



La maturation de la Protamine-2 dans l'organisation post-méiotique du génome mâle

Alexandra Vargas

► To cite this version:

Alexandra Vargas. La maturation de la Protamine-2 dans l'organisation post-méiotique du génome mâle. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. Français. NNT : 2021GRALV027 . tel-03351831

HAL Id: tel-03351831

<https://theses.hal.science/tel-03351831>

Submitted on 22 Sep 2021

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'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Alexandra VARGAS

Thèse dirigée par **Sophie ROUSSEAU**, DR, INSERM et
codirigée par **Saadi KHOCHBIN**, DRCE, CNRS

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

**La maturation de la Protamine-2 dans
l'organisation post-méiotique du génome
mâle**

**Protamine-2 maturation in post-meiotic
male genome organization**

Thèse soutenue publiquement le **3 juin 2021**,
devant le jury composé de :

Pr. Claire VOUREH

Professeur, Université Grenoble Alpes, Grenoble Présidente du jury

Pr. Gabriel LIVERA

Professeur, Universités de Paris et Paris Saclay Rapporteur

Dr. Valérie GRANDJEAN

Chargé de recherche, INSERM, Nice Rapportrice

Dr. Aminata TOURE

Directeur de recherche, CNRS, Grenoble Examinatrice

Dr. Sophie ROUSSEAU

Directeur de Recherche, INSERM, Grenoble Membre invité

Dr. Saadi KHOCHBIN

Directeur de recherche, CNRS, Grenoble Membre invité



À mon petit cœur arc-en-ciel,

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier l'ensemble des membres de mon jury. Je remercie Monsieur le Professeur Gabriel LIVERA et Madame le Docteur Valérie GRANDJEAN d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie également Madame le Professeur Claire VOURC'H et Madame le Docteur Aminata TOURE d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et de juger ce travail.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Jérôme GOVIN et Yohann COUTE pour leurs conseils avisés durant l'avancée de cette thèse.

A Saadi et Sophie R, je vous remercie du fond du cœur de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Je vous remercie d'avoir dirigé cette thèse avec compréhension et optimisme, je vous remercie de vos judicieux conseils. Saadi, Sophie, merci infiniment pour tout.

Je tiens à remercier particulièrement Fayçal pour son investissement dans la relecture de ce manuscrit, dans son aide dans l'apprentissage de superviseur et pour toute son aide durant ma thèse. Fayçal, du fond du cœur, merci.

Je remercie de tout mon cœur Sophie B. Je te remercie de m'avoir tout appris à mon arrivée au labo, quand les circonstances ont rendu les choses tellement difficiles. Je te remercie de ta bonne humeur et de tes qualités humaines. J'espère sincèrement que ton mérite sera récompensé.

Je voudrais ensuite remercier tous les membres de la SK team : Katia, Florent, Thierry, Anne-Laure, Sandrine, Domenico, Naghmeh, Mengqing, Azadeh, Clovis, Amir, Tao et Michel. Un grand merci à Naghmeh, Mélanie, Naël, Domenico, Clovis et bien sûr Sophie B pour tous nos bons moments passés à rire, je n'oublierai jamais. Merci également à tous mes collègues de l'IAB. Enfin, je tiens à remercier aussi ma stagiaire Amandine.

Je remercie, tous ceux, qui de près ou de loin, ont participé à ce projet et notamment Yohann de la plateforme d'analyses protéomiques. Merci à Alexeï, Mylène et Jacques de la plateforme de microcopie mais aussi merci à Karine et Anne de m'avoir appris l'art de la microscopie électronique. Si vous saviez à quel point la ME est devenue une vraie passion ! Merci également à Véronique de la plateforme d'histologie.

Je remercie du plus profond de mon cœur mes amis de toujours, le groupe des « friends » qui a toujours été là auprès de moi depuis le lycée : Amélie, Éric, Emilie, JB, Nico, Micka, Audrey, Hélène, Seb et Poussin. Que ces lignes dans ce manuscrit témoignent de l'importance que vous avez dans mon cœur...

Je remercie également Gaby pour sa gentillesse et sa présence durant ces deux dernières années, ainsi que Nina ces derniers mois. À mes amis, merci de m'avoir encouragé, merci de m'avoir aidé, merci de ces liens du cœur créés ensemble. Merci à tous ceux qui par quelques mots ou par une délicate attention ont été présents à un moment ou à un autre. À tous les passeurs d'émotions, comme disait une petite fille il y a bien longtemps, merci.

