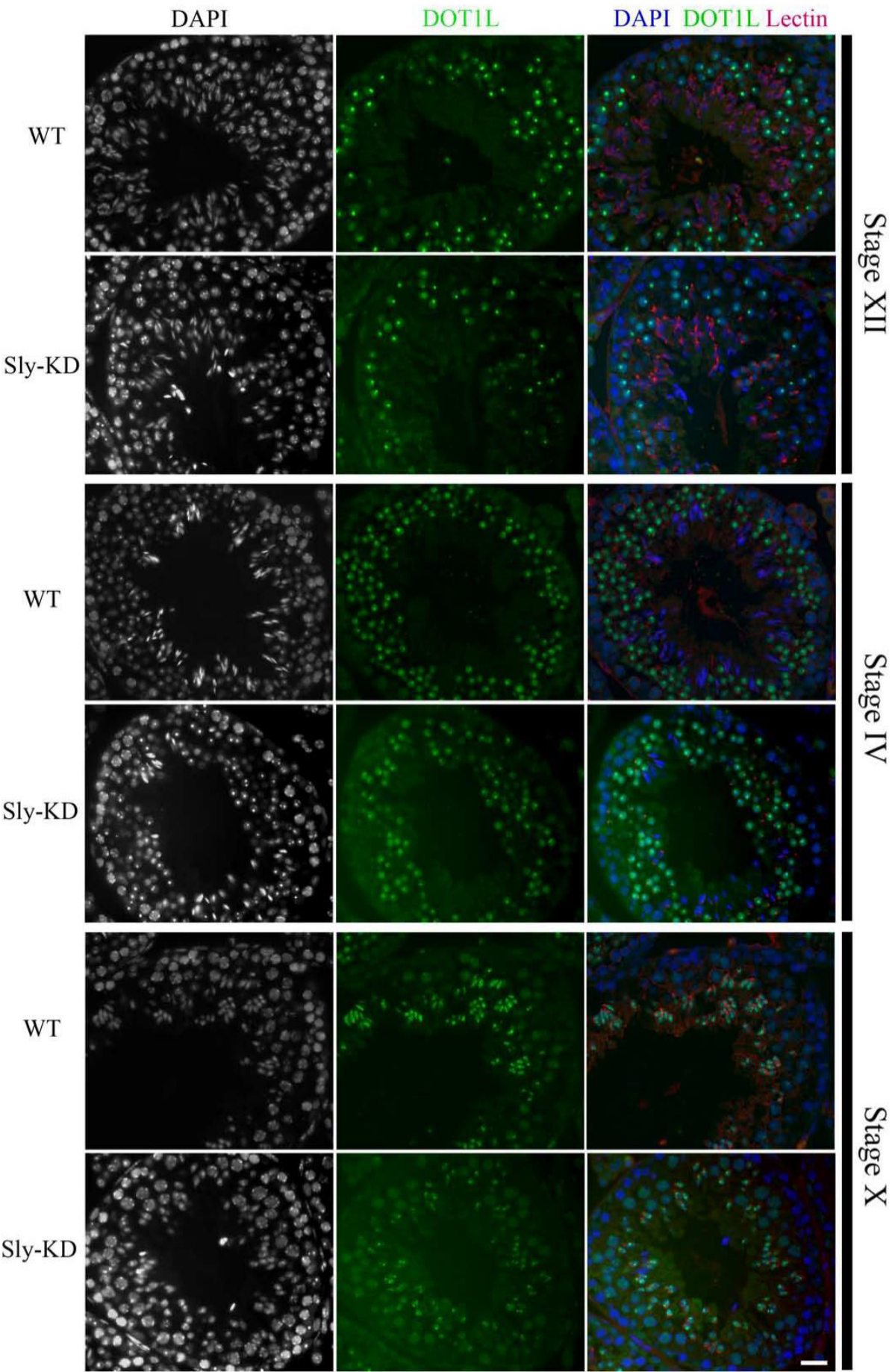
chr5	Abcf2	chr14	Gm3012
chr5	Adap1	chr14	Gm3015
chr5	Atxn2	chr14	Gm3072
chr5	D5Erttd579e	chr14	Gm3095
chr5	Dynll1	chr14	Gm3115
chr5	Erp29	chr14	Gm3141
chr5	Gm10220	chr14	Gm3173
chr5	Gm10354	chr14	Gm3239
chr5	Gm10382	chr14	Gm3264
chr5	Gm10471	chr14	Gm3298
chr5	Gm13830	chr14	Gm3317
chr5	Gm17019	chr14	Gm3327
chr5	Gm1979	chr14	Gm3373
chr5	Gm21655	chr14	Gm3411
chr5	Gm21671	chr14	Gm3453
chr5	Gm21698	chr14	Gm3468
chr5	Gm23866	chr14	Gm3486
chr5	Gm3402	chr14	Gm3500
chr5	Gm3409	chr14	Gm3543
chr5	Gm3415	chr14	Gm3573
chr5	Gm3495	chr14	Gm3591
chr5	Gm5862	chr14	Gm3629
chr5	Gm6272	chr14	Gm3633
chr5	Gm6370	chr14	Gm3636
chr5	Gm7347	chr14	Gm3676
chr5	Gm7361	chr14	Gm3696
chr5	Gm9758	chr14	Gm4181
chr5	Gtf2ird2	chr14	Gm5798
chr5	Iscu	chr14	Gm5799
chr5	Kctd10	chr14	Gm5929
chr5	Mlec	chr14	Gm6337
chr5	Nudt9	chr14	Gm6356
chr5	Nupr1l	chr14	Gm6401
chr5	Rab28	chr14	Gm6482
chr5	Radil	chr14	Gm7233
chr5	Sart3	chr14	Gm7929
chr5	Sfswap	chr14	Gm7945
chr5	Sgcb	chr14	Gm7951
chr5	Smim14	chr14	Gm7954
chr5	Spata18	chr14	Gm7970
chr5	Speer4a	chr14	Gm7980
chr5	Speer4b	chr14	Gm8005
chr5	Speer4c	chr14	Gm8011
chr5	Speer4d	chr14	Gm8020
chr5	Speer4e	chr14	Gm8024
chr5	Speer4f	chr14	Gm8032
chr5	Tmem116	chr14	Gm8068
chr5	Ubc	chr14	Gm8082
chr5	Ube2k	chr14	Gm8094
chr5	Ube3b	chr14	Gm8104

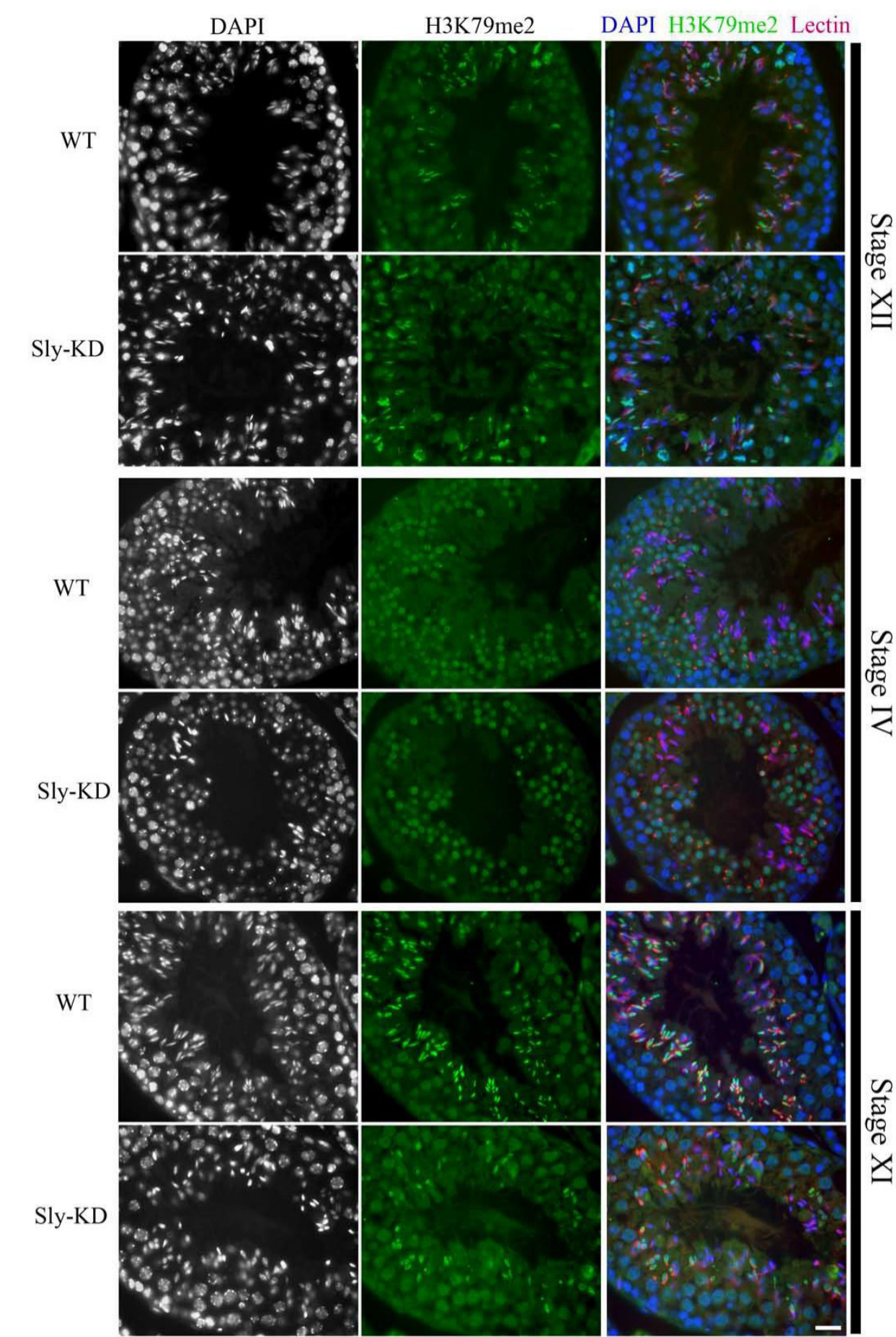
chr5	Wbscr27	chr14	Gm8108
chr5	Ythdc1	chr14	Gm8122
chr5	Zcchc8	chr14	Gm8126
chr6	1600020E01Rik	chr14	Gm8127
chr6	1700095J07Rik	chr14	Gm8138
chr6	4933440N22Rik	chr14	Gm8165
chr6	BC049715	chr14	Gm8180
chr6	Ccdc91	chr14	Gm8212
chr6	Chd4	chr14	Gm8220
chr6	Cntnap2	chr14	Gm8229
chr6	Gm24975	chr14	Gm8232
chr6	Gm6288	chr14	Gm8247
chr6	Gm7292	chr14	Gm8256
chr6	Hnrnpf	chr14	Gm8281
chr6	mmu-mir-7045	chr14	Gm9611
chr6	Pcbp1	chr14	Ints6
chr6	Tra2a	chr14	Micu2
chr6	Ube2h	chr14	Mir5131
chr6	Wbp11	chr14	Mphosph8
chr7	1700081H22Rik	chr14	Mtmr6
chr7	Aamdc	chr14	Nr1d2
chr7	Akt2	chr14	Ppp2r2a
chr7	Aspdh	chr14	Pxk
chr7	Atf5	chr14	Tmem254a
chr7	Atxn2l	chr14	Tmem254b
chr7	Bcam	chr14	Tmem254c
chr7	Catsperg1	chr14	Tsc22d1
chr7	Cdipt	chr14	Xkr6
chr7	Clpb	chr14	Zmym2
chr7	D430042O09Rik	chr15	1810049J17Rik
chr7	D830044I16Rik	chr15	2410089E03Rik
chr7	Dyrk1b	chr15	Azin1
chr7	E130304I02Rik	chr15	Ep300
chr7	Erccl	chr15	Gm23880
chr7	Erf	chr15	Gm26884
chr7	Fus	chr15	Golph3
chr7	Galp	chr15	Gtpbp1
chr7	Gm5591	chr15	Lmbr1l
chr7	Gm6605	chr15	Muc19
chr7	Grik5	chr15	Nhp2l1
chr7	Gtf3c1	chr15	Nup50
chr7	Il4i1	chr15	Rad21
chr7	Josd2	chr15	Rgs22
chr7	Klc3	chr15	Ywhaz
chr7	Mapk1ip1	chr15	Zfr
chr7	Med25	chr16	Eaf2
chr7	mmu-mir-7052	chr16	Gm23935
chr7	Nup62	chr16	Golgb1
chr7	Pcf11	chr16	Golgb1
chr7	Pex11a	chr16	Lca5l

chr7	Pnmal2	chr16	Mpv17l
chr7	Ppp1r37	chr16	Pdxdc1
chr7	Ppp2r2d	chr16	Ppp1r2
chr7	Rbbp6	chr16	Ptplb
chr7	Rsf1	chr16	Setd4
chr7	Ube2s	chr16	Ube2l3
chr7	Wdr93	chr16	Yeats2
chr7	Zc3h4	chr17	Aars2
chr7	Zfp446	chr17	Agpat1
chr7	Zfp507	chr17	Ati2
chr7	Zfp646	chr17	AY036118
chr7	Zfp668	chr17	Btbd9
chr8	2610005L07Rik	chr17	Dnah8
chr8	4930467E23Rik	chr17	Dynlt1c
chr8	Acsl1	chr17	Fgfr1op
chr8	Agpat6	chr17	Flywch1
chr8	Amfr	chr17	Gm16275
chr8	Ap1g1	chr17	Gm17705
chr8	C330011M18Rik	chr17	Gm20427
chr8	Cdkn2aip	chr17	Gm26917
chr8	Cnep1r1	chr17	Gm26924
chr8	Csnk2a2	chr17	Hsp90ab1
chr8	E030037K01Rik	chr17	mmu-mir-6968
chr8	Evi5l	chr17	Nfya
chr8	Fam192a	chr17	Oard1
chr8	Gm15319	chr17	Phf1
chr8	Gm20946	chr17	Phf10
chr8	Gm21092	chr17	Ppp1r2-ps1
chr8	Gm21119	chr17	Prrc2a
chr8	Gm21769	chr17	Rnf5
chr8	Gm22291	chr17	RP24-271E12.4
chr8	Gm23284	chr17	Rxrb
chr8	Gm23647	chr17	Slc39a7
chr8	Gm25212	chr17	Tagap1
chr8	Gm2716	chr17	Tbc1d22b
chr8	Gm9725	chr17	Tmem217
chr8	Gtl3	chr17	Trim39
chr8	n-R5s144	chr17	Ube2i
chr8	n-R5s146	chr17	Zfand3
chr8	n-R5s149	chr18	Atp9b
chr8	Rfx1	chr18	Fam53c
chr8	Rspry1	chr18	Ndfip1
chr8	Smarca5	chr18	Pqlc1
chr8	Tmem66	chr18	Rnf138
chr8	Usp38	chr18	Sil1
chr8	Znrf1	chr19	4930505N22Rik
chr9	4930535L15Rik	chr19	9130011E15Rik
chr9	Arcn1	chr19	Al846148
chr9	Dalrd3	chr19	Cfl1
chr9	Dennd4a	chr19	Cnih2

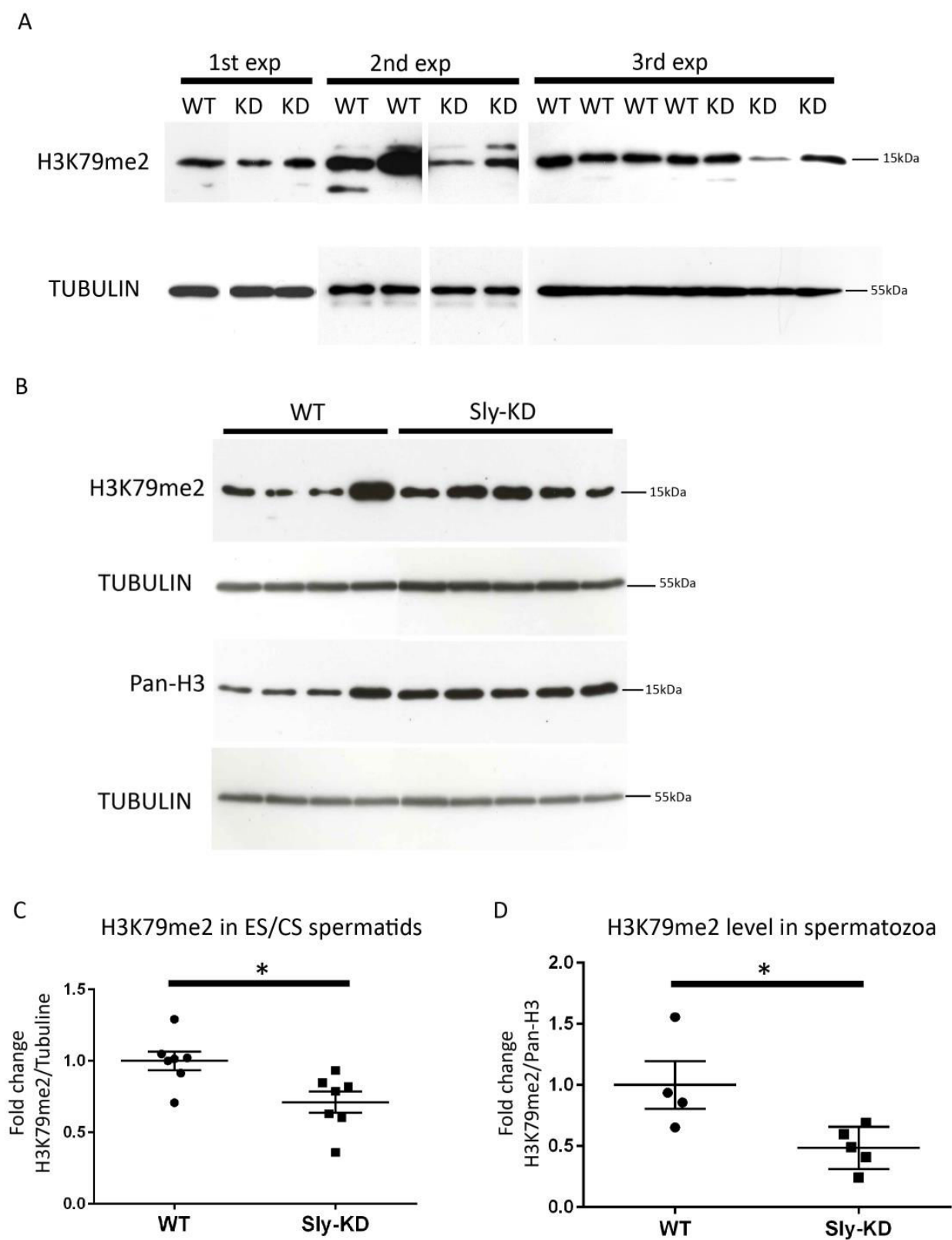
chr9	Dnaja4	chr19	Dpf2
chr9	Elovl5	chr19	Frat2
chr9	Fbxl12	chr19	Gm15491
chr9	Gm24083	chr19	Hnrnpul2
chr9	Gm24270	chr19	Kdm2a
chr9	Gtf2a2	chr19	Lrrc10b
chr9	Ift46	chr19	Mgea5
chr9	Ip6k1	chr19	mmu-mir-8092
chr9	Kif9	chr19	Naa40
chr9	Klhl18	chr19	Npm3
chr9	Map2k5	chr19	Pcgf6
chr9	Map4	chr19	Ppp1r2-ps3
chr9	Mir425	chr19	Ppp6r3
chr9	mmu-mir-6236	chr19	Stip1
chr9	Ndutfaf3	chr19	Suv420h1
chr9	Osbp110	chr19	Ttc9c
chr9	Pkm	chr19	Zfp518a
chr9	Prdm10	chrX	Alg13
chr9	Senp6	chrX	Asmt
chr9	Sept7	chrX	Gm14819
chr9	Sltm	chrX	Gm21887
chr9	Ubl5	chrX	Gm2825
chr10	2510003E04Rik	chrX	Gm5073
chr10	4933403O03Rik	chrX	Gm5123
chr10	4933406P04Rik	chrX	Gm5755
chr10	4933408J17Rik	chrX	Supt20-ps
chr10	Ap3d1	chrY	Erdr1
chr10	Bclaf1	chrY	Gm21572
chr10	Btg1	chrY	Gm21599
chr10	Cirbp	chrY	Gm21780

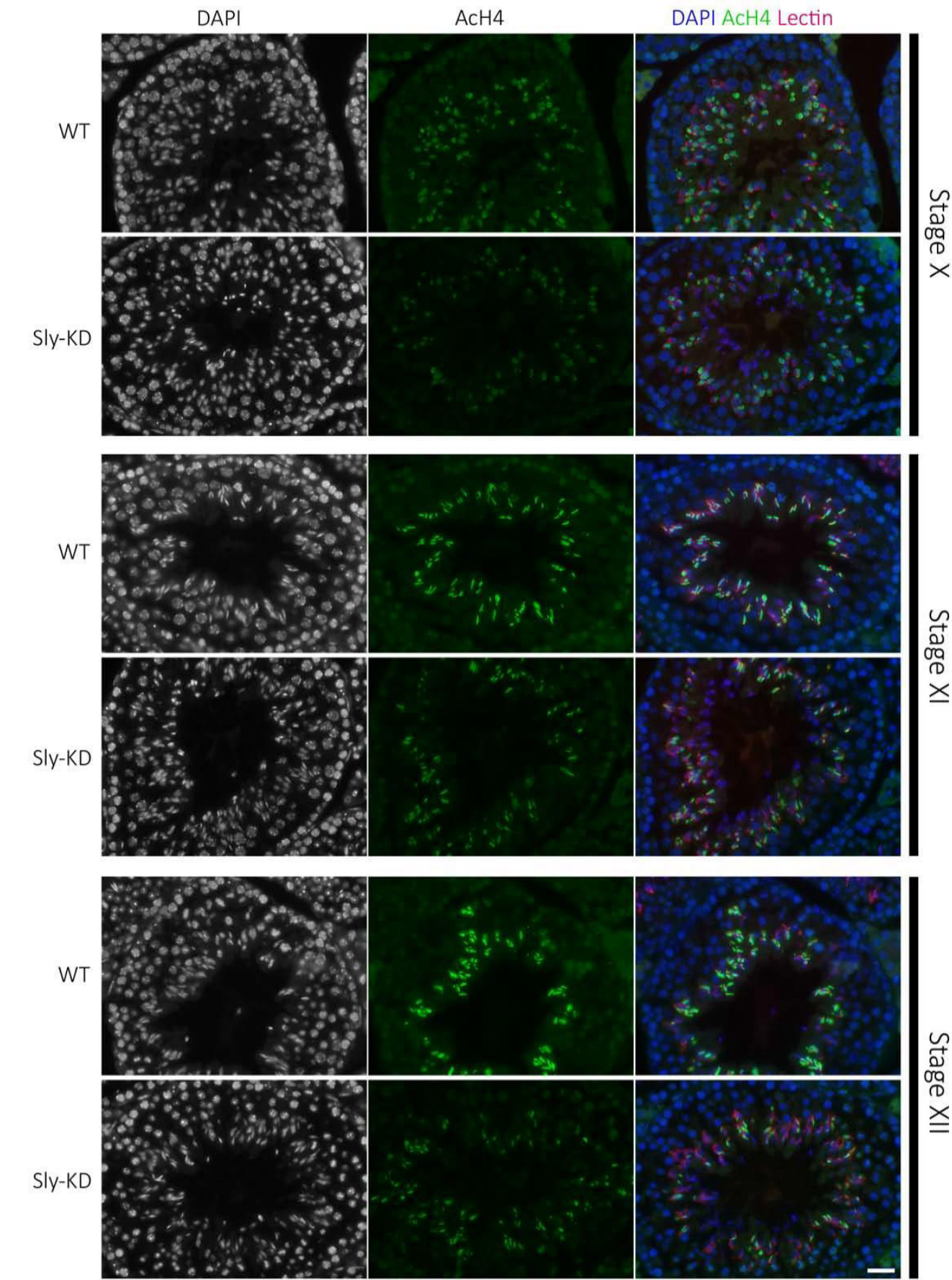
Supplementary Figure 4 Moretti et al





Supplementary Figure 6 Moretti et al







Supplementary Figure 10. List of primers designed for the study.

Primers used for RTqPCR

Gene	Primer sequence	Location	Annealing T°C
Gmcl1l	GCAGACTACAGCAATGCCTC ATCCCTGCAACTCAAGACCC	gene	60°C
Il2rg	GTTGGTTGGAACGAATGCCT CACTCCAGGCCGAAAAGTTC	gene	60°C
Dusp21	TGGTGCCCGAGGAATCTAGTG TGGGTAGCTTGAGACGAAA	gene	60°C
Spin2d	ACTATCTCTGGCAGCAGGAC GATCTGCTCTCTGCCTCTT	gene	60°C
Rp2h	TGTGCCTAGCCTACCATCAG ATTATACCTGCCCTGCCAGC	gene	60°C
Ube2a	ACCGCGGACCCTGGTATATG CCAAAAATGACCGCATTCCA	gene	60°C
Ube2b	CGCCCCATCTGAAAACAACA TGGGACTCCATCGATTCTGC	gene	60°C
Kdm2a	CAGGTTGGATTCTGCTGTG GGATCGGTTGGTTATGCAGT	gene	60°C
Yeats2	TGTGGAAGTTAGAGAGCCCC TCAGGAACAACGCTCTGCTAC	gene	60°C
Ubb	ACTCTGCACTTAGCCACTT GCTTACCATGCAACAAAACCT	gene	60°C
Mettl23	GCTGTAGTCTTGCCCAATA GCAGCCAAAATCCCAGGAAG	gene	60°C
H2a13	AGCCAACATCAACAACGAGC GTCCAGGCATCTCGTCAAC	gene	60°C

Primers used for ChIPqPCR

Name	Primer sequence	Location	Annealing T°C
SlxChIP	CATTCTCTACGCCACTCC CCTTAGGGTCCAACCTTGTCG	TSS (420 bp downstream TSS)	55°C
RbmxChIP	ACAGGCCAAGGAAAGGAAAGT TCCTTTGTTCCGCTCGTTG	TSS (42 bp downstream TSS)	55°C
Rhox11ChIP	GACCACTCTGTGGTTTCCA AAGTTCTACCCGTGTGTGC	TSS (flanking TSS)	55°C
Ctag2ChIP	CTTTCAAACAAGGGCCCA ATCTCCCCCTGTGTGCTTTT	TSS (42 bp upstream TSS)	55°C
H2afb3ChIP	CAGAGTGCGATGTCACAGGA GTCCGGTACAAAGGAGACA	TSS (8 bp upstream TSS)	55°C
Hist1h3aChIP	GAGGCTAAGGTAGTCTGCCG CTGGCCTACTCTCTCAATGT	TSS (118bp upstream TSS)	55°C
Jmjd1cChIP	ATCCCTGGAAAACGGCAGAT ACTTCCCGTCCAATCACAACA	TSS (850bp upstream TSS)	55°C
Dot1lChIP	GGGATTCTTGCCTTTCGTG CCCCTGACTTCTAGGGTTCT	TSS (541 bp downstream TSS)	55°C
NC	TGGCATTGTGGGCTAGATT TGGAGATAAGATATGCGTCAAG	intragenic (170kb downstream TSS)	55°C
Ep300ChIP	AAACTCTCATCTCCGGCCCT AGCACCTGGAATGAAGGTG	TSS (463 bp downstream TSS)	55°C
Rdm1ChIP	CAACCAAACTTCTCGGCCTC CCCCATACACTCAACACCGA	TSS (flanking TSS)	55°C
Prr13ChIP	GCAACGGTTTCCTCTTGTT TCAGTCTGGGTTCCGACTTC	TSS (35 bp downstream TSS)	55°C

RÉSULTATS NON-PUBLIÉS

RÉSULTATS NON-PUBLIÉS

1. SLX/SLXL1 sont enrichies sur la chromatine en l'absence de SLY

Les données obtenues par Cocquet et al. [194] suggèrent l'existence d'un conflit intra-génomique entre les gènes multicopies SLX/SLXL1 et SLY. Les mécanismes sous-jacents à ce conflit sont encore inconnus. Souhaitant mieux caractériser le rôle des protéines SLX/SLXL1 au sein de ce conflit, nous avons décidé d'étudier son comportement en présence ou en l'absence de la protéine SLY. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies de séquençage à haut débit (ChIP-Seq pour *Chromatin Immunoprecipitation followed by Sequencing*) ont été effectuées sur des spermatides rondes purifiées issues de souris sauvages et de souris déficientes en SLY (Sly-KD, également appelées shSLY précédemment).

Dans des spermatides WT, les protéines SLX/SLXL1 sont principalement présentes sur les chromosomes 5 et 14. En l'absence de son homologue SLY, SLX/SLXL1 sont systématiquement enrichies sur les chromosomes. Cet enrichissement est remarquable et sans ambiguïté : les protéines SLX/SLXL1 sont au moins 80 fois plus présentes sur les chromosomes sexuels des spermatides issues de souris Sly-KD par rapport à des spermatides issues de souris sauvages (**Figure 49**).

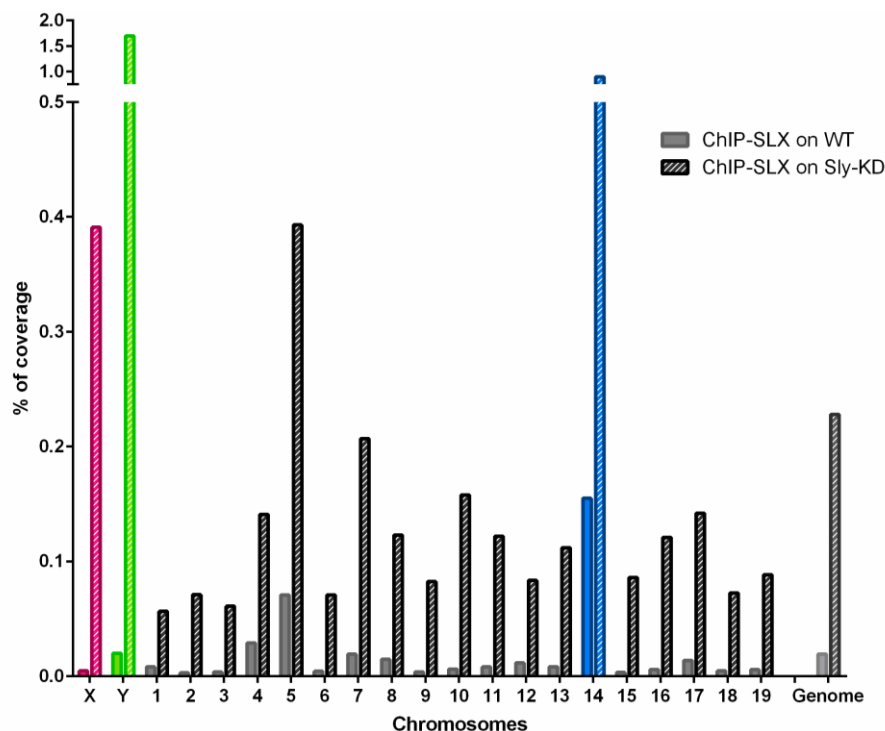


Figure 49. SLX/SLXL1 sont enrichies sur les chromosomes en l'absence de SLY. Le pourcentage de couverture des protéines SLX/SLXL1 sur les chromosomes sexuels et autosomaux est représenté en ordonnée. Les données provenant de la ChIP-

SLX/SLXL1 (ChIP-SLX) effectuée sur des souris WT sont représentées sous la forme d'histogrammes pleins. Les données provenant de la ChIP-SLX/SLXL1 (ChIP-SLX) effectuée sur les souris Sly-KD sont représentées sous la forme d'histogrammes hachurés.

Contrairement à la protéine SLY (**Figure 50c**), uniformément présente sur les gènes des autosomes et des chromosomes sexuels, les protéines SLX/SLXL1 se lient préférentiellement aux chromosomes 5, 14 et Y dans les noyaux issus de souris sauvages, et dans une moindre mesure sur le chromosome X (test du χ^2 ; chrs 5, 14 et Y vs. autosomaux et chrs X, $p < 0.05$; chrs X vs chrs 3 et 6, $p < 0.05$; chrs X vs chrs 13, $p > 0.05$) (**Figure 50a**). Le pourcentage de gènes occupés par SLX/SLXL1 est globalement augmenté en l'absence de SLY (test du χ^2 : WT vs. Sly-KD pour chaque chromosome, $p < 0.05$) (**Figure 50a-b**). Il est également intéressant de noter qu'en l'absence de SLY, le chromosome X est significativement enrichi en SLX/SLXL1 par rapport aux autosomes (test du χ^2 : X vs. chrs 3, 6 et 17, $p < 0.001$) (**Figure 50a-b**). Dans les spermatides issues de souris Sly-KD, le chromosome 5 ne se démarque plus des autosomes (test du χ^2 : chrs 5 vs. chrs 18, $p = 0.24$) (**Figure 50a-b**).

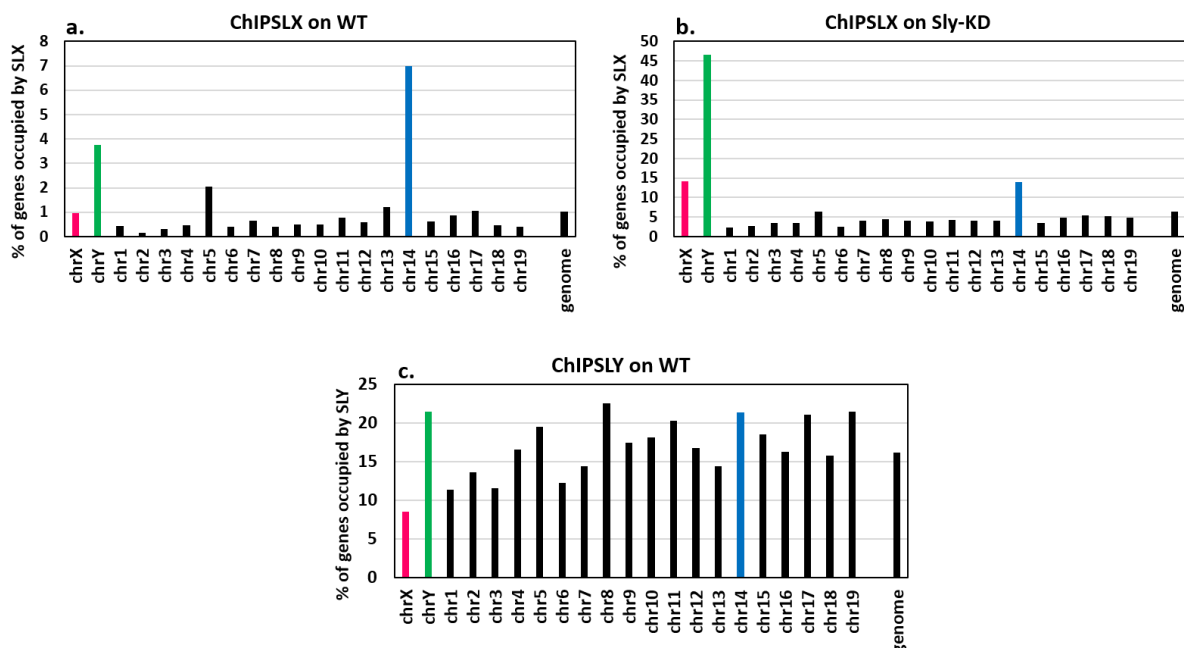


Figure 50. La proportion de gènes contenant SLX/SLXL1 est significativement augmentée en l'absence de SLY. Représentation graphique du pourcentage de gènes. **a et b.** Jeux de données provenant des expériences de ChIP anti-SLX/SLXL1 sur des spermatides rondes sauvages (ChIP-SLX on WT) ou déficientes pour SLY (ChIP-SLX on Sly-KD). **c.** Jeux de données provenant des expériences de ChIP anti-SLY sur des spermatides rondes sauvages (ChIP-SLY on WT). Les données de ChIP-SLY sont extraites du papier n°3 de ce manuscrit.

Les protéines SLY et SLX/SLXL1 sont présentes au niveau des gènes exprimés pendant la spermiogenèse (**Figure 51a**). Plus particulièrement, ces deux protéines sont particulièrement enrichies sur les gènes multicopies α -takusan précédemment identifiés (cf.

article n°2 de ce manuscrit), sur un ensemble de gènes multicopies du chromosome X (**Figure 51a-b**), et également sur le cluster des gènes *Speer* regroupés sur le chromosome 5 (**Figure 51a**). Alors que SLX/SLXL1 sont presque totalement absentes des régions ampliconiques du chromosome X, l'enrichissement de SLX/SLXL1 sur ces régions devient nettement plus marqué en l'absence de SLY (**Figure 51a-b**).