SB, je ne sais comment vous remercier alors je vais simplement vous dire merci de tout mon cœur car sans votre soutien je n'y serai jamais arrivée.

À tous ceux que j'oublie, je suis désolée, et je vous remercie sincèrement.

Enfin, je dédie tout ce travail au rayon de soleil de ma vie. À toi, ma petite fille. Avec et grâce à toi, j'y suis arrivée. Le jour où tu liras ces lignes retiens que rien n'est impossible, que l'on peut arriver en haut de l'Everest si on le désire vraiment. Même lorsque les obstacles qui se trouvent sur ton chemin semblent te mettre à terre, regarde l'horizon au loin, n'oublie jamais la direction que tu t'es fixée.

Tu es ma plus grande force, et que lorsque je faiblissais je trouvais toujours des ressources auprès de toi, en me mettant à hauteur de ton monde d'enfant. C'est avec toi que j'ai connu mes plus grandes joies, mais aussi mes plus grandes peurs et mes plus grandes peines, et je souhaite sincèrement à tous de pouvoir connaître l'incroyable bonheur d'être parent. Ma grande et petite fille, si unique, si précieuse, je te souhaite que ta vie soit à ton image, pétillante et étincelante. Puisse un jour le Monde devenir plus bienveillant face à la différence, à l'image de tes cœurs arc-en-ciel.

Résumé

Le processus de maturation des spermatides, la spermiogénèse, est unique en de nombreux points et implique des réorganisations majeures des différents compartiments cellulaires. Pendant les stades de spermatides allongées et condensées, ce processus inclut notamment une compaction drastique du génome paternel qui sera transmis à la future descendance. Lors de ce processus la quasi-totalité des histones est enlevée et celles-ci sont remplacées par des protéines spécifiques, les protamines, qui s'associent au génome paternel et le compactent dans les spermatozoïdes matures. Ce processus de réorganisation est essentiel afin d'éviter des dommages à l'ADN avant et pendant la fécondation et afin qu'un épigénome paternel spécifique soit correctement transmis à la descendance. Les mécanismes de réorganisation de la chromatine font tout d'abord intervenir une vague d'hyperacétylation des histones qui induit ensuite leur enlèvement. L'incorporation de H2A.L.2, un variant spécifique du testicule, va permettre au nucléosome d'adopter une structure plus ouverte et permettre l'invasion de l'ADN par les protéines de transition qui contrôlent le recrutement des protamines et leur incorporation dans le génome paternel. La protamine-2 est synthétisée sous forme d'un précurseur immature qui nécessite d'être clivée pour être correctement intégrée à l'ADN. Cependant, le rôle fonctionnel de la maturation de la protamine-2 dans la spermatogenèse normale et son implication dans l'infertilité n'ont pas été explorées. Mon travail de thèse vise à caractériser cette maturation à l'aide d'un anticorps spécifique de la pré-Prm2. Nous avons démontré qu'il y avait une accumulation de pré-Prm2 dans plusieurs modèles de souris où il y avait un défaut dans le processus de transition des histones vers les protamines et que le processus de maturation était donc lié au processus d'enlèvement des histones. Nous avons également pu démontrer que l'action des protéines de transition et des protamines est complètement simultanée et que les deux protéines interagissent. En outre, l'anticorps spécifique de la pré-PRM2 humaine montre qu'il y a une rétention de pré-PRM2 chez certains patients infertiles et que cette rétention est corrélée à des défauts de compaction de l'ADN, de formation de l'acrosome et de mobilité spermatique. Enfin, à partir d'un certain seuil d'accumulation aberrante de pré-PRM2, le taux de fécondation est diminué. En conclusion, cette étude a montré qu'une mauvaise maturation de la PRM2 a des conséquences sur le génome mâle, et que cet outil pourrait apporter des informations essentielles en clinique humaine dans l'avenir.