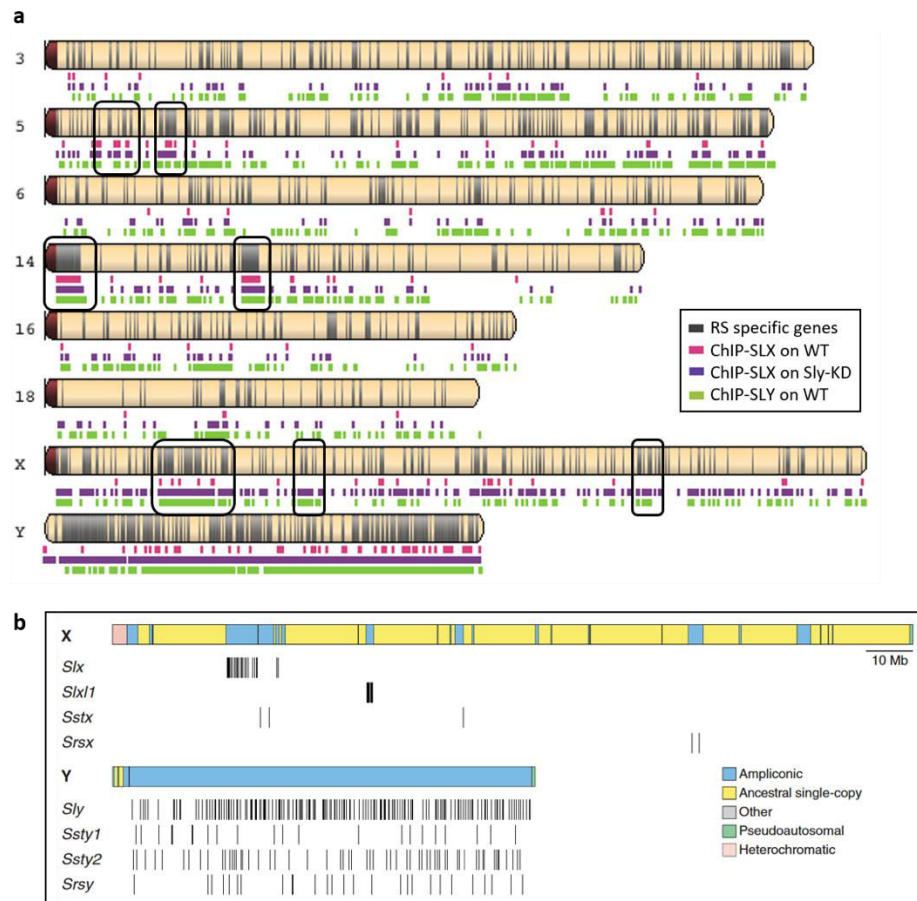


Figure 51. Les protéines SLX/SLXL1 et SLY sont enrichies sur les gènes multicopies des chromosomes 5 et 14 ainsi que sur les régions ampliconiques des chromosomes sexuels. a. Cartographie chromosomique des protéines SLX/SLXL1 dans un contexte sauvage (ChIP-SLX on WT) ou dans un contexte transgénique (ChIP-SLX on Sly-KD), et des protéines SLY (ChIP-SLY on WT). Les gènes multicopies des chromosomes 5, 14, X et Y sont encadrés. En gris, sur les chromosomes, sont indiqués les gènes spécifiquement exprimés pendant la spermiogenèse (RS specific genes). **b.** Localisation des régions ampliconiques des chromosomes sexuels et des gènes multicopie *Slx/Sly*, *Slxl1*, *Sstx/Ssty* et *Srsx/Srsy* des chromosomes sexuels, selon la cartographie de Soh et al. Extrait de [151].

Dans les spermatides rondes issues de souris WT, les protéines SLX/SLXL1 sont retrouvées sur 463 gènes (TSS+/-1kb). En l'absence de la protéine SLY, non seulement SLX/SLXL1 sont toujours présentes sur plus de 89% de ces gènes, mais elles sont enrichies sur 2465 gènes supplémentaires. SLY est présent sur 82% des gènes cibles de SLX/SLXL1 dans les spermatides WT. Il est intéressant de noter que seulement 40% des gènes cibles de SLX/SLXL1

en l'absence de SLY sont des cibles partagées avec ce dernier (**Figure 52**). Autrement dit, les gènes occupés par SLX/SLXL1 uniquement en l'absence de SLY ne sont pas exclusivement des gènes cibles de SLY.

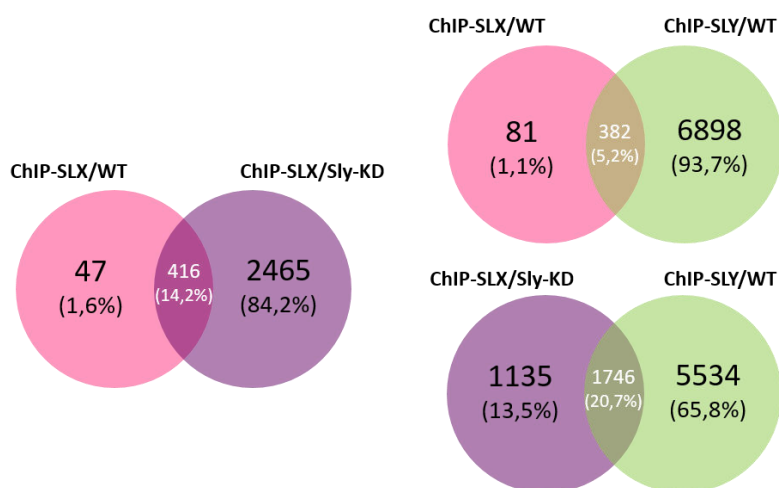


Figure 52. Proportion de gènes cibles communs entre les protéines SLX/SLXL1 et SLY. Diagramme de Venn présentant le pourcentage et le nombre de gènes communs entre SLX/SLXL1 et SLY dans un contexte sauvage (ChIP-SLX/WT et ChIP-SLY/WT) ou transgénique (ChIP-SLX/SLY-KD).

Il est important de préciser que les ChIP-SLX/SLXL1 ont été réalisées en parallèle dans des conditions identiques tandis que la ChIP SLY a été réalisée dans des conditions légèrement différentes (les kits de ChIP utilisés sont différents et les cellules sont purifiées par FACS et non par élutriation). L'analyse bio-informatique est, elle, identique pour toutes les analyses. Les analyses comparatives menées dans les figures 2-4 permettent une estimation du nombre de gènes cibles communs entre les protéines SLY et SLX/SLXL1 mais il sera nécessaire de refaire ces trois ChIP en parallèle (et même éventuellement d'inclure une ChIP-SLY sur des spermatides issues de souris *Slx1-KD*) afin d'obtenir une comparaison rigoureuse des sites de fixation de SLY et SLX/SLXL1.

2. L'interaction entre SSTY et SLX/SLY est essentielle pour leur liaison à l'ADN

Afin de déterminer si les protéines SLX et SLY sont capables de se fixer directement à l'ADN, nous avons mené une recherche de motifs *in silico* à partir des trois jeux de données précédemment générées par les expériences de ChIP-Seq. L'analyse de ces jeux de données a été effectuée à l'aide de l'outil ChIPMunk disponible sur le site web Galaxy

(<https://mississippi.snv.jussieu.fr/>) et a calculé entre un et quatre motifs d'une longueur maximale de 15 nucléotides. Un motif commun a été identifié entre les trois jeux de données puis testé par retard sur gel (EMSA pour *Electromobility Shift Assay*) (**Figure 53a**). Les protéines SLX et SLY ont la particularité de posséder un point isoélectrique très acide, respectivement de 4,98 et 4,35 (http://web.expasy.org/compute_pi/), et ne sont vraisemblablement pas capable d'interagir directement avec l'ADN. Considérant l'interaction entre SLY/SLX et SSTY, ainsi que le point isoélectrique extrêmement basique de SSTY (9,06), nous avons décidé d'entreprendre les expériences d'EMSA à la fois en transfectant simplement SLX, SLY ou SSTY, mais également en co-transfectant SLY et SLX avec SSTY (seule la protéine SLX, et non pas SLXL1, a été testée au cours de ces expériences).

Alors que la présence unique de SLY ou SSTY ne provoque aucun retard sur gel (lignes 2-3 de la **Figure 53b**), la présence simultanée de ces deux protéines induit un « shift » qui témoigne de l'interaction entre ces deux protéines et la séquence biotinylée utilisée pour l'expérience. La spécificité de l'interaction de ces protéines avec la séquence a été testé par compétition avec la même sonde non-biotinylée et avec une sonde non-spécifique non-biotinylée (lignes 5-6 de la **Figure 53b**). De même, afin de confirmer que ce sont effectivement les protéines SLY et SSTY qui interagissent avec la séquence, l'obtention d'un « supershift » a été produit après incubation des produits avec un anticorps anti-MYC qui se lie spécifiquement à l'étiquette MYC de la protéine recombinante SSTY-MYC (ligne 7 de la **Figure 53b**). Un anticorps de lapin a été utilisé comme contrôle (ligne 8 de la **Figure 53b**).

De même que pour SLY, la protéine SLX n'est pas par elle-même capable d'interagir avec l'ADN. La co-transfection de SLX et SSTY est nécessaire pour l'apparition d'un retard sur gel de la séquence biotinylée (ligne 2-4 de la **Figure 53c**). La spécificité de l'interaction entre SLX/SSTY et la séquence nucléotidique a été confirmé d'une part grâce à la compétition avec des sondes spécifiques non-biotinylées et des sondes non-spécifiques non-biotinylées (lignes 5-6 de la **Figure 53c**), d'autre part par l'incubation avec un anticorps anti-MYC dirigé contre la protéine recombinante SSTY-MYC ainsi qu'avec un anticorps anti-SLX (lignes 7 et 9 de la **Figure 53c**). Cependant, les résultats obtenus diffèrent quelque peu de l'expérience menée avec les protéines SSTY et SLY. Premièrement, le « supershift » obtenu à l'aide de l'anticorps anti-MYC est moins marqué que dans l'expérience menée avec les protéines SLY et SSTY. Deuxièmement, l'anticorps dirigé contre SLX abolit complètement l'interaction entre les

protéines SLX/SSTY et l'ADN. Cela pourrait être dû au masquage d'une région indispensable pour l'interaction entre SSTY et SLX (ou pour l'interaction entre le complexe SLX/SSTY et l'ADN) par l'anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine SLX. Ce dernier résultat, bien que ne produisant pas de « supershift », permet indirectement de confirmer la spécificité de l'interaction entre la séquence nucléotidique utilisée et les protéines SSTY et SLX.

Finalement, encouragés par ces résultats, nous avons recherché les différentes localisations chromosomiques de cette séquence nucléotidique. La séquence utilisée pour les expériences de retard sur gel est relativement permissive et a été comptabilisée 39238 fois sur le génome murin. Curieusement, cette séquence n'est pas surreprésentée sur les chromosomes sexuels, ni sur le chromosome 14 (**Figure 53d**). De plus, ce motif est particulièrement absent du chromosome Y par rapport aux autosomes.

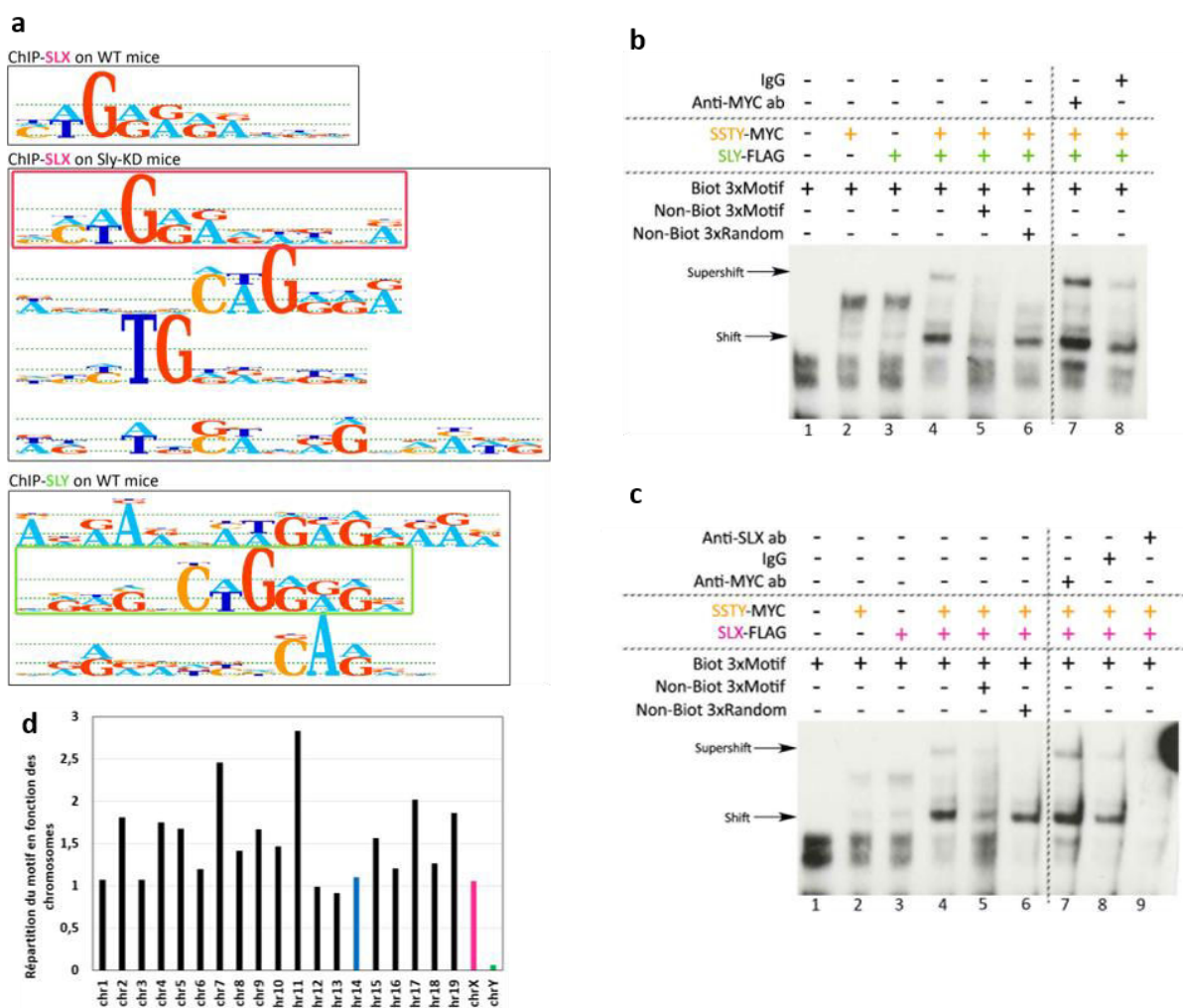


Figure 53. Identification de la séquence consensus de liaison des protéines SLX/SLY et SSTY. **a.** Obtention d'un motif commun après analyses des trois jeux de données générés par les expériences de ChIP-Seq anti-SLX/SLXL1 sur des souris sauvages (ChIP-SLX on WT), anti-SLX/SLXL1 sur des souris déficientes en SLY (ChIP-SLX on Sly-KD mice) et anti-SLY sur des souris sauvages (ChIP-SLY on WT). Un ou plusieurs motifs ont été générés par l'analyse avec ChIP-Munk. Le motif en commun

entre les trois jeux de données est entouré en couleurs. **b-c.** La présence concomitante des protéines SLX/SLY et SSTY est nécessaire à leur interaction avec la séquence consensus. **b.** Résultat d'un gel retard effectué avec SSTY et SLY. La sonde biotinylée (Biot 3xMotif) a été incubée en absence (ligne 1) ou en présence d'extraits protéiques de cellules GC1 transfectées avec SSTY ou SLX/SLY (ligne 2-3). Un « shift », témoin d'une interaction ADN-protéine, n'est visible que dans le cas d'une co-transfection SSTY et SLX/SLY (ligne 4) (n=3). La spécificité de la séquence a été contrôlée par compétition avec l'ajout d'une sonde identique non-biotinylée (Non-Biot 3xMotif) (n=3) et fortement concentrée (ligne 4) ainsi que par l'ajout d'une sonde aspécifique non-biotinylée (ligne 5) (n=2). La spécificité de l'interaction protéine-ADN a été contrôlée par l'obtention d'un « supershift » en présence d'un anticorps spécifique de SSTY-MYC (ligne 7) et de sa disparition avec l'incubation d'un anticorps contrôle non-spécifique (ligne 8) (n=2). **c.** Résultat d'un gel retard effectué avec SSTY et SLX. La sonde biotinylée (Biot 3xMotif) a été incubée en absence (ligne 1) ou en présence d'extraits protéiques de cellules GC1 transfectées avec SSTY ou SLX/SLY (ligne 2-3). Un « shift », témoin d'une interaction ADN-protéine, n'est visible que dans le cas d'une co-transfection SSTY et SLX/SLY (ligne 4) (n=2). La spécificité de la séquence a été contrôlée par compétition avec l'ajout d'une sonde identique non-biotinylée (Non-Biot 3xMotif) (n=2) et fortement concentrée (ligne 4) ainsi que par l'ajout d'une sonde aspécifique non-biotinylée (ligne 5) (n=1). La spécificité de l'interaction protéine-ADN a été contrôlée par l'obtention d'un « supershift » en présence d'un anticorps spécifique de SSTY-MYC (ligne 7) et de sa disparition avec l'incubation d'un anticorps contrôle non-spécifique (ligne 8) (n=1). L'incubation avec un anticorps anti-SLX abolit l'interaction entre le complexe SSTY/SLX et l'ADN (ligne 9, panel de droite) (n=1). **d.** Répartition chromosomique de la localisation du motif consensus qui représente le nombre d'occurrence du motif pour 100kb d'ADN.

Considérant que plus d'un motif a été prédit à partir des jeux de données provenant des CHIP-SLX/SLXL1 et SLY (menées respectivement sur des spermatides issues de souris Sly-KD et WT) (**Figure 53a**), il est possible que le motif commun que nous avons choisi pour mettre en place nos expériences de retard sur gel ne soit pas le motif principal de fixation sur le chromosome Y de la protéine SLY, ni celui de la protéine SLX en l'absence de SLY. De nombreux outils disponibles sur internet permettent la recherche de motif et il est probable que les algorithmes de calcul diffèrent d'une méthode à une autre : il serait intéressant de relancer une recherche de motifs à l'aide d'autre logiciels ainsi que sur des répliquats de CHIP-Seq. Finalement, le motif utilisé lors des retards sur gel est assez large : éventuellement, si la fixation de SLX et de SLY sur le chromosome Y ne se fait que sur une séquence très précise, celle-ci se retrouvera masquée par l'abondance relative du motif sur les autosomes et le chromosome X.

3. SLX/SLXL1 et SLY interagissent *in vivo* avec SPIN1

Dans le cadre des expériences de co-immunoprécipitation suivies d'analyses en spectrométrie de masse précédemment mises en place (cf. article n°3 de ce manuscrit), nous avons identifié un autre partenaire de SLY et de SLX/SLXL1 appartenant à la famille SSTY/SPIN.

Une lignée cellulaire spermatogoniale immortalisée (GC1) a été transfectée avec un plasmide contenant la séquence codante des protéines recombinantes SLY-FLAG ou SLX-FLAG. Des cellules transfectées avec un plasmide vide ont été utilisées comme contrôles. Respectivement pour SLY et SLX, 3 peptides et 1 peptide ont été identifiés lors de l'analyse en

spectrométrie de masse. L'interaction entre SLY ou SLX/SLXL1 et SPIN1 a été confirmée *in vivo* par des expériences de co-immunoprécipitations menées à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre SPIN1, sur des extraits protéiques testiculaires (**Figure 54**).

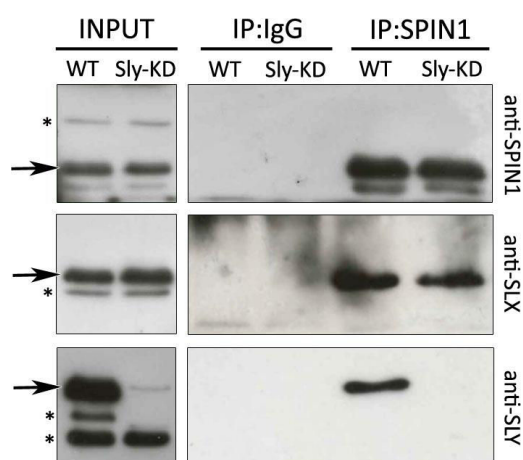


Figure 54. SPIN1 interagit *in vivo* avec les protéines SLX/SLXL1 et SLY. **Panel du haut.** A gauche, détection en WB avec un anticorps anti-SPIN1 des extractions protéiques testiculaires provenant de souris sauvages (WT) ou déficientes en SLY (Sly-KD) avant immunoprécipitation. A droite, détection en WB avec un anticorps anti-SPIN1 après immunoprécipitation avec un anticorps non-spécifique de lapin (IP:IgG) ou avec un anticorps anti-SPIN1 (IP:SPIN1). **Panel du milieu.** A gauche, détection en WB avec un anticorps anti-SLX/SLXL1 des extractions protéiques testiculaires provenant de souris sauvages (WT) ou déficientes en SLY (Sly-KD) avant immunoprécipitation. A droite, détection en WB avec un anticorps anti-SLX/SLXL1 après immunoprécipitation avec un anticorps non-spécifique de lapin (IP:IgG) ou avec un anticorps anti-SPIN1 (IP:SPIN1). **Panel du bas.** A gauche, détection en WB avec un anticorps anti-SLY des extractions protéiques testiculaires provenant de souris sauvages (WT) ou déficientes en SLY (Sly-KD) avant immunoprécipitation. A droite, détection en WB avec un anticorps anti-SLY après immunoprécipitation avec un anticorps non-spécifique de lapin (IP:IgG) ou avec un anticorps anti-SPIN1 (IP:SPIN1).

MATÉRIELS & MÉTHODES

MATÉRIELS & MÉTHODES

Immunoprecipitation de la chromatine et séquençage à haut-débit

Les cellules issues de testicules de souris WT et Sly-KD ont été purifiées par élutriation comme précédemment (cf. Article n°1). Les expériences de ChIP ont été mise en place avec un anticorps fait à façon anti-SLX/SLXL1 et avec le kit iDeal ChIP-seq kit for Transcription Factors (Diagenode), en suivant les instructions du fabricant. Le séquençage à haut-débit et l'analyse bio-informatique ont été mis en place comme précédemment (cf. Article n°3).

Co-immunoprécipitations

Les expériences de co-immunoprécipitations avec un anticorps anti-SPIN1 (orb179021, Biorbyt) ont été mises en place comme précédemment pour TBL1XR1 (cf. Article n°3).

Retard sur gel (EMSA)

Des cellules spermatogoniales immortalisées ont été transfectées par la Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) avec des vecteurs contenant les constructions : FLAG-SLY, FLAG-SLX et SSTY1-MYC. Les protéines ont été extraites dans un tampon d'extraction (25mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 0.1% NP-40) pendant 30 minutes à 4°C avant une centrifugation à 13000g pour se débarrasser des déchets cellulaires. Les sondes simple-brin biotinylées et non-biotinylées ont été hybridées avec leur brin complémentaire en solution (10mM Tris pH8.0, 1mM EDTA, 5mM NaCl) en utilisant un programme thermique en gradient de température (95°C pendant 5 minutes puis 70 cycles d'une minute en diminuant la température de 1°C à chaque cycle). Les sonde double brin sont incubées 20min à 37°C avec les extraits protéiques des transfections et d'autres composants fournis par le kit LightShift™ Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific). Après s'être débarrassé des sels avec une migration à vide de 30min à 200V, la migration des échantillons a lieu dans un gel d'acrylamide de 6% en condition non-dénaturante à 100V pendant une heure. Les gels ont été transférés sur une membrane de nylon (GE Healthcare), préalablement réhydratées pendant 10 minutes dans une solution de TBE 0.5X. L'ADN a été fixé de façon covalente sur la membrane par deux expositions de 10 secondes aux UV. La détection du signal a été réalisée à l'aide du kit Chemiluminescent Nuclei

Acid Detection Module (Thermo Scientific). La révélation a été réalisée sur un film radiographique (GE Healthcare).

Séquence de la sonde spécifique :

TCTCTCGRGNCWGRRRRATCTCTCTCGRGNCWGRRRRATCTCTCTC

Séquence de la sonde non-spécifique :

AGAGCCATYTCACGGAGAGCCATYTCACGGAGAGCCATYTCACGGAGACC

(la sonde non-spécifique correspond aux sites de fixation de STOX1)

- Y = C ou T
- R = A ou G
- W = A ou T
- N = n'importe quelle base

DISCUSSION & PERSPECTIVES

DISCUSSION & PERSPECTIVES

En 2009, Cocquet et al. ont mis en évidence l'importance du gène *Sly* dans la régulation génétique et épigénétique des chromosomes sexuels au cours de la spermiogenèse. Les souris transgéniques déficientes en *Sly* présentent à la fois une surexpression de plus d'une centaine de gènes, ainsi qu'une spermiogenèse anormale. De plus, les mâles *Sly*-KD produisent une descendance avec un excès de femelles, suggérant l'existence d'un conflit intragénomique entre *Sly* et *Slx/Slxl1*, son homologue porté sur le chromosome X.

L'objectif de mon doctorat au regard de la protéine SLY était double : 1) définir le rôle de SLY et son lien avec la régulation chromatinienne des chromosomes sexuels, par la recherche des partenaires et des gènes cibles de SLY, 2) démêler les mécanismes sous-jacents au conflit intragénomique en enquêtant sur la nature de la relation entre SLX/SLXL1 et SLY.

1. SLY : répresseur de l'activité transcriptionnelle

a. Mécanismes de la régulation de la transcription par SLY

Sly est un gène multicopie spécifiquement exprimé dans les spermatides rondes. Apparu récemment, il est uniquement retrouvé chez les animaux appartenant au genre *Mus*. La séquence peptidique et les domaines que la protéine SLY contient ne nous apportent que peu d'informations sur son rôle. En effet, SLY contient un domaine COR1 connu pour être important lors de la division méiotique et permettant de se fixer à l'euchromatine : il est difficile d'envisager un lien entre ce domaine et la fonction régulatrice de SLY. Nous avons donc décidé de mettre en place des expériences de co-immunoprécipitations afin de découvrir les différentes protéines avec lesquelles SLY est capable d'interagir.

SLY interagit avec un membre du complexe répressif Ncor/SMRT

Après de nombreuses tentatives infructueuses, nous sommes parvenus à identifier un partenaire de SLY, nommé TBL1XR1. L'interaction entre SLY et TBL1XR1 a été confirmée *in vivo*. TBL1XR1 fait partie intégrante du complexe répressif Ncor/SMRT, dont nous avons

également retrouvé trois autres membres dans nos analyses en spectrométrie de masse (HDAC3, Ncor1 et TBL1).

Plusieurs propriétés du complexe Ncor représentent un intérêt considérable par rapport à l'action répressive de SLY sur l'activité transcriptionnelle.

Premièrement, Ncor est un complexe répressif réversible. En effet, depuis une dizaine d'année, le concept de répression transcriptionnelle à long terme est mis de côté au profit d'une vision plus dynamique où les complexes activateurs et répressifs subissent des cycles de fixation/détachement au niveau des séquences promotrices des gènes (**Figure 55a**) [208]. Dans le cas du complexe Ncor/SMRT, plusieurs voies coexistent dans les cellules pour induire le détachement de ce complexe de l'ADN. L'une d'entre elles se traduit par la phosphorylation du complexe Ncor/SMRT par AKT1 (*serine/threonine-protein kinase 1*) ou MAP3K1 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*) et entraîne sa relocalisation du noyau vers le cytoplasme [208]. En lieu et place de la phosphorylation peut également se produire l'ubiquitination du complexe par l'enzyme UBE2D1, directement recrutée par TBL1XR1. Nous voyons donc se dessiner plusieurs possibilités pour la protéine SLY de moduler l'action répressive du complexe Ncor/SMRT. La première hypothèse ([hypothèse A](#)) consisterait en un recrutement direct du complexe Ncor/SMRT par SLY sur les gènes cibles de cette protéine (**Figure 55b**, à gauche). Une deuxième possibilité ([hypothèse B](#)) pourrait être que SLY favorise le maintien du complexe sur la chromatine (afin de basculer le ratio [temps de répression/temps d'activation] en faveur d'une répression plus forte) sur les gènes cibles de SLY (**Figure 55b**, à droite). Considérant l'interaction entre SLY et TBL1XR1, il est envisageable d'imaginer que la formation du complexe SLY/TBL1XR1 pourrait altérer la capacité de TBL1XR1 à recruter UBE2D1. Il n'est pas exclu non plus que cette interaction puisse gêner la phosphorylation du complexe par les enzymes AKT1 et MAP1K3. La comparaison par Western Blot des niveaux d'ubiquitination ou de phosphorylation après immunoprécipitation du complexe Ncor/SMRT chez les souris WT et Sly-KD permettra probablement de valider ou de rejeter cette dernière hypothèse.

Deuxièmement, le complexe Ncor/SMRT est composé de membres permanents (HDAC3, Ncor1, TBL1XR1, TBL1R et GPS2), mais il est également capable d'interagir avec d'autres protéines, et plus précisément avec JMJD2A. Cette protéine est une H3K9/H3K36 deméthylase capable de reconnaître les résidus H3K4me3 grâce à son domaine Tudor.

Pourquoi cette protéine partenaire du complexe Ncor/SMRT semble-t-elle particulièrement intéressante ? Lors de l'analyse des résultats provenant de la ChIP-Seq SLY, nous avons remarqué une très forte corrélation de la protéine SLY avec la marque épigénétique activatrice H3K4me3. Ce résultat, qui pouvait paraître déconcertant au premier abord pour une protéine répressive, prend sens au regard de l'interaction entre Ncor/SMRT et SLY d'une part, et Ncor/SMRT et JMJD2A d'autre part. L'absence de SLY n'active pas *de novo* des gènes éteints, mais autorise une expression plus forte de gènes normalement exprimés pendant la spermiogenèse et probablement régulés par le complexe Ncor/SMRT. Selon l'hypothèse B, la localisation de SLY sur les régions enrichies en H3K4me3 pourrait donc être régie par l'interaction entre le complexe Ncor/SMRT et JMJD2A (**Figure 55c**). Il pourrait être intéressant de tester par co-immunoprécipitation, *in vivo* comme *in vitro*, si SLY et JMJD2A interagissent ensemble et s'ils font partie d'un seul et même complexe comprenant Ncor/SMRT.

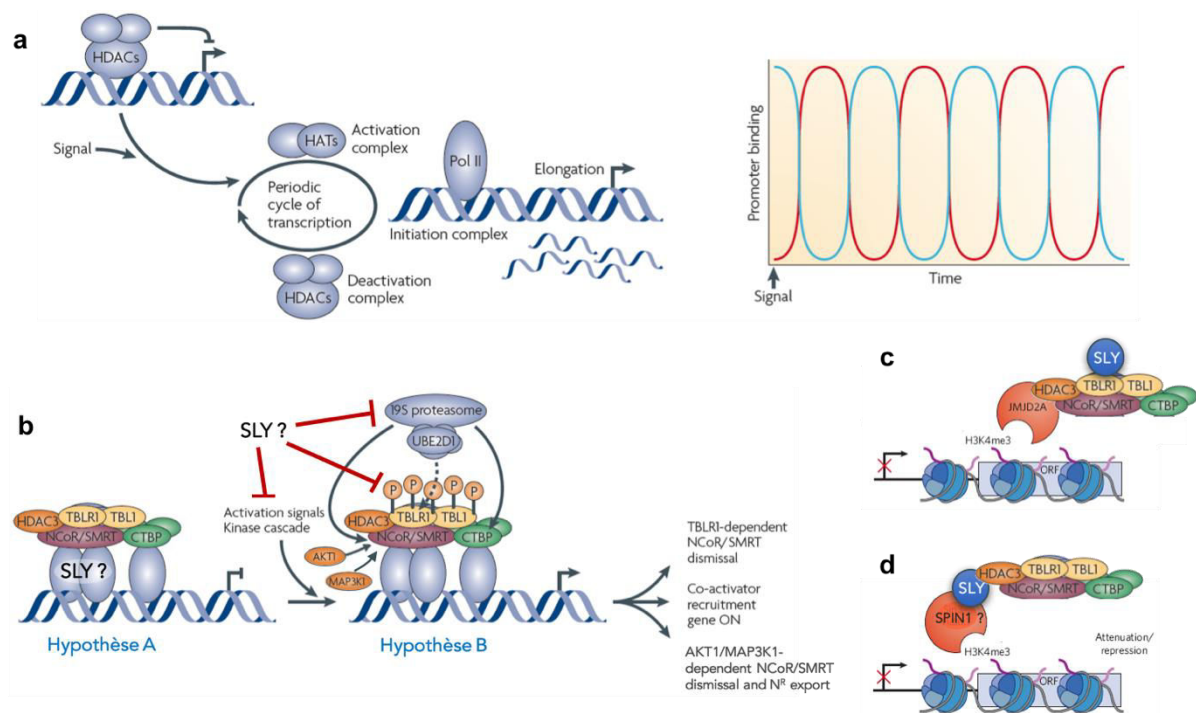


Figure 55. Le complexe Ncor/SMRT et SLY interagisse ensemble et régule le niveau d'expression des gènes pendant la spermiogenèse. **a.** Illustration de la régulation dynamique de l'expression des gènes par une succession de cycle de fixation de complexe répresseur et activateur. À droite, la fixation dans le temps des complexes répresseurs est illustrée en rouge. La dynamique de fixation des complexes activateurs est illustrée en bleu. Extrait de [208]. **b.** Hypothèse de travail concernant la nature de l'interaction entre SLY et TBL1XR1. Adapté de [208]. **c.** La marque épigénétique activatrice H3K4me3 peut être associée à des complexes répresseurs de la transcription dont fait partie JMJD2A, en interagissant avec le complexe répressif Ncor/SMRT. JMJD2A pourrait être responsable de la colocalisation de SLY sur les marques activatrices H3K4me3. Adaptés de [208, 209]. **d.** L'interaction entre SLY et SPIN1 pourrait être à l'origine de l'enrichissement de SLY sur les marques épigénétiques H3K4me3 et pourrait permettre le recrutement du complexe Ncor/SMRT sur les gènes cibles de SLY. Adaptés de [208, 209].

Jusqu'à présent, le rôle du complexe Ncor/SMRT dans le contexte spécifique de la spermatogenèse n'a pas été étudié. Des analyses de localisation cellulaire dans les différents types cellulaires qui composent le testicule pourraient nous permettre de déterminer si le complexe Ncor/SMRT est nécessaire à chacune des étapes de la spermatogenèse ou si son rayon d'action est uniquement limité à la spermiogenèse. De plus, les anticorps commerciaux disponibles et efficaces en ChIP permettront une comparaison fine des sites de fixation du complexe Ncor/SMRT dans un contexte WT ou Sly-KD. Enfin, le complexe Ncor est extrêmement conservé chez les humains : il serait également intéressant d'étudier sa localisation cellulaire au sein de sections testiculaires humaines.

SLY interagit avec une protéine "lectrice" de H3K4me3 : SPIN1

Lors des analyses en spectrométrie de masse, nous avons identifié un deuxième partenaire de SLY, que nous avons été capable de confirmer *in vivo* grâce à une co-immunoprécipitation dirigée contre SPIN1. SPIN1 appartient à la famille des protéines SSTY/SPIN et représente le membre le plus caractérisé jusqu'à présent. SPIN1 possède trois domaines Tudor qui lui permettent de reconnaître et d'interagir avec les résidus K4me3 de l'histone H3. Son rôle lors de la spermatogenèse n'est pas encore caractérisé mais une isoforme a été identifiée dans le testicule de souris mâles adultes [210].

La protéine SLY est caractérisée par un point isoélectrique particulièrement acide (PI = 4,35). Une interaction directe entre l'ADN et SLY est donc peu probable. La mise en évidence de l'interaction entre SPIN1 et SLY permet d'apporter une explication à la fois sur la liaison possible entre SLY et l'ADN, mais également sur la forte colocalisation entre les marques épigénétiques activatrices H3K4me3 et SLY (**Figure 55d**). Des expériences de ChIP-Seq ou ChIP-qPCR seront nécessaires pour appréhender dans quelle mesure SPIN1 et SLY partagent les mêmes gènes cibles. De même, afin de mieux caractériser le rôle de SPIN1, il serait opportun d'observer la présence ou l'absence de la protéine à chacune des étapes de la spermatogenèse par immunofluorescence (IF pour *ImmunoFluorescence*) ou immunohistochimie (IHC pour *ImmunoHistoChemistry*), à la fois sur des sections testiculaires murines mais également humaines, étant donné la forte conservation de cette protéine chez les mammifères.