Abstract

The process of sperm maturation, spermiogenesis, is unique in many ways and involves major reorganizations of the different cellular compartments. During the elongated and condensed spermatid stages, this process includes a drastic compaction of the paternal genome that will be transmitted to the future offspring. During this process almost all histones are removed and replaced by specific proteins, the protamines, which associate with the paternal genome and compact it in the mature spermatozoa. This reorganization process is essential to avoid DNA damage before and during fertilization and to ensure that a specific paternal epigenome is correctly transmitted to the offspring. The mechanisms of chromatin reorganization first involve a wave of histone hyperacetylation, which then induces their removal. The incorporation of H2A.L.2, a testis-specific histone H2A variant, allows the nucleosome to adopt a more open structure and allows the invasion of the nucleosome by transition proteins that control in turn the recruitment of protamines and their incorporation into the paternal genome. Protamine-2 is synthesized as an immature precursor that requires multiple cleavages to be properly assembled on DNA. However, the functional role of protamine-2 maturation in normal spermatogenesis and its implication in infertility have not been explored. My thesis work aims to characterize this maturation process using a specific antibody against Pre-Prm2. We demonstrated that there was an accumulation of Pre-Prm2 in several mouse models, with defects in the histone-to-protamine transition process and that the maturation process was therefore related to histone removal. We were also able to demonstrate that the transition proteins and the protamines act simultaneously and that the two proteins interact with each other. Furthermore, the use of the antibody specific to human Pre-PRM2 shows that there is retention of Pre-PRM2 in some infertile patients and that this retention correlates with defects in DNA compaction, acrosome formation and sperm motility. Finally, from a certain threshold of aberrant accumulation of Pre-PRM2, the fertilization rate is decreased. In conclusion, this study has shown that poor maturation of PRM2 has consequences on the male genome organization, and that this tool could provide essential information in the human clinic in the future.

Chromatin reorganization, Spermatogenesis, Protamine-2, Maturation, Infertility

Table des matières

INTRODUCTION	5
I. Structure et fonction de la chromatine	7
1- Structure de la chromatine	7
1-1. Découverte de la chromatine	7
1-2. Le nucléosome : unité de base de la chromatine.....	10
1- 2. a. Les histones de cœur	12
1- 2. b. L'histone de liaison	13
2- Organisation fonctionnelle de la chromatine.....	14
2- 1. Niveaux d'organisation de la chromatine	14
2- 2. Domaines chromatinien.....	17
II. La spermatogenèse chez les mammifères	19
1- Description générale de la spermatogenèse.....	19
2- Organisation du testicule	20
3- Les différentes phases de la spermatogenèse	21
3- 1. La phase mitotique	23
3- 2. La phase méiotique	24
3- 3. La phase post-méiotique	27
4- La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme	28
5- Les cycles de la spermatogenèse.....	29
6- Morphologie finale du spermatozoïde.....	31
6- 1. La tête du spermatozoïde.....	31
6- 1. a. L'acrosome	31
6- 1. b. Le complexe acrosome-acroplaxome-manchette	32
6- 1. c. Le noyau	35
6- 2. Le flagelle.....	35

III. Réorganisation post-méiotique de la chromatine durant la spermatogenèse	36
1- Organisation finale du génome mâle	36
2- Les acteurs de la réorganisation de la chromatine au	37
cours de la maturation post-méiotique des cellules germinales mâles.....	37
3- Rôle des modifications post-traductionnelles des histones.....	38
dans le processus de remplacement des histones par les protamines.....	38
3- 1. Acétylation des histones	39
3- 2. Méthylation des histones	40
3- 3. Autres modifications post-traductionnelles des histones.....	40
4- Rôle des variants d'histones dans le processus de.....	41
remplacement des histones par les protamines	41
4- 1. Le variant TH2B.....	41
4- 2. Le variant H2A.L.2.....	42
5- Rôle d'autres acteurs connus dans l'échange histones-	44
protamines	44
5- 1. Le facteur à double bromodomaine, BRDT	44
5- 2. Le facteur nucléaire testiculaire, Nut	44
IV. Implication des protéines de transition et des protamines dans la maturation post-méiotique des cellules germinales mâles	46
1- Les protéines de transition (TPs)	46
1- 1. Structure.....	46
1- 2. Fonction.....	48
2- Les protamines (Prms).....	50
2- 1. Structure.....	50
2- 2. Maturation de la PRM2	54
2- 3. Fonction.....	54