Il est évidemment trop tôt aujourd'hui pour pouvoir conclure sur la nature de l'interaction entre SLY et le complexe Ncor/SMRT, ainsi que sur les rôles moléculaires précis de SLY et SPIN1 pendant la spermiogenèse. De plus, aucune des hypothèses émises précédemment ne sont mutuellement exclusives, et il est envisageable que SPIN1 et le complexe Ncor/SMRT puissent travailler de concert pendant la spermiogenèse afin de réguler l'activité transcriptionnelle des chromosomes sexuels. Il est certain que la poursuite des travaux de recherche sur SPIN1 et le complexe répressif Ncor/SMRT permettront d'élucider une partie des mécanismes mis en place pour ce processus.

b. Conséquences de la dérégulation de la transcription sur la compaction de la chromatine

Afin de mieux appréhender les mécanismes permettant à SLY de contrôler l'expression de plus d'une centaine de gènes au cours de la spermiogenèse, nous avons adopté une démarche complémentaire à la recherche de partenaires : la mise en évidence des gènes cibles de SLY par ChIP-Seq. Curieusement, alors que la plupart des gènes surexprimés dans les souris Sly-KD sont portés par les chromosomes sexuels, 90% des gènes cibles de SLY sont exprimés pendant la spermiogenèse et indifféremment portés par les chromosomes sexuels ou les autosomes. Grâce à une analyse d'ontologie, nous avons mis en évidence que les gènes cibles de SLY sont impliqués dans les processus de régulation de l'expression des gènes et de modifications de la chromatine ainsi que dans la voie de l'ubiquitination. En nous basant sur les résultats de cette analyse, nous avons décidé de nous concentrer sur les gènes impliqués dans la structure et le remodelage de la chromatine.

Les variants d'histone H2A : focus sur le variant H2A.B3

Nous avons mis en évidence que SLY est enrichie sur le TSS des variants d'histone H2A portés par les chromosomes sexuels. De plus, nous avons remarqué que le variant H2A.B3 était significativement surexprimé dans les spermatides rondes des souris Sly-KD. L'équipe de Tremethick a précédemment démontré que l'incorporation de H2A.B3 provoque un relâchement de la chromatine et que ce variant d'histone est enrichi sur les TSS des gènes

fortement exprimés lors de la spermiogenèse, notamment ceux portés par le chromosome X [88].

Afin de déterminer si l'augmentation de H2A.B3 dans les souris Sly-KD pouvait être en partie responsable de la surexpression des gènes observée dans les spermatides de ces souris, nous avons mené des expériences de ChIP-qPCR et confirmé une incorporation plus importante de ce variant d'histones sur les TSS de certains gènes dérégulés lors de l'absence de SLY. Encouragés par ces résultats, nous avons souhaité mener des approches plus globales pour détecter et localiser H2A.B3 sur la chromatine des souris Sly-KD. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure (par des expériences d'immunoprécipitations suivies de WB) ni de confirmer, ni de quantifier l'augmentation de H2A.B3 au sein de la chromatine des spermatides rondes. Nous avons également mis en place des expériences de ChIP-Seq qui, jusqu'à présent, ne nous ont pas permis de conclure sur la localisation chromosomique de H2A.B3 et sur un enrichissement général de cette protéine dans les spermatides Sly-KD.

Sachant qu'il n'existe pas de modèle de souris déficientes pour H2A.B3, il serait important de pouvoir mettre au point les conditions expérimentales qui nous permettrait de conclure sur les conséquences d'une surexpression de H2A.B3, à défaut d'un modèle murin *knock-out*.

Au cours de notre étude, nous avons également étudié d'autres variants de l'histone H2A : alors que le niveau du variant autosomal *H2afb1* (codant pour la protéine H2AL2) est inchangé dans les spermatides Sly-KD, le niveau d'expression du variant *H2a11* (codant pour la protéine H2AL1) porté par le chromosome X est significativement augmenté. Plusieurs éléments laissent à penser que H2AL1/2 sont des protéines importantes pour le remodelage de la chromatine lors de la spermiogenèse : non seulement elles sont enrichies dans les spermatides allongées et persistent dans les spermatozoïdes, mais lors de leur dimérisation avec le variant d'histone TH2B, elles génèrent des nucléosomes plus instables [106]. De plus, des nucléosomes contenant H2AL2 (qui partagent 76% d'homologie avec H2AL1) deviennent plus résistants à l'action de SWI/SNF, un complexe remodeleur de la chromatine [107]. Cependant, le manque d'outils spécifique (seul un anticorps reconnaissant à la fois H2AL1 et H2AL2 a été développé) entrave toutes avancées biologiques concernant l'étude de ces variants dans les souris Sly-KD.

DOT1L est-elle impliquée dans les anomalies de compactions des ES Sly-KD ?

Lors de notre étude, nous avons observé que les anomalies de remodelage de la chromatine, précédemment mises en évidence dans les souris Sly-KD [191], entraînent un remplacement moins efficace des histones par les protamines. Ce phénotype s'accompagne d'une plus grande sensibilité de l'ADN au stress oxydatif. Les dommages à l'ADN sont souvent accompagnés d'une faible motilité des spermatozoïdes : cette observation est vérifiée pour les spermatozoïdes Sly-KD.

En recherchant les facteurs responsables des problèmes de compaction des spermatides allongées Sly-KD, nous avons constaté que DOT1L, unique méthyltransférase de H3K79 identifiée à ce jour, est l'une des cibles les plus fortement enrichies en SLY. Cette enzyme, ainsi que la marque H3K79me2 sont significativement diminuées dans les spermatides Sly-KD. Notre modèle de souris Sly-KD où la diminution de la marque épigénétique H3K79me2 est corrélée à une diminution du niveau d'acétylation des histones suggère que la répression de l'expression de DOT1L chez ces souris est responsable des anomalies de compaction de la chromatine.

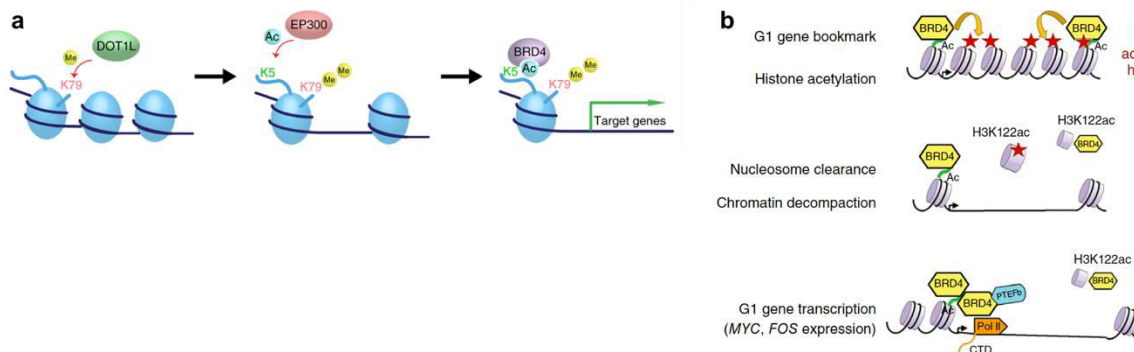


Figure 56. DOT1L pourrait être impliquée de la transition histone-protamine lors de la spermiogenèse. a. Modèle du fonctionnement interdépendant entre BRD4 et DOT1L dans les leucémies aigües lymphoblastiques, proposé par Gilan et al. La méthylation du résidu K79 de l'histone H3 permet un relâchement de la chromatine et le recrutement de EP300 qui va à son tour acétyle le résidu K5 de l'histone H4. **b.** BRD4 possède une activité d'acétyltransférase qui aboutit à l'éviction des histones, une décompaction de la chromatine et une activation de l'activité transcriptionnelle. Extrait de [211].

Gilan et al. ont démontré que les enzymes DOT1L et BRD4 collaborent dans les lignées cellulaires de leucémies aigües lymphoblastiques (lignées cellulaires MLL pour *Mixed Lineage Leukemia*) et promeuvent l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. La diméthylation du résidu K79 de l'histone H3 permet le recrutement de l'enzyme EP300 et subséquemment l'acétylation du résidu K5 de l'histone H4. Le bromodomaine de BRD4 se fixe sur la marque nouvellement apposée et induit la transcription du gène cible (**Figure 56a**) [123]. Il existe donc

un lien direct entre la méthylation de H3K79 et l'acétylation de l'histone H4 dans les lignées cellulaires MLL.

Afin de comprendre l'implication de DOT1L et de la méthylation H3K79 dans le processus d'acétylation, nous avons examiné l'expression du transcrit *Ep300* qui est inchangée dans les spermatozoïdes Sly-KD (données non-présentées). La comparaison systématique des sites de fixation entre DOT1L, H3K79me2, EP300 et AcH4 pourrait nous permettre d'évaluer indirectement l'importance de la diméthylation de H3K79 pour la mise en place de l'acétylation. Il est également intéressant de noter que la récente étude de Devaiah et al. a démontré que BRD4 possède elle-même une activité enzymatique et catalyse l'acétylation du résidu K122 de l'histone H3 permettant l'éviction de ce nucléosome hors de la chromatine (**Figure 56b**) [211]. Une éventuelle collaboration entre DOT1L et BRD4 pourrait-elle à l'origine de la vague d'hyperacétylation observée dans les ES ? Sont-elles également engagées dans le processus d'éviction des histones nécessaire à leur remplacement par des protamines à la fin de la spermiogenèse ? Il faut savoir, cependant, que l'expression de BRD4 dans les cellules post-méiotiques reste controversée [82, 118], et qu'il n'est pas exclu que l'apparition de H3K79me2 permettent le recrutement d'une autre acétyltransférase que EP300 ou BRD4.

Le laboratoire a récemment développé une lignée de souris (*Dot1^{fl/fl}, Stra8-Cre*) dans laquelle l'expression de DOT1L est spécifiquement invalidée dans la lignée germinale, à partir des cellules spermatogoniales. Les spermatozoïdes issus des mâles transgéniques présentent des anomalies de morphologie et un pouvoir fécondant diminué. Les résultats préliminaires très encourageants révèlent une forte augmentation des histones H3 et de la protamine Prm2 dans les spermatozoïdes. Les futures expériences menées sur ce modèle permettront d'estimer les variations du niveau d'hyperacétylation de l'histone H4 dans les souris transgéniques et WT, mais également de comparer les localisations génomiques de H3K79me2 et de l'hyperacétylation de H4. Ces études permettront vraisemblablement de déterminer dans quelles mesures l'apparition de la diméthylation est indispensable à la vague d'hyperacétylation et au remplacement des histones par les protamines.

2. SLY : acteur du conflit intragénomique

Comme nous l'avons précédemment présenté dans l'introduction, *Sly* et *Slx/Slxl1* sont engagés dans un conflit intragénomique qui les oppose. Souhaitant éclaircir les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce conflit, nous avons étudié les protéines SLX/SLXL1 et SSTY à la fois dans un contexte WT, mais également en l'absence de SLY.

a. **SLX/SLXL1 est enrichie sur la chromatine en l'absence de SLY**

Des observations par immunofluorescence ont permis de mettre en évidence la relocalisation de SLX/SLXL1 dans le noyau des spermatides Sly-KD. Afin de mesurer plus finement la nature de cet enrichissement, nous avons mis en place des expériences de ChIP-Seq SLX/SLXL1 sur des spermatides WT et Sly-KD. Plusieurs observations peuvent être faites d'après l'analyse de ces expériences : 1) en l'absence de SLY, les protéines SLX/SLXL1 sont présentes sur un nombre de gènes bien plus important que dans les spermatides WT, 2) SLY et SLX/SLXL1 partagent un nombre important de cibles communes, mais il semblerait que ces protéines contrôlent également des ensembles de gènes différents, 3) SLX/SLXL1 sont enrichies sur les gènes multicopies des chromosomes 5, 14 et Y dans les spermatides WT, et sur le chromosome X dans les spermatides Sly-KD. Ces résultats renforcent l'hypothèse que SLX/SLXL1 sont des protéines activatrices de la transcription et qu'elles sont vraisemblablement responsables de la surexpression des gènes portés par les chromosomes sexuels dans les spermatides Sly-KD.

Par immunofluorescence, nous avons observé que la localisation intracellulaire de SLX/SLXL1 varie en fonction des gènes du chromosome Y présents dans les spermatides rondes. Principalement cytoplasmique en présence de SLY, elles sont enrichies dans le noyau en l'absence de celle-ci et en présence de SSTY. Dans les spermatides MSYq- (donc en l'absence cumulée de SLY et SSTY), SLX/SLXL1 sont uniquement cytoplasmiques. Forts de ces observations, nous avons souhaité savoir si une interaction entre SSTY et SLX/SLXL1 pouvait expliquer ces variations. Bien que SSTY soit capable d'interagir avec SLY et SLX/SLXL1 *in vitro*, SSTY interagit uniquement avec SLX/SLXL1 *in vivo*. Il est donc fort possible que SSTY soit le facteur codé par le MSYq responsable de la localisation nucléaire de SLX/SLXL1 dans les spermatides rondes.

b. Quel(s) rôle(s) jouent les membres de la famille SSTY/SPIN dans le conflit intragénomique ?

La délétion du MSYq chez la souris génère de graves anomalies de la spermiogenèse, en particulier au niveau de la compaction de l'ADN ainsi qu'une forte surexpression des gènes portés par les chromosomes sexuels. Bien que les souris Sly-KD présentent de nombreuses caractéristiques communes aux souris MSYq-, leur phénotype est moins sévère. Cette observation suggère l'action d'un autre gène, répressif et porté par le bras long du chromosome Y, aux propriétés communes à SLY : la protéine SSTY est-elle le facteur MSYq manquant ?

Deux éléments nous laissent cependant envisager que SSTY est une protéine activatrice de la transcription : 1) SSTY interagit exclusivement avec SLX/SLXL1 *in vivo*, 2) SSTY est nécessaire pour la liaison de SLX à l'ADN. Néanmoins cette hypothèse est à nuancer car, considérant la forte conservation de séquence entre les protéines SSTY et SPIN1, elle repose sur une interaction théorique entre SSTY et la marque épigénétique activatrice H3K4me3. Les nombreux problèmes techniques rencontrés lors des expériences d'immunoprécipitations et de l'utilisation de puces à peptides (*histone peptide array*) ne nous ont pas permis de conclure sur l'existence d'une telle interaction. Il est donc possible que SSTY ne soit pas capable de reconnaître H3K4me3, et puisse dans ce cas agir comme un compétiteur négatif de SPIN1 et empêcher la fixation de SLX/SLXL1 sur cette marque.

Nous avons mis en place plusieurs expériences afin de mieux définir les tenants et les aboutissants de la fonction moléculaire de SSTY dans les spermatides rondes. Cependant, toutes les tentatives d'investigation sur cette protéine et les effets de l'interaction entre SSTY et SLX/SLXL1 se sont heurtées, à nouveau, à de nombreux problèmes techniques. Nous n'avons pas été en mesure d'analyser les résultats de la ChIP-Seq (effectuée avec des anticorps anti-MYC sur des spermatides issues de souris transgéniques SSTY-MYC) probablement à cause du niveau d'expression trop élevée de la protéine endogène MYC. Les anticorps fait à façon ne nous permettent pas non plus de mettre en place des IP ou des ChIP. De plus, après de nombreuses tentatives, nous ne sommes pas parvenus à produire des souris transgéniques déficientes en SSTY.

Une piste alternative peut être explorée en l'absence d'une souris Ssty-KD : l'étude de la localisation génomique de SLX/SLXL1 par ChIP-Seq dans un modèle de souris qui surexprime SLX/SLXL1 et SSTY par l'expression de transgènes sous contrôle d'un promoteur spermatique fort. Toutefois, considérant l'impossibilité d'utiliser les promoteurs trop faibles de SLX/SLXL1 et SSTY pour produire les protéines recombinantes en quantité satisfaisante, cette méthode comporte des limites : en effet, l'absence éventuelle d'un phénotype particulier ne nous apporterait aucune information car nous ne pourrions exclure la possibilité d'un niveau d'expression trop faible des protéines ou d'une fenêtre d'expression inadéquate. Mais cela est sans compter sur la popularisation toujours plus importante des nouveaux outils du génie génétique (*i.e* la technologie CRISPR-Cas9) qui permettront probablement la génération de souris invalidées pour SSTY, essentielles pour la caractérisation de cette protéine. Cette méthode comporte également ses difficultés : si les mâles Ssty-KD sont infertiles, chaque croisement devra être généré par FIV ou éventuellement par ICSI.

Nous avons également mis en évidence que SLX/SLXL1 et SLY sont capables d'interagir *in vivo* avec un autre membre de la famille SSTY/SPIN : **SPIN1**. Les fonctions de SSTY et SPIN1 sont-elles redondantes ? Pourquoi, à l'inverse de SSTY, SPIN1 est capable d'interagir à la fois avec SLX/SLXL1 et SLY ? A l'instar de SSTY, SPIN1 est-elle nécessaire pour la liaison de SLX/SLY à l'ADN ? Les futures investigations sur SPIN1 permettront certainement d'apporter un peu de lumière sur le rôle de la famille SSTY/SPIN au cours de la spermiogenèse et leur implication dans la régulation génétique et épigénétique des chromosomes sexuels. Les approches classiques et couramment utilisées au laboratoire (comme la recherche de partenaires par coIP ou des sites de fixation par ChIP et EMSA) pourront être mises en place dans un futur proche car, contrairement à SSTY, des anticorps spécifiques et efficaces en IP ont déjà été décrits dans la littérature. Il sera également intéressant de générer un modèle de KO conditionnel pour SPIN1, l'invalidation générale de ce gène étant létale.

Enfin, la famille SSTY/SPIN compte un autre membre nommé **SPIN2D**. Homologue de Ssty porté par le chromosome X, le gène *Spin2d* est présent sous la forme d'au moins une dizaine de copies sur le chromosome X. Il est tentant, compte tenu de ses caractéristiques, d'imaginer que SPIN2D ait un rôle à jouer au sein du conflit intragénomique. Nous avons montré par RT-PCR semi-quantitative que l'expression de *Spin2d* est spécifique du testicule. Après transfection transitoire dans les cellules spermatogoniales GC1, sa localisation est

exclusivement nucléaire (données non présentées). Cependant, nos investigations ont rapidement été freinées par la mauvaise qualité de notre anticorps à façon et son incapacité à effectuer des immunoprécipitations efficaces. Il est également difficile de générer une souris invalidée pour *Spin2d* à l'aide de la technologie Crispr-Cas9 considérant les problèmes soulevés par les recombinaisons homologues des chromosomes X lors de la méiose chez les femelles. Si sur le long terme la génération de souris Spin2d-KD (par expression d'un transgène shSpin2d, à l'instar des souris Sly-KD) représenterait un outil formidable pour l'étude de SPIN2D, il est avant tout essentiel de parvenir à développer un anticorps efficace afin de mieux appréhender le rôle de SPIN2D durant la spermiogenèse.

Finalement, une question demeure alors que SSTY semble être une protéine activatrice. Qui est le « facteur MSYq » manquant ? Le MSYq porte un autre gène multicopie appelé *Srsy*. À ce jour, ce gène n'a pas encore été étudié et son niveau d'expression en WB est très faible. Finalement, la différence phénotypique entre les souris Sly-KD et MSYq- pourrait-elle être la conséquence de la persistance d'une très faible quantité de la protéine SLY dans les spermatides Sly-KD ? La différence flagrante de la localisation cellulaire de SLX/SLXL1 entre les spermatides Sly-KD (où SLX/SLXL1 sont abondantes dans le noyau) et spermatides MSYq- (où SLX/SLXL1 sont exclues du noyau) ne peut cependant pas être liée à la quantité de SLY, et SSTY reste le meilleur candidat. La découverte de partenaires de SSTY pourrait probablement nous apporter des éléments de réponses quant à son rôle supposé de répresseur en présence de SLY et d'activateur en l'absence de ce dernier.

c. Le conflit intragénomique : au-delà des chromosomes sexuels

L'analyse de plusieurs jeux de données de CHIP-Seq de différentes PTM d'histones nous a permis de mettre en évidence que les forces de sélection imposées par le conflit intragénomique ont significativement contribué à façonner le contenu génétique et épigénétique des chromosomes sexuels. Ce faisant, nous avons mis en évidence que le paysage épigénétique du chromosome Y, et dans une moindre mesure du chromosome X, sont différents de ceux des autosomes. Certaines marques comme l'acétylation du résidu K27 de l'histone H3 différencient le chromosome Y des autosomes et du chromosome X, suggérant

que la régulation chromatinienne du chromosome Y et du chromosome X peuvent, dans une certaine mesure, être le résultat de deux voies de régulations indépendantes.

De même, la marque épigénétique répressive H3K9me3 est significativement enrichie sur le chromosome Y. La répression de la PMSC dans les spermatides pourrait être à l'origine de cet enrichissement. Cependant, au cours de notre étude, nous avons remarqué que plusieurs familles de gènes multicopies, portés par les chromosomes X, 5 et 14 arborent massivement cette marque épigénétique répressive. Si la présence de H3K9me3 est imputable à la répression épigénétique de la PMSC, comment expliquer l'enrichissement de cette marque sur ces gènes multicopies ? Considérant l'enrichissement des protéines SLX/SLXL1 et SLY sur ces gènes multicopies, nous suggérons que le conflit intragénomique post-méiotique est responsable de la présence massive de H3K9me3 sur les chromosomes sexuels ainsi que sur les gènes multicopies des autosomes. Il est intéressant de remarquer que la présence de H3K9me3 n'empêche pas l'expression de ces gènes dans les spermatides : la composition mixte des marques épigénétiques répressives et activatrices observée pour les chromosomes sexuels explique probablement cette situation.

Les deux clusters enrichis en H3K9me3 du chromosome 14 comportent les nombreux membres de la super-famille Takusan, takusan signifiant « nombreux » en japonais. Jusqu'à présent, seule la sous-famille des α -takusan a été caractérisée. En 2007, Tu et al. ont montré que les gènes appartenant à cette sous-famille sont uniquement exprimés dans le cerveau et le testicule. Ils ont identifié 46 variants de la protéine α -takusan chez les souris C57BL/B6J, classés en trois catégories en fonction de la structure de leur séquence codante (**Figure 57a**) [212]. Exprimées au niveau des synapses de neurones hippocampiques en culture, ces protéines sont capables de s'oligomériser entre elles et avec d'autres protéines (*e.g* PSD95) probablement grâce aux nombreuses structures en superhélice, prédites à partir de la séquence peptidique. Dans des neurones corticaux en culture, les clusters de protéines α -takusan interagissent avec la protéine Tau, empêchent son hyperphosphorylation et conséquemment la fragmentation mitochondriale induite par les protéines β -amyloïdes [213]. Ni leur expression, ni leur rôle dans le testicule n'ont encore été étudiés, mais il est fort probable que cette famille multicopie soit spécifiquement exprimée dans les spermatides rondes et qu'elle joue un rôle (*a priori*) cytoplasmique pendant la spermiogenèse. Ayant obtenu de l'équipe de Nakanishi des aliquots d'anticorps fait à façon reconnaissant

observés dans les spermatides MSYq- (**Figure 60**). En effet, la surexpression des gènes dans les spermatides Sly-KD est imputée à la relocalisation nucléaire de la protéine SLX/SLXL1 et de sa fonction activatrice. Or, la relocalisation nucléaire massive de SLX/SLXL1 n'est (en IF) observée qu'en présence de SSTY. Comment expliquer alors la surexpression des gènes dans les spermatides rondes MSYq-, en absence de SSTY ? Les protéines *Speer*, encodées par un autosome et dont la localisation nucléaire a été confirmé précédemment pourraient être responsable de cette activation massive des gènes dans les souris MSYq- (**Figure 58, Figure 59** et **Figure 60**).

Cependant, il n'est pas exclu non plus que d'autres gènes régulés par SLY soient également des protéines activatrices de l'activité transcriptionnelle. Toutefois, si l'on considère que SLY est à l'origine du contexte épigénétique globalement répressif de la PMSC, les gènes multicopies *α-takusan* et *Speer* pourraient être des suppresseurs de la distorsion qui ont évolué sur les autosomes pour échapper à la répression transcriptionnelle présente sur les chromosomes sexuels.

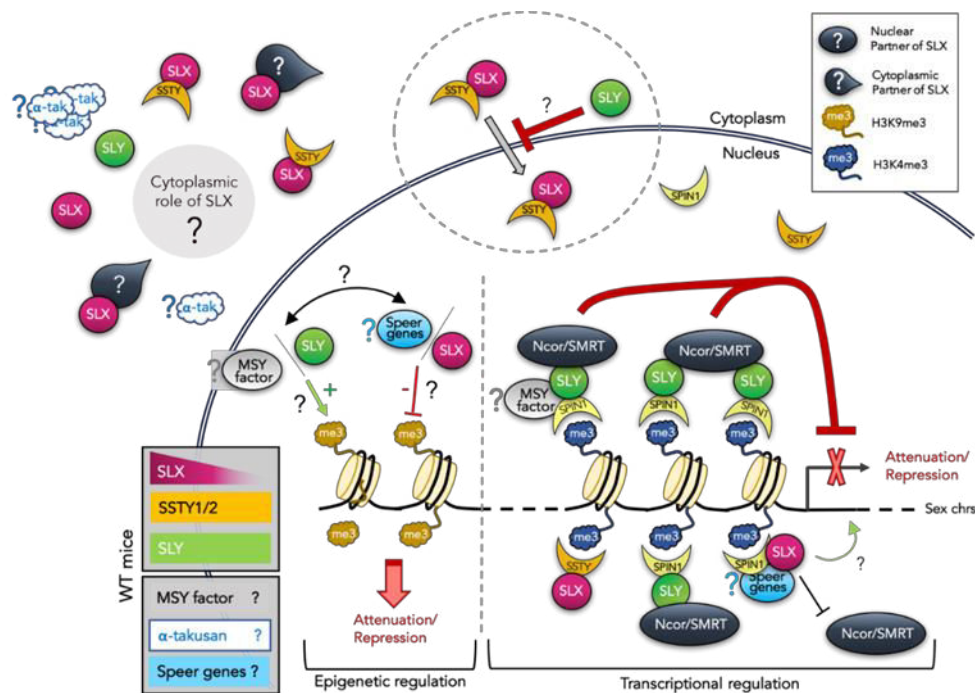


Figure 58. Régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels lors de la spermiogenèse, chez des souris WT. Dans les spermatides rondes WT, SLY est présente sur la chromatine sexuelle et permet le recrutement du complexe Ncor/SMRT. Par une voie encore non-identifiée, la présence de SLY empêche une relocalisation massive de SLX/SLXL1 vers le noyau. Les protéines SLX/SLXL1 présentes sur la chromatine activent la transcription par une voie encore méconnue. La présence de SLY sur la PMSC permet le maintien ou le recrutement de marques épigénétiques répressives comme H3K9me3. Le rôle cytoplasmique de SLX/SLXL1 et des protéines *α-takusan* n'est pas encore déterminé. La variation de quantité de protéines entre le cytoplasme et le noyau est représenté à l'aide de rectangle (ratio de protéines supposément identiques entre le cytoplasme et le noyau) ou avec des triangles (ratio différent entre le cytoplasme et le noyau). La répartition cytoplasmique/nucléaire des protéines suivies d'un point d'interrogation n'est pas déterminée.

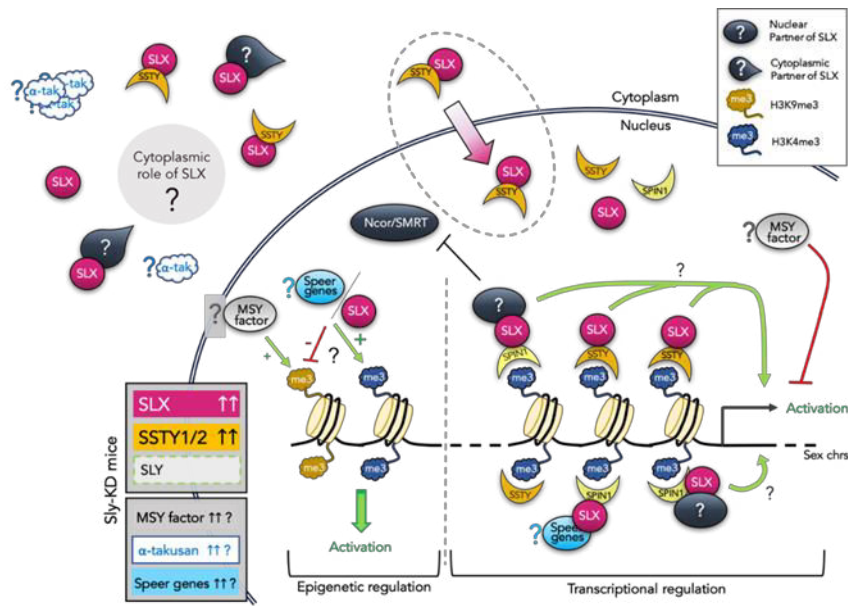


Figure 59. Régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels lors de la spermiogenèse, chez des souris Sly-KD. Dans les spermatides rondes Sly-KD, l'absence de SLY n'entrave plus la localisation nucléaire de SLX/SLXL1 qui nécessite SSTY. Les protéines SLX/SLXL1 présentes sur la chromatine activent la transcription par une voie encore méconnue. L'absence de SLY sur la PMSC ne permet plus le maintien ou le recrutement de marques épigénétiques répressives comme H3K9me3. Cependant, le « facteur MSYq » manquant empêche l'éviction totale des marques épigénétiques répressives et/ou permet une répression transcriptionnelle à la marge. Le rôle cytoplasmique de SLX/SLXL1 et des protéines α -takusan n'est pas encore déterminé. La répartition cytoplasmique/nucléaire des protéines est représentée à l'aide de rectangle (ratio de protéines supposément identiques entre le cytoplasme et le noyau). La répartition cytoplasmique/nucléaire des protéines suivies d'un point d'interrogation n'est pas déterminée.

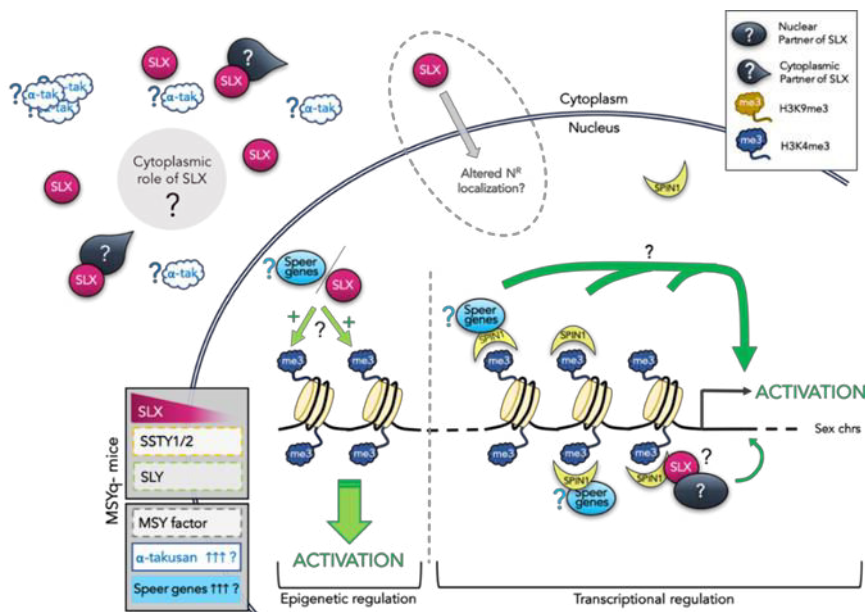


Figure 60. Régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels lors de la spermiogenèse, chez des souris MSYq-. Dans les spermatides rondes MSYq-, l'absence de SSTY ne permet plus une relocalisation massive de SLX/SLXL1 vers le noyau, sa présence sur la chromatine n'est pas déterminée. L'absence de SLY et du « facteur MSYq » manquant sur la PMSC ne permet plus le maintien ou le recrutement de marques épigénétiques répressives comme H3K9me3. Le rôle cytoplasmique de SLX/SLXL1 et des protéines α -takusan n'est pas encore déterminé. La répartition cytoplasmique/nucléaire des protéines est représentée à l'aide de rectangle (ratio de protéines supposément identiques entre le cytoplasme et le noyau). La répartition cytoplasmique/nucléaire des protéines suivies d'un point d'interrogation n'est pas déterminée. Une surexpression des gènes est représentée par des flèches montantes.

CONCLUSION

CONCLUSION

SLY, un point d'entrée pour l'étude de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels.

Sly, gène multicopie spécifique de la spermiogenèse murine apparu récemment dans le genre *Mus*, s'est révélé être une excellente porte d'entrée pour l'étude de la régulation (épi)génétique des chromosomes sexuels, et pour l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle des chromosomes sexuels (*e.g* TBL1XR1) ainsi que dans le remodelage de la chromatine pendant la spermiogenèse (*e.g.* DOT1L).

Il nous semble absolument essentiel de poursuivre ces études et d'identifier les acteurs impliqués dans la compaction de la chromatine à la fin de la spermiogenèse. En effet, les anomalies de compaction de la chromatine sont associées à une plus grande sensibilité de l'ADN spermatique au stress oxydatif, et les dommages à l'ADN (souvent accompagnés d'une faible motilité du spermatozoïde) diminuent fortement la fertilité d'un individu mâle. Toutefois, l'utilisation des techniques de procréation médicalement assistées contournant ce problème grâce à la mise en place de FIV ou d'ICSI, les facteurs génétiques ou épigénétiques responsables de l'infertilité masculine peuvent être transmis à la descendance et peuvent éventuellement être à l'origine d'anomalies du développement de l'embryon en devenir.

Il y a fort à parier que de futures études menées sur *Ssty* et *S/x/S/x/1* non seulement nous permettraient de toujours mieux caractériser les mécanismes du conflit intragénomique qui sévit entre les chromosomes sexuels, mais contribueraient également à élargir nos connaissances sur la problématique, plus générale, de la spermiogenèse.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Amann RP: **The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?** *Journal of andrology* 2008, **29**(5):469-487.
2. Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpour S, Danielsson A, Edlund K *et al*: **Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics.** *Mol Cell Proteomics* 2014, **13**(2):397-406.
3. Ramskold D, Wang ET, Burge CB, Sandberg R: **An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data.** *PLoS computational biology* 2009, **5**(12):e1000598.
4. Zhang Y, Li Q, Wu F, Zhou R, Qi Y, Su N, Chen L, Xu S, Jiang T, Zhang C *et al*: **Tissue-Based Proteogenomics Reveals that Human Testis Endows Plentiful Missing Proteins.** *Journal of proteome research* 2015, **14**(9):3583-3594.
5. de la Grange P, Gratadou L, Delord M, Dutertre M, Auboeuf D: **Splicing factor and exon profiling across human tissues.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(9):2825-2838.
6. Xu Q, Modrek B, Lee C: **Genome-wide detection of tissue-specific alternative splicing in the human transcriptome.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**(17):3754-3766.
7. Kashimada K, Koopman P: **Sry: the master switch in mammalian sex determination.** *Development (Cambridge, England)* 2010, **137**(23):3921-3930.
8. McLaren A: **Gonad development: assembling the mammalian testis.** *Curr Biol* 1998, **8**(5):R175-177.
9. Nagano R, Tabata S, Nakanishi Y, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y: **Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during spermatogenesis.** *The Anatomical record* 2000, **258**(2):210-220.
10. Western PS, Miles DC, van den Bergen JA, Burton M, Sinclair AH: **Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells.** *Stem Cells* 2008, **26**(2):339-347.
11. da Cruz I, Rodriguez-Casuriaga R, Santinaque FF, Farias J, Curti G, Capoano CA, Folle GA, Benavente R, Sotelo-Silveira JR, Geisinger A: **Transcriptome analysis of highly purified mouse spermatogenic cell populations: gene expression signatures switch from meiotic-to postmeiotic-related processes at pachytene stage.** *BMC genomics* 2016, **17**(1):294.
12. Tseng YT, Liao HF, Yu CY, Mo CF, Lin SP: **Epigenetic factors in the regulation of prospermatogonia and spermatogonial stem cells.** *Reproduction (Cambridge, England)* 2015, **150**(3):R77-91.
13. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M: **Spermatogenesis in humans and its affecting factors.** *Seminars in cell & developmental biology* 2016.
14. Rossi F, Ferraresi A, Romagni P, Silvestroni L, Santiemma V: **Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro.** *Endocrinology* 2002, **143**(8):3096-3104.
15. Cigorraga SB, Chemes H, Pellizzari E: **Steroidogenic and morphogenic characteristics of human peritubular cells in culture.** *Biology of reproduction* 1994, **51**(6):1193-1205.
16. Verhoeven G, Hoebe E, De Gendt K: **Peritubular cell-Sertoli cell interactions: factors involved in PmodS activity.** *Andrologia* 2000, **32**(1):42-45.

17. Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP: **A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell.** *The American journal of anatomy* 1990, **188**(1):21-30.
18. Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD: **Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances.** *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **315**(1-2):49-56.
19. Stanton PG: **Regulation of the blood-testis barrier.** *Seminars in cell & developmental biology* 2016.
20. Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA: **Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat.** *Cell proliferation* 1992, **25**(3):241-250.
21. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, He Z: **The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis.** *Seminars in cell & developmental biology* 2014, **29**:66-75.
22. de Rooij DG, Russell LD: **All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask.** *Journal of andrology* 2000, **21**(6):776-798.
23. de Rooij DG: **Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells.** *Reproduction (Cambridge, England)* 2001, **121**(3):347-354.
24. Oatley JM, Brinster RL: **The germline stem cell niche unit in mammalian testes.** *Physiological reviews* 2012, **92**(2):577-595.
25. Braun RE, Behringer RR, Peschon JJ, Brinster RL, Palmiter RD: **Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid.** *Nature* 1989, **337**(6205):373-376.
26. Mehta GD, Rizvi SM, Ghosh SK: **Cohesin: a guardian of genome integrity.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1823**(8):1324-1342.
27. Fawcett DW: **The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes.** *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1956, **2**(4):403-406.
28. Zickler D, Kleckner N: **Meiotic chromosomes: integrating structure and function.** *Annual review of genetics* 1999, **33**:603-754.
29. Bolcun-Filas E, Costa Y, Speed R, Taggart M, Benavente R, De Rooij DG, Cooke HJ: **SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination.** *The Journal of cell biology* 2007, **176**(6):741-747.
30. de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A: **Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation.** *Genes & development* 2005, **19**(11):1376-1389.
31. Edelmann W, Cohen PE, Kneitz B, Winand N, Lia M, Heyer J, Kolodner R, Pollard JW, Kucherlapati R: **Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis.** *Nature genetics* 1999, **21**(1):123-127.
32. Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC: **Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog.** *Mol Cell* 1998, **1**(5):697-705.
33. Yang F, De La Fuente R, Leu NA, Baumann C, McLaughlin KJ, Wang PJ: **Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis.** *The Journal of cell biology* 2006, **173**(4):497-507.

34. Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T: **The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis.** *Mol Cell* 1998, **1**(5):707-718.
35. Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C: **The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility.** *Mol Cell* 2000, **5**(1):73-83.
36. Baudat F, Imai Y, de Massy B: **Meiotic recombination in mammals: localization and regulation.** *Nat Rev Genet* 2013, **14**(11):794-806.
37. Fraune J, Schramm S, Alsheimer M, Benavente R: **The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination.** *Experimental cell research* 2012, **318**(12):1340-1346.
38. Meuwissen RL, Offenberger HH, Dietrich AJ, Riesewijk A, van Iersel M, Heyting C: **A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes.** *The EMBO journal* 1992, **11**(13):5091-5100.
39. Hamer G, Gell K, Kouznetsova A, Novak I, Benavente R, Hoog C: **Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex.** *J Cell Sci* 2006, **119**(Pt 19):4025-4032.
40. Costa Y, Speed R, Ollinger R, Alsheimer M, Semple CA, Gautier P, Maratou K, Novak I, Hoog C, Benavente R *et al*: **Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis.** *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 12):2755-2762.
41. Schramm S, Fraune J, Naumann R, Hernandez-Hernandez A, Hoog C, Cooke HJ, Alsheimer M, Benavente R: **A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility.** *PLoS Genet* 2011, **7**(5):e1002088.
42. Syrjanen JL, Pellegrini L, Davies OR: **A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation.** *Elife* 2014, **3**.
43. Winkel K, Alsheimer M, Ollinger R, Benavente R: **Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian synaptonemal complexes.** *Chromosoma* 2009, **118**(2):259-267.
44. Li XC, Bolcun-Filas E, Schimenti JC: **Genetic evidence that synaptonemal complex axial elements govern recombination pathway choice in mice.** *Genetics* 2011, **189**(1):71-82.
45. Moens PB, Chen DJ, Shen Z, Kolas N, Tarsounas M, Heng HH, Spyropoulos B: **Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes.** *Chromosoma* 1997, **106**(4):207-215.
46. de Massy B: **Initiation of meiotic recombination: how and where? Conservation and specificities among eukaryotes.** *Annual review of genetics* 2013, **47**:563-599.
47. Baudat F, Buard J, Grey C, Fledel-Alon A, Ober C, Przeworski M, Coop G, de Massy B: **PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice.** *Science* 2010, **327**(5967):836-840.
48. Brick K, Smagulova F, Khil P, Camerini-Otero RD, Petukhova GV: **Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice.** *Nature* 2012, **485**(7400):642-645.
49. Kumar R, Ghyselinck N, Ishiguro K, Watanabe Y, Kouznetsova A, Hoog C, Strong E, Schimenti J, Daniel K, Toth A *et al*: **MEI4 - a central player in the regulation of meiotic DNA double-strand break formation in the mouse.** *J Cell Sci* 2015, **128**(9):1800-1811.

50. Wojtasz L, Daniel K, Roig I, Bolcun-Filas E, Xu H, Boonsanay V, Eckmann CR, Cooke HJ, Jasin M, Keeney S *et al*: **Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase.** *PLoS Genet* 2009, **5**(10):e1000702.
51. Mimitou EP, Symington LS: **DNA end resection: many nucleases make light work.** *DNA Repair (Amst)* 2009, **8**(9):983-995.
52. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ: **ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(45):42462-42467.
53. Lee JH, Paull TT: **Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex.** *Science* 2004, **304**(5667):93-96.
54. Lu LY, Yu X: **Double-strand break repair on sex chromosomes: challenges during male meiotic prophase.** *Cell cycle* 2015, **14**(4):516-525.
55. Turner JM: **Meiotic sex chromosome inactivation.** *Development (Cambridge, England)* 2007, **134**(10):1823-1831.
56. Rouyer F, Simmler MC, Johnsson C, Vergnaud G, Cooke HJ, Weissenbach J: **A gradient of sex linkage in the pseudoautosomal region of the human sex chromosomes.** *Nature* 1986, **319**(6051):291-295.
57. Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M: **Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis.** *Science* 2011, **331**(6019):916-920.
58. Fernandez-Capetillo O, Mahadevaiah SK, Celeste A, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD, Bonner WM, Manova K, Burgoyne P, Nussenzweig A: **H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis.** *Developmental cell* 2003, **4**(4):497-508.
59. Ichijima Y, Ichijima M, Lou Z, Nussenzweig A, Camerini-Otero RD, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH: **MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells.** *Genes & development* 2011, **25**(9):959-971.
60. Royo H, Polikiewicz G, Mahadevaiah SK, Prosser H, Mitchell M, Bradley A, de Rooij DG, Burgoyne PS, Turner JM: **Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility.** *Curr Biol* 2010, **20**(23):2117-2123.
61. Inselman A, Eaker S, Handel MA: **Temporal expression of cell cycle-related proteins during spermatogenesis: establishing a timeline for onset of the meiotic divisions.** *Cytogenetic and genome research* 2003, **103**(3-4):277-284.
62. Royo H, Prosser H, Ruzankina Y, Mahadevaiah SK, Cloutier JM, Baumann M, Fukuda T, Hoog C, Toth A, de Rooij DG *et al*: **ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing.** *Genes & development* 2013, **27**(13):1484-1494.
63. Turner JM, Aprelikova O, Xu X, Wang R, Kim S, Chandramouli GV, Barrett JC, Burgoyne PS, Deng CX: **BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation.** *Curr Biol* 2004, **14**(23):2135-2142.
64. Daniel K, Lange J, Hached K, Fu J, Anastassiadis K, Roig I, Cooke HJ, Stewart AF, Wassmann K, Jasin M *et al*: **Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse HORMAD1.** *Nature cell biology* 2011, **13**(5):599-610.
65. Kouznetsova A, Wang H, Bellani M, Camerini-Otero RD, Jessberger R, Hoog C: **BRCA1-mediated chromatin silencing is limited to oocytes with a small number of asynapsed chromosomes.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 14):2446-2452.

66. Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Roest HP, Ooms M, Vreeburg J, Hoeijmakers JH, Grootegoed JA: **Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis.** *Developmental biology* 1999, **207**(2):322-333.
67. Khalil AM, Boyar FZ, Driscoll DJ: **Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(47):16583-16587.
68. Cowell IG, Aucott R, Mahadevaiah SK, Burgoyne PS, Huskisson N, Bongiorno S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Wu R et al: **Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals.** *Chromosoma* 2002, **111**(1):22-36.
69. Motzkus D, Singh PB, Hoyer-Fender S: **M31, a murine homolog of Drosophila HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis.** *Cytogenetics and cell genetics* 1999, **86**(1):83-88.
70. Metzler-Guillemain C, Luciani J, Depetris D, Guichaoua MR, Mattei MG: **HP1beta and HP1gamma, but not HP1alpha, decorate the entire XY body during human male meiosis.** *Chromosome Res* 2003, **11**(1):73-81.
71. Hoyer-Fender S, Costanzi C, Pehrson JR: **Histone macroH2A1.2 is concentrated in the XY-body by the early pachytene stage of spermatogenesis.** *Experimental cell research* 2000, **258**(2):254-260.
72. van der Heijden GW, Derijck AA, Posfai E, Giele M, Pelczar P, Ramos L, Wansink DG, van der Vlag J, Peters AH, de Boer P: **Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation.** *Nature genetics* 2007, **39**(2):251-258.
73. Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, Lee JT: **Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice.** *Curr Biol* 2006, **16**(7):660-667.
74. Turner JM: **Meiotic Silencing in Mammals.** *Annual review of genetics* 2015, **49**:395-412.
75. Bolcun-Filas E, Rinaldi VD, White ME, Schimenti JC: **Reversal of female infertility by Chk2 ablation reveals the oocyte DNA damage checkpoint pathway.** *Science* 2014, **343**(6170):533-536.
76. Turner JM, Mahadevaiah SK, Fernandez-Capetillo O, Nussenzweig A, Xu X, Deng CX, Burgoyne PS: **Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse.** *Nature genetics* 2005, **37**(1):41-47.
77. Turner JM, Mahadevaiah SK, Ellis PJ, Mitchell MJ, Burgoyne PS: **Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids.** *Developmental cell* 2006, **10**(4):521-529.
78. Odorisio T, Mahadevaiah SK, McCarrey JR, Burgoyne PS: **Transcriptional analysis of the candidate spermatogenesis gene Ube1y and of the closely related Ube1x shows that they are coexpressed in spermatogonia and spermatids but are repressed in pachytene spermatocytes.** *Developmental biology* 1996, **180**(1):336-343.
79. Hendriksen PJ, Hoogerbrugge JW, Themmen AP, Koken MH, Hoeijmakers JH, Oostra BA, van der Lende T, Grootegoed JA: **Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse.** *Developmental biology* 1995, **170**(2):730-733.
80. Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E: **Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome.** *Mol Cell Biol* 2004, **24**(12):5475-5484.

81. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N *et al*: **Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification.** *Cell* 2011, **146**(6):1016-1028.
82. Bryant JM, Donahue G, Wang X, Meyer-Ficca M, Luense LJ, Weller AH, Bartolomei MS, Blobel GA, Meyer RG, Garcia BA *et al*: **Characterization of BRD4 during mammalian postmeiotic sperm development.** *Mol Cell Biol* 2015, **35**(8):1433-1448.
83. Baarends WM, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Schoenmakers S, Sun ZW, Grootegoed JA: **Increased phosphorylation and dimethylation of XY body histones in the Hr6b-knockout mouse is associated with derepression of the X chromosome.** *J Cell Sci* 2007, **120**(Pt 11):1841-1851.
84. Dai L, Peng C, Montellier E, Lu Z, Chen Y, Ishii H, Debernardi A, Buchou T, Rousseaux S, Jin F *et al*: **Lysine 2-hydroxyisobutyrylation is a widely distributed active histone mark.** *Nat Chem Biol* 2014, **10**(5):365-370.
85. Chen Y, Sprung R, Tang Y, Ball H, Sangras B, Kim SC, Falck JR, Peng J, Gu W, Zhao Y: **Lysine propionylation and butyrylation are novel post-translational modifications in histones.** *Mol Cell Proteomics* 2007, **6**(5):812-819.
86. Flynn EM, Huang OW, Poy F, Oppikofer M, Bellon SF, Tang Y, Cochran AG: **A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and Crotonyllysine Histone Peptide Modifications.** *Structure* 2015, **23**(10):1801-1814.
87. Montellier E, Rousseaux S, Zhao Y, Khochbin S: **Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: Post-meiotic male-specific gene expression.** *Bioessays* 2011.
88. Soboleva TA, Nekrasov M, Pahwa A, Williams R, Huttley GA, Tremethick DJ: **A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes.** *Nature structural & molecular biology* 2011.
89. Bruce K, Myers FA, Mantouvalou E, Lefevre P, Greaves I, Bonifer C, Tremethick DJ, Thorne AW, Crane-Robinson C: **The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken.** *Nucleic Acids Res* 2005, **33**(17):5633-5639.
90. Xiong C, Wen Z, Li G: **Histone Variant H3.3: A versatile H3 variant in health and in disease.** *Science China Life sciences* 2016, **59**(3):245-256.
91. Colino-Sanguino Y, Clark SJ, Valdes-Mora F: **H2A.Z acetylation and transcription: ready, steady, go!** *Epigenomics* 2016, **8**(5):583-586.
92. Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, Felsenfeld G: **H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions.** *Nature genetics* 2009, **41**(8):941-945.
93. Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Mahadevaiah SK, Affara NA, Ward MA, Burgoyne PS: **The multicopy gene Sly represses the sex chromosomes in the male mouse germline after meiosis.** *PLoS biology* 2009, **7**(11):e1000244.
94. Reynard LN, Turner JM: **Increased sex chromosome expression and epigenetic abnormalities in spermatids from male mice with Y chromosome deletions.** *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 22):4239-4248.
95. Griswold MD: **Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis.** *Physiological reviews* 2016, **96**(1):1-17.
96. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R: **Chromatin dynamics during spermiogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1839**(3):155-168.

97. Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S: **From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance.** *The FEBS journal* 2010, **277**(3):599-604.
98. Drabent B, Bode C, Bramlage B, Doenecke D: **Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis.** *Histochem Cell Biol* 1996, **106**(2):247-251.
99. Lin Q, Sirotkin A, Skoultchi AI: **Normal spermatogenesis in mice lacking the testis-specific linker histone H1t.** *Mol Cell Biol* 2000, **20**(6):2122-2128.
100. Tanaka H, Iguchi N, Isotani A, Kitamura K, Toyama Y, Matsuoka Y, Onishi M, Masai K, Maekawa M, Toshimori K *et al*: **HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**(16):7107-7119.
101. Yan W, Ma L, Burns KH, Matzuk MM: **HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(18):10546-10551.
102. Mishra LN, Gupta N, Rao SM: **Mapping of post-translational modifications of spermatid-specific linker histone H1-like protein, HILS1.** *J Proteomics* 2015, **128**:218-230.
103. Nekrasov M, Soboleva TA, Jack C, Tremethick DJ: **Histone variant selectivity at the transcription start site: H2A.Z or H2A.Lap1.** *Nucleus* 2013, **4**(6):431-438.
104. Shinagawa T, Huynh LM, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Kwak HG, Dohmae N, Noguchi J, Ishii S: **Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis.** *Development (Cambridge, England)* 2015, **142**(7):1287-1292.
105. Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Hery P, Curtet S *et al*: **Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B.** *Genes & development* 2013, **27**(15):1680-1692.
106. Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thevenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S *et al*: **Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis.** *The Journal of cell biology* 2007, **176**(3):283-294.
107. Syed SH, Boulard M, Shukla MS, Gautier T, Travers A, Bednar J, Faivre-Moskalenko C, Dimitrov S, Angelov D: **The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(14):4684-4695.
108. Moss SB, Challoner PB, Groudine M: **Expression of a novel histone 2B during mouse spermiogenesis.** *Developmental biology* 1989, **133**(1):83-92.
109. Unni E, Zhang Y, Kangasniemi M, Saperstein W, Moss SB, Meistrich ML: **Stage-specific distribution of the spermatid-specific histone 2B in the rat testis.** *Biology of reproduction* 1995, **53**(4):820-826.
110. Yuen BT, Bush KM, Barrilleaux BL, Cotterman R, Knoepfler PS: **Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis.** *Development (Cambridge, England)* 2014, **141**(18):3483-3494.
111. Tang MC, Jacobs SA, Mattiske DM, Soh YM, Graham AN, Tran A, Lim SL, Hudson DF, Kalitsis P, O'Bryan MK *et al*: **Contribution of the two genes encoding histone variant h3.3 to viability and fertility in mice.** *PLoS Genet* 2015, **11**(2):e1004964.
112. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Kurumizaka H: **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* 2010, **107**(23):10454-10459.

113. Kennedy BP, Davies PL: **Acid-soluble nuclear proteins of the testis during spermatogenesis in the winter flounder. Loss of the high mobility group proteins.** *The Journal of biological chemistry* 1980, **255**(6):2533-2539.
114. Caron C, Pivot-Pajot C, van Grunsven LA, Col E, Lestrat C, Rousseaux S, Khochbin S: **Cdyl: a new transcriptional co-repressor.** *EMBO Rep* 2003, **4**(9):877-882.
115. Bell EL, Nagamori I, Williams EO, Del Rosario AM, Bryson BD, Watson N, White FM, Sassone-Corsi P, Guarente L: **SirT1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice.** *Development (Cambridge, England)* 2014, **141**(18):3495-3504.
116. Li W, Wu J, Kim SY, Zhao M, Hearn SA, Zhang MQ, Meistrich ML, Mills AA: **Chd5 orchestrates chromatin remodelling during sperm development.** *Nature communications* 2014, **5**:3812.
117. Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte AL *et al*: **Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt.** *The EMBO journal* 2012, **31**(19):3809-3820.
118. Klaus ES, Gonzalez NH, Bergmann M, Bartkuhn M, Weidner W, Kliesch S, Rathke C: **Murine and Human Spermatids Are Characterized by Numerous, Newly Synthesized and Differentially Expressed Transcription Factors and Bromodomain-Containing Proteins.** *Biology of reproduction* 2016, **95**(1):4.
119. LeRoy G, Rickards B, Flint SJ: **The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription.** *Mol Cell* 2008, **30**(1):51-60.
120. Dottermusch-Heidel C, Klaus ES, Gonzalez NH, Bhushan S, Meinhardt A, Bergmann M, Renkawitz-Pohl R, Rathke C, Steger K: **H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections.** *Andrology* 2014, **2**(5):655-665.
121. Zhang W, Hayashizaki Y, Kone BC: **Structure and regulation of the mDot1 gene, a mouse histone H3 methyltransferase.** *The Biochemical journal* 2004, **377**(Pt 3):641-651.
122. Zhang L, Deng L, Chen F, Yao Y, Wu B, Wei L, Mo Q, Song Y: **Inhibition of histone H3K79 methylation selectively inhibits proliferation, self-renewal and metastatic potential of breast cancer.** *Oncotarget* 2014, **5**(21):10665-10677.
123. Gilan O, Lam EY, Becher I, Lugo D, Cannizzaro E, Joberty G, Ward A, Wiese M, Fong CY, Ftouni S *et al*: **Functional interdependence of BRD4 and DOT1L in MLL leukemia.** *Nature structural & molecular biology* 2016, **23**(7):673-681.
124. Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML: **Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice.** *Biology of reproduction* 2004, **71**(4):1220-1229.
125. Singh J, Rao MR: **Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle.** *Biochemistry international* 1988, **17**(4):701-710.
126. Baskaran R, Rao MR: **Interaction of spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1.** *The Journal of biological chemistry* 1990, **265**(34):21039-21047.
127. Leduc F, Maquennehan V, Nkoma GB, Boissonneault G: **DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice.** *Biology of reproduction* 2008, **78**(2):324-332.
128. Bao J, Bedford MT: **Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis.** *Reproduction (Cambridge, England)* 2016, **151**(5):R55-70.