V. Infertilité chez l'homme	56
1- Définition et données épidémiologiques	56
2- Facteurs génétiques impliqués dans certains phénotypes	57
2- 1. L'azoospermie	57
2- 2. La globozoospermie	58
2- 3. L'asthénozoospermie et les phénotypes flagellaires	59
3- Les techniques de procréation médicalement assistée (PMA)	59
3- 1. L'insémination artificielle (IA).....	59
3- 2. La fécondation <i>in vitro</i> (FIV)	59
3- 3. La FIV avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (FIV-ICSI).....	60
VI. Implication des protéines de transitions (TPs) et des protamines (PRMs) dans l'infertilité masculine.....	61
1- Les TPs	61
2- Les protamines	61
OBJECTIFS DE THESE	65
RESULTATS.....	69
Article: Direct visualization of pre-protamine 2, as a tool to score aberrant histone eviction, male infertility and embryo formation failure.....	71
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	111
Aspect fondamental de la maturation de la protamine-2 et implication de ce processus dans l'infertilité masculine.....	113
CONCLUSION GENERALE	119
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123
ANNEXES.....	141

INTRODUCTION

I. Structure et fonction de la chromatine

1- Structure de la chromatine

1-1. Découverte de la chromatine

La découverte de la chromatine en tant que telle aura nécessité de nombreuses découvertes qui se seront étalées sur plusieurs décennies (Figure 1).

Dans un premier temps, les bases théoriques de la génétique furent établies par G. Mendel qui propose en 1866 que les caractéristiques des êtres vivants soient gouvernées par une double commande, deux allèles en somme, et qu'une seule des deux soit transmise au descendant par chacun des parents (Mendel, 1866).

Ce n'est que quelques années plus tard que débutent les découvertes concernant le support de l'hérédité. En effet, en 1871, F. Miescher parvient à isoler des noyaux de leucocytes de patients atteints d'infection purulente et y découvre une nouvelle substance riche en phosphore et en azote qu'il nommera nucléine (Miescher, 1871).

C'est ensuite en 1882 que W. Flemming inventera le terme de chromatine après avoir mis en évidence que dans le noyau se trouve une substance dense ayant tendance à fixer les colorants basophiles, la traduction du terme grec khroma étant couleur. Celui-ci suggère que la nucléine et la chromatine sont en réalité la même entité. Grâce aux progrès de la microscopie, il identifie également les chromosomes métaphasiques et décrit les différentes étapes de la mitose (Flemming, 1882).

A. Kossel poursuivra ces études et à partir de noyaux d'érythrocytes de poulet parviendra à purifier une fraction basique associée à la nucléine, fraction protéique qu'il nommera histone. R. Altmann séparera ensuite, en 1889, la nucléine en 2 fractions : une fraction protéique et une fraction acide qu'il nommera acide nucléique. A. Kossel précisera la composition de l'acide nucléique en démontrant la présence dans celle-ci de bases puriques et pyrimidiques, d'un sucre et d'acide phosphorique (Kossel, 1911).

La théorie de l'hérédité de Mendel sera remise à jour par T. Boveri et W. Sutton qui, indépendamment, développeront la théorie chromosomique, T. Boveri en étudiant le développement embryonnaire de l'oursin (Boveri, 1902) et W. Sutton en observant pour la première fois la méiose chez la sauterelle (Sutton, 1902). Leur théorie aura pour postulat que les chromosomes sont les facteurs de l'hérédité, théorie développée par G. Mendel.

Cette théorie sera très contestée jusqu'en 1915, année à laquelle les travaux de T. Morgan chez la drosophile viendront l'appuyer (Morgan, 1915).

En 1919, P. Levene met en évidence que le sucre en question est le désoxyribose et l'acide nucléique est finalement dénommé ADN pour acide désoxyribonucléique (Levene, 1919).

Il a cependant fallu encore quelques années avant que l'ADN ne soit définitivement établi en tant que support de l'hérédité.

F. Griffith découvrit en 1928 que des bactéries non pathogènes pouvaient le devenir si dans leur milieu se trouvait des bactéries pathogènes mortes. Il a mis en évidence que si on injectait les deux souches à des souris, celles-ci mouraient. Il appela cela « principe transformant ». Ceci servit de base à O. Avery, C. MacLeod et M. McCarty qui montrèrent en 1944 que l'ADN est le support de l'hérédité. Ils traitèrent des extraits bactériens avec des protéases, une ribonucléase ou une « dépolymérase à ADN » avant de les injecter aux souris, et constatèrent que seuls les extraits traités avec une « dépolymérase » à ADN devenaient incapables de « transformer » (Avery, MacLeod et al., 1944).