129. Gupta N, Madapura MP, Bhat UA, Rao MR: **Mapping of Post-translational Modifications of Transition Proteins, TP1 and TP2, and Identification of Protein Arginine Methyltransferase 4 and Lysine Methyltransferase 7 as Methyltransferase for TP2.** *The Journal of biological chemistry* 2015, **290**(19):12101-12122.
130. Marushige Y, Marushige K: **Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa.** *The Journal of biological chemistry* 1975, **250**(1):39-45.
131. Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB: **Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not.** *Mol Cell Biol* 1987, **7**(6):2173-2179.
132. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, Eddy EM: **Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice.** *Nature genetics* 2001, **28**(1):82-86.
133. Balhorn R: **A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.** *The Journal of cell biology* 1982, **93**(2):298-305.
134. Noblanc A, Kocer A, Drevet JR: **Recent knowledge concerning mammalian sperm chromatin organization and its potential weaknesses when facing oxidative challenge.** *Basic and clinical andrology* 2014, **24**:6.
135. Hud NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R: **Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **193**(3):1347-1354.
136. Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS: **Function of the sperm nuclear matrix.** *Archives of andrology* 2007, **53**(3):135-140.
137. Ward WS: **Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development.** *Molecular human reproduction* 2010, **16**(1):30-36.
138. Arpanahi A, Brinkworth M, Iles D, Krawetz SA, Paradowska A, Platts AE, Saida M, Steger K, Tedder P, Miller D: **Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences.** *Genome research* 2009, **19**(8):1338-1349.
139. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR: **Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development.** *Nature* 2009, **460**(7254):473-478.
140. Aitken RJ, De Iuliis GN: **Origins and consequences of DNA damage in male germ cells.** *Reprod Biomed Online* 2007, **14**(6):727-733.
141. Russell LD, Russell JA, MacGregor GR, Meistrich ML: **Linkage of manchette microtubules to the nuclear envelope and observations of the role of the manchette in nuclear shaping during spermiogenesis in rodents.** *The American journal of anatomy* 1991, **192**(2):97-120.
142. Lehti MS, Sironen A: **Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis.** *Reproduction (Cambridge, England)* 2016, **151**(4):R43-54.
143. Inaba K: **Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components.** *Molecular human reproduction* 2011, **17**(8):524-538.
144. Vadnais ML, Lin AM, Gerton GL: **Mitochondrial fusion protein MFN2 interacts with the mitostatin-related protein MNS1 required for mouse sperm flagellar structure and function.** *Cilia* 2014, **3**:5.
145. Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK: **Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'.** *Human reproduction update* 2010, **16**(2):205-224.

146. Abou-Haila A, Tulsiani DR: **Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function.** *Archives of biochemistry and biophysics* 2000, **379**(2):173-182.
147. Franik S, Hoeijmakers Y, D'Hauwers K, Braat DD, Nelen WL, Smeets D, Claahsen-van der Grinten HL, Ramos L, Fleischer K: **Klinefelter syndrome and fertility: sperm preservation should not be offered to children with Klinefelter syndrome.** *Human reproduction (Oxford, England)* 2016, **31**(9):1952-1959.
148. Khil PP, Smirnova NA, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD: **The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation.** *Nature genetics* 2004, **36**(6):642-646.
149. Bachtrog D: **Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration.** *Nat Rev Genet* 2013, **14**(2):113-124.
150. Cortez D, Marin R, Toledo-Flores D, Froidevaux L, Liechti A, Waters PD, Grutzner F, Kaessmann H: **Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals.** *Nature* 2014, **508**(7497):488-493.
151. Soh YQ, Alföldi J, Pyntikova T, Brown LG, Graves T, Minx PJ, Fulton RS, Kremitzki C, Koutseva N, Mueller JL *et al*: **Sequencing the mouse Y chromosome reveals convergent gene acquisition and amplification on both sex chromosomes.** *Cell* 2014, **159**(4):800-813.
152. Marshall Graves JA: **Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view.** *Biology of reproduction* 2000, **63**(3):667-676.
153. Marshall Graves JA: **The rise and fall of SRY.** *Trends in genetics : TIG* 2002, **18**(5):259-264.
154. Bellott DW, Hughes JF, Skaletsky H, Brown LG, Pyntikova T, Cho TJ, Koutseva N, Zaghlul S, Graves T, Rock S *et al*: **Mammalian Y chromosomes retain widely expressed dosage-sensitive regulators.** *Nature* 2014, **508**(7497):494-499.
155. Lahn BT, Page DC: **Four evolutionary strata on the human X chromosome.** *Science* 1999, **286**(5441):964-967.
156. Sandstedt SA, Tucker PK: **Evolutionary strata on the mouse X chromosome correspond to strata on the human X chromosome.** *Genome research* 2004, **14**(2):267-272.
157. Zhang YE, Vibranovski MD, Landback P, Marais GA, Long M: **Chromosomal redistribution of male-biased genes in mammalian evolution with two bursts of gene gain on the X chromosome.** *PLoS biology* 2010, **8**(10).
158. Ellegren H: **Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**(3):157-166.
159. Sin HS, Ichijima Y, Koh E, Namiki M, Namekawa SH: **Human postmeiotic sex chromatin and its impact on sex chromosome evolution.** *Genome research* 2012, **22**(5):827-836.
160. Hu YC, Namekawa SH: **Functional significance of the sex chromosomes during spermatogenesis.** *Reproduction (Cambridge, England)* 2015, **149**(6):R265-277.
161. Mueller JL, Mahadevaiah SK, Park PJ, Warburton PE, Page DC, Turner JM: **The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression.** *Nature genetics* 2008, **40**(6):794-799.
162. Bachtrog D: **Signs of genomic battles in mouse sex chromosomes.** *Cell* 2014, **159**(4):716-718.
163. Meiklejohn CD, Tao Y: **Genetic conflict and sex chromosome evolution.** *Trends Ecol Evol* 2009, **25**(4):215-223.
164. Lahn BT, Page DC: **A human sex-chromosomal gene family expressed in male germ cells and encoding variably charged proteins.** *Human molecular genetics* 2000, **9**(2):311-319.

165. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A: **Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989).** *Human reproduction (Oxford, England)* 1991, **6**(6):811-816.
166. Ferlin A, Arredi B, Foresta C: **Genetic causes of male infertility.** *Reproductive toxicology* 2006, **22**(2):133-141.
167. Stouffs K, Lissens W: **X chromosomal mutations and spermatogenic failure.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1822**(12):1864-1872.
168. Stouffs K, Tournaye H, Liebaers I, Lissens W: **Male infertility and the involvement of the X chromosome.** *Human reproduction update* 2009, **15**(6):623-637.
169. Yang F, Silber S, Leu NA, Oates RD, Marszalek JD, Skaletsky H, Brown LG, Rozen S, Page DC, Wang PJ: **TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse.** *EMBO molecular medicine* 2015, **7**(9):1198-1210.
170. Tiepolo L, Zuffardi O: **Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm.** *Hum Genet* 1976, **34**(2):119-124.
171. Heard E, Turner J: **Function of the sex chromosomes in mammalian fertility.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2011, **3**(10):a002675.
172. Dhanoa JK, Mukhopadhyay CS, Arora JS: **Y-chromosomal genes affecting male fertility: A review.** *Veterinary world* 2016, **9**(7):783-791.
173. Hughes JF, Skaletsky H, Page DC: **Sequencing of rhesus macaque Y chromosome clarifies origins and evolution of the DAZ (Deleted in AZoospermia) genes.** *Bioessays* 2012, **34**(12):1035-1044.
174. Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Graves TA, van Daalen SK, Minx PJ, Fulton RS, McGrath SD, Locke DP, Friedman C *et al*: **Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content.** *Nature* 2010, **463**(7280):536-539.
175. Decarpentrie F, Ojarikre OA, Mitchell MJ, Burgoyne PS: **Recombination between the mouse Y chromosome short arm and an additional Y short arm-derived chromosomal segment attached distal to the X chromosome PAR.** *Chromosoma* 2016, **125**(2):177-188.
176. Mazeyrat S, Saut N, Grigoriev V, Mahadevaiah SKM, Ojarikre OA, Rattigan A, Bishop C, Eicher EM, Mitchell MJ, Burgoyne PS: **A Y-encoded subunit of the translation initiation factor Eif2 is essential for mouse spermatogenesis.** *Nature genetics* 2001, **29**:49-53.
177. Vernet N, Mahadevaiah SK, Yamauchi Y, Decarpentrie F, Mitchell MJ, Ward MA, Burgoyne PS: **Mouse Y-linked Zfy1 and Zfy2 are expressed during the male-specific interphase between meiosis I and meiosis II and promote the 2nd meiotic division.** *PLoS Genet* 2014, **10**(6):e1004444.
178. Vernet N, Mahadevaiah SK, Decarpentrie F, Longepied G, de Rooij DG, Burgoyne PS, Mitchell MJ: **Mouse Y-Encoded Transcription Factor Zfy2 Is Essential for Sperm Head Remodelling and Sperm Tail Development.** *PloS one* 2016, **11**(1):e0145398.
179. Yamauchi Y, Riel JM, Ruthig V, Ward MA: **Mouse Y-Encoded Transcription Factor Zfy2 Is Essential for Sperm Formation and Function in Assisted Fertilization.** *PLoS Genet* 2015, **11**(12):e1005476.
180. Matsubara Y, Kato T, Kashimada K, Tanaka H, Zhi Z, Ichinose S, Mizutani S, Morio T, Chiba T, Ito Y *et al*: **TALEN-Mediated Gene Disruption on Y Chromosome Reveals Critical Role of EIF2S3Y in Mouse Spermatogenesis.** *Stem cells and development* 2015, **24**(10):1164-1170.

181. Mahadevaiah SK, Odorisio T, Elliott DJ, Rattigan A, Szot M, Laval SH, Washburn LL, McCarrey JR, Cattanach BM, Lovell-Badge R *et al*: **Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities.** *Human molecular genetics* 1998, **7**(4):715-727.
182. Szot M, Grigoriev V, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Tour A, Von Glasenapp E, Rattigan A, Turner JM, Elliott DJ, Burgoyne PS: **Does Rbmy have a role in sperm development in mice?** *Cytogenetic and genome research* 2003, **103**(3-4):330-336.
183. Abid S, Sagare-Patil V, Gokral J, Modi D: **Cellular ontogeny of RBMY during human spermatogenesis and its role in sperm motility.** *Journal of biosciences* 2013, **38**(1):85-92.
184. Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Sutcliffe MJ, Palmer SJ: **Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermiogenesis" gene mapping to the long arm.** *Cell* 1992, **71**(3):391-398.
185. Conway SJ, Mahadevaiah SK, Darling SM, Capel B, Rattigan AM, Burgoyne PS: **Y353/B: a candidate multiple-copy spermiogenesis gene on the mouse Y chromosome.** *Mamm Genome* 1994, **5**(4):203-210.
186. Ward MA, Burgoyne PS: **The Effects of Deletions of the Mouse Y Chromosome Long Arm on Sperm Function - Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) - Based Analysis.** *Biology of reproduction* 2006, **74**:652-658.
187. Toure A, Szot M, Mahadevaiah SK, Rattigan A, Ojarikre OA, Burgoyne PS: **A new deletion of the mouse Y chromosome long arm associated with the loss of Ssty expression, abnormal sperm development and sterility.** *Genetics* 2004, **166**(2):901-912.
188. Toure A, Clemente EJ, Ellis P, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Ball PA, Reynard L, Loveland KL, Burgoyne PS, Affara NA: **Identification of novel Y chromosome encoded transcripts by testis transcriptome analysis of mice with deletions of the Y chromosome long arm.** *Genome biology* 2005, **6**(12):R102.
189. Ellis PJI, Clemente EJ, Ball P, Toure A, Ferguson L, Turner JMA, Loveland KL, Affara NA, Burgoyne PS: **Deletions on mouse Yq lead to upregulation of multiple X- and Y-linked transcripts in spermatids.** *Human molecular genetics* 2005, **14**:2705-2715.
190. Yamauchi Y, Riel JM, Stoytcheva Z, Burgoyne PS, Ward MA: **Deficiency in mouse Y chromosome long arm gene complement is associated with sperm DNA damage.** *Genome biology* 2010, **11**(6):R66.
191. Riel JM, Yamauchi Y, Sugawara A, Li HY, Ruthig V, Stoytcheva Z, Ellis PJ, Cocquet J, Ward MA: **Deficiency of the multi-copy mouse Y gene Sly causes sperm DNA damage and abnormal chromatin packaging.** *J Cell Sci* 2013, **126**(Pt 3):803-813.
192. Lolis D, Georgiou I, Syrrou M, Zikopoulos K, Konstantelli M, Messinis I: **Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization.** *Int J Androl* 1996, **19**(1):23-27.
193. Reynard LN, Cocquet J, Burgoyne PS: **The multi-copy mouse gene Sycp3-like Y-linked (Sly) encodes an abundant spermatid protein that interacts with a histone acetyltransferase and an acrosomal protein.** *Biology of reproduction* 2009, **81**(2):250-257.
194. Cocquet J, Ellis PJ, Mahadevaiah SK, Affara NA, Vaiman D, Burgoyne PS: **A genetic basis for a postmeiotic X versus Y chromosome intragenomic conflict in the mouse.** *PLoS Genet* 2012, **8**(9):e1002900.

195. Kohn MJ, Sztein J, Yagi R, DePamphilis ML, Kaneko KJ: **The acrosomal protein Dickkopf-like 1 (DKKL1) facilitates sperm penetration of the zona pellucida.** *Fertil Steril* 2010, **93**(5):1533-1537.
196. Zheng P, Eastman J, Vande Pol S, Pimplikar SW: **PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(25):14745-14750.
197. Su X, Zhu G, Ding X, Lee SY, Dou Y, Zhu B, Wu W, Li H: **Molecular basis underlying histone H3 lysine-arginine methylation pattern readout by Spin/Ssty repeats of Spindlin1.** *Genes & development* 2014, **28**(6):622-636.
198. Eberl HC, Spruijt CG, Kelstrup CD, Vermeulen M, Mann M: **A map of general and specialized chromatin readers in mouse tissues generated by label-free interaction proteomics.** *Mol Cell* 2013, **49**(2):368-378.
199. Cocquet J, Ellis PJ, Yamauchi Y, Riel JM, Karacs TP, Rattigan A, Ojarikre OA, Affara NA, Ward MA, Burgoyne PS: **Deficiency in the multicopy Sycp3-like X-linked genes Slx and Slxl1 causes major defects in spermatid differentiation.** *Mol Biol Cell* 2010, **21**(20):3497-3505.
200. Conway SJ, Mahadevaiah SK, Darling SM, Capel B, Rattigan ÁM, Burgoyne PS: **Y353/B: a candidate multiple-copy spermiogenesis gene on the mouse Y chromosome.** *Mammalian Genome* 1994, **5**:203-210.
201. Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Sutcliffe MJ, Palmer SJ: **Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermiogenesis" gene mapping to the long arm.** *Cell* 1992, **71**:391-398.
202. Helleu Q, Gerard PR, Montchamp-Moreau C: **Sex chromosome drive.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2015, **7**(2):a017616.
203. Good JM, Giger T, Dean MD, Nachman MW: **Widespread over-expression of the X chromosome in sterile F1 hybrid mice.** *PLoS Genet* 2010, **6**(9).
204. Good JM: **The conflict within and the escalating war between the sex chromosomes.** *PLoS Genet* 2012, **8**(9):e1002955.
205. Mulugeta Achame E, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Sleddens-Linkels E, Ooms M, Sun ZW, van IWF, Grootegoed JA, Baarends WM: **The ubiquitin-conjugating enzyme HR6B is required for maintenance of X chromosome silencing in mouse spermatocytes and spermatids.** *BMC genomics* 2010, **11**:367.
206. Lu LY, Wu J, Ye L, Gavrilina GB, Saunders TL, Yu X: **RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis.** *Developmental cell* 2010, **18**(3):371-384.
207. Sin HS, Barski A, Zhang F, Kartashov AV, Nussenzweig A, Chen J, Andreassen PR, Namekawa SH: **RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids.** *Genes & development* 2012, **26**(24):2737-2748.
208. Perissi V, Jepsen K, Glass CK, Rosenfeld MG: **Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**(2):109-123.
209. Berger SL: **The complex language of chromatin regulation during transcription.** *Nature* 2007, **447**(7143):407-412.
210. Zhang KM, Wang YF, Huo R, Bi Y, Lin M, Sha JH, Zhou ZM: **Characterization of Spindlin1 isoform2 in mouse testis.** *Asian journal of andrology* 2008, **10**(5):741-748.

- 211. Devaiah BN, Case-Borden C, Geronne A, Hsu CH, Chen Q, Meerzaman D, Dey A, Ozato K, Singer DS: **BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin.** *Nature structural & molecular biology* 2016, **23**(6):540-548.
- 212. Tu S, Shin Y, Zago WM, States BA, Eroshkin A, Lipton SA, Tong GG, Nakanishi N: **Takusan: a large gene family that regulates synaptic activity.** *Neuron* 2007, **55**(1):69-85.
- 213. Nakanishi N, Ryan SD, Zhang X, Khan A, Holland T, Cho EG, Huang X, Liao FF, Xu H, Lipton SA *et al*: **Synaptic protein alpha1-takusan mitigates amyloid-beta-induced synaptic loss via interaction with tau and postsynaptic density-95 at postsynaptic sites.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2013, **33**(35):14170-14183.
- 214. Spiess AN, Walther N, Muller N, Balvers M, Hansis C, Ivell R: **SPEER--a new family of testis-specific genes from the mouse.** *Biology of reproduction* 2003, **68**(6):2044-2054.