Dans un deuxième temps, E. Chargaff démontra en 1950 que l'ADN est un polymère dont le monomère est le nucléotide. Celui-ci est composé d'une base azotée, d'un sucre, le désoxyribose et d'un groupement phosphate. Il découvrit aussi que les bases azotées ne sont pas présentes en quantités équimolaires et que cette proportion diffère selon les organismes (Chargaff, 1950).

A. Hershey et M. Chase conduisirent, en 1952, une série d'expériences sur des bactériophages. Du soufre radioactif était incorporé dans la composante protéique du bactériophage ou du phosphore radioactif était incorporé dans l'ADN de celui-ci. Ils montrèrent grâce à cela que les bactéries contenaient de l'ADN radioactif à la suite de leur infection par un phage, ce qui clôtura définitivement le débat sur l'ADN en tant que support de l'hérédité (Hershey and Chase, 1952).

La structure de l'ADN en double hélice fut enfin mise à jour par J. Watson et F. Crick en 1953, grâce aux travaux de Rosalind Franklin, ce qui permit d'éclairer non seulement le fait qu'il s'agissait d'une macromolécule codante mais aussi et surtout, grâce à la découverte de la complémentarité des bases, les mécanismes moléculaires à la base des lois définies par Mendel presque un siècle auparavant (Watson and Crick, 1953). L'ADN forme une structure en double hélice composée de deux brins. Chaque brin comprend une succession de nucléotides et chaque nucléotide est constitué d'un groupement phosphate, un sucre (le désoxyribose) et une base azotée. Les bases Cytosine-Guanine et Adénine-Thymine s'apparient en formant des liaisons hydrogènes ce qui stabilise la structure en double hélice de l'ADN (Figure 2A).

Par la suite, l'amélioration des techniques de Biochimie donna lieu à une meilleure purification des histones, ce qui mit en lumière leur incroyable conservation au sein de tous les eucaryotes. Enfin, l'établissement du code génétique en 1961 par MW. Nirenberg permit de comprendre que l'information génétique de l'ADN était déchiffrée en acides aminés (Nirenberg and Matthaei, 1961).

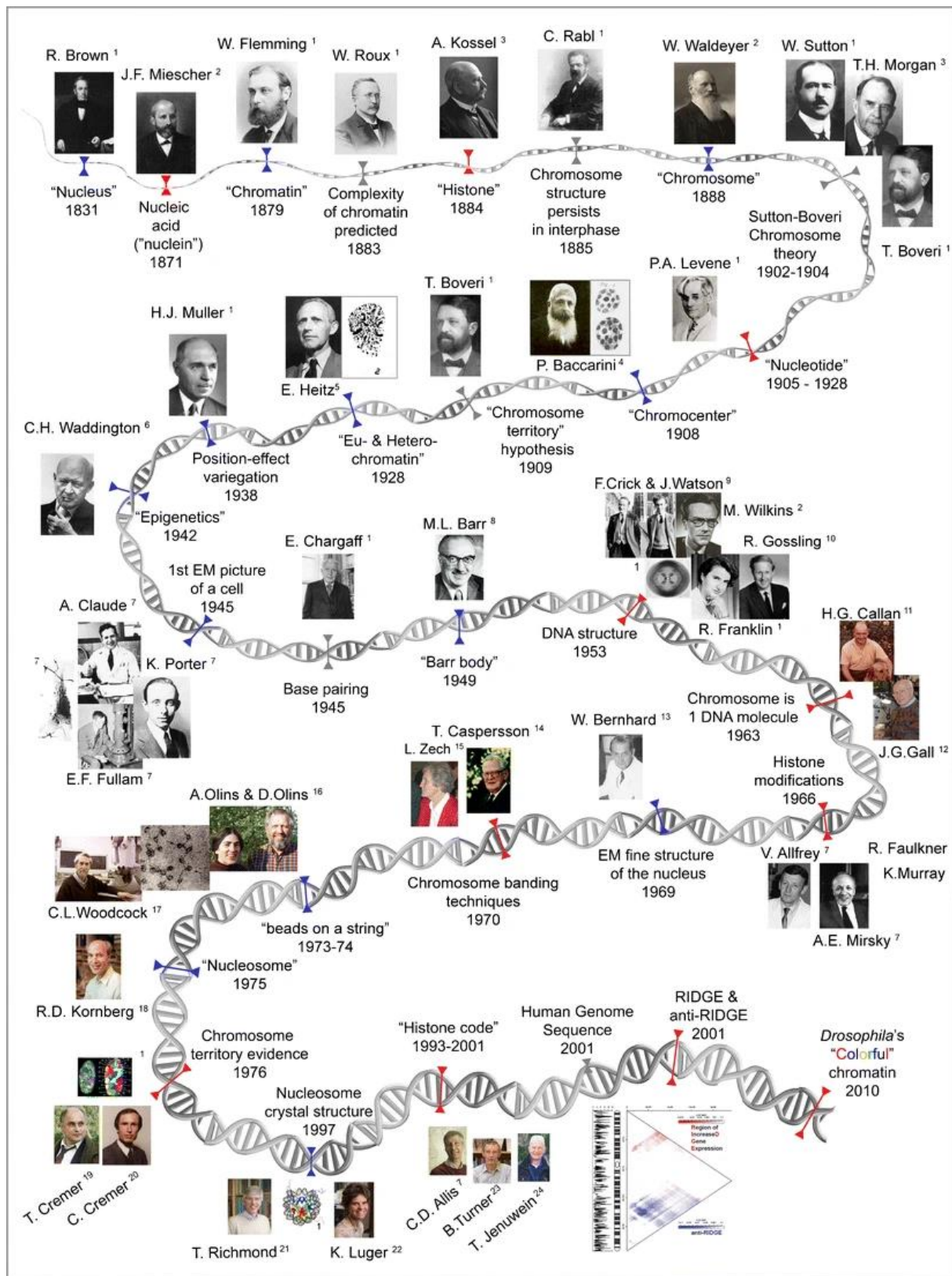


Figure 1 – Historique des grandes découvertes concernant la chromatine avec en gris les concepts, en bleu les aspects cellulaires et en rouge les aspects moléculaires (Issue de Jost et al., 2012).

1-2. Le nucléosome : unité de base de la chromatine

Au vu de la taille considérable du génome chez les organismes eucaryotes, il est nécessaire que l'ADN soit considérablement compacté afin de pouvoir rentrer dans le noyau de la cellule. Le premier niveau d'organisation est obtenu grâce aux histones, la chromatine est en effet la structure nucléoprotéique qui associe les histones avec l'ADN.

Bien que D.M. Phillips et E.W. Johns réussissent à identifier 5 histones majoritaires par extraction acide en 1965 (Phillips et Johns, 1965), il faudra attendre les années 1970 pour qu'il y ait un tournant dans la découverte de la structure de la chromatine.

Dans un premier temps R. Clark et G. Felsenfeld observèrent en 1971 que certaines régions de la chromatine étaient sensibles à une nucléase, signifiant que certaines régions de l'ADN n'étaient pas recouvertes par les histones (Clark and Felsenfeld, 1971).

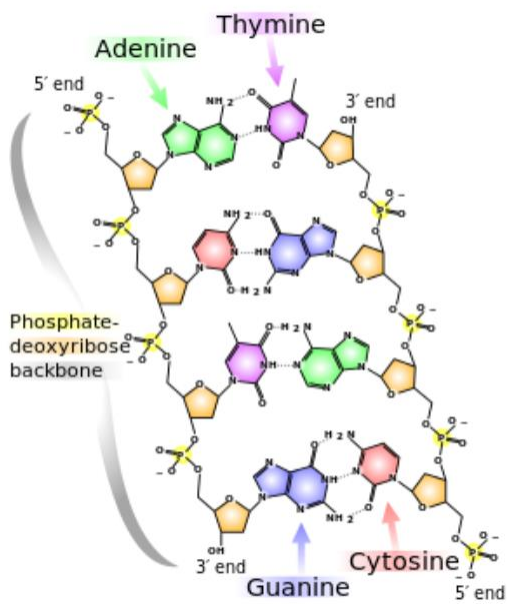
Dans un deuxième temps, l'usage accidentel d'une endonucléase a permis de mettre en évidence que la chromatine était constituée de sous-unités répétées (Hewish and Burgoyne, 1973).

Mais la première découverte majeure eut lieu en 1974 grâce aux progrès en microscopie électronique qui dévoila l'enchaînement des unités en structure en « collier de perles » (Figure 2B) (Olins and Olins, 1974 ; Oudet et al., 1975).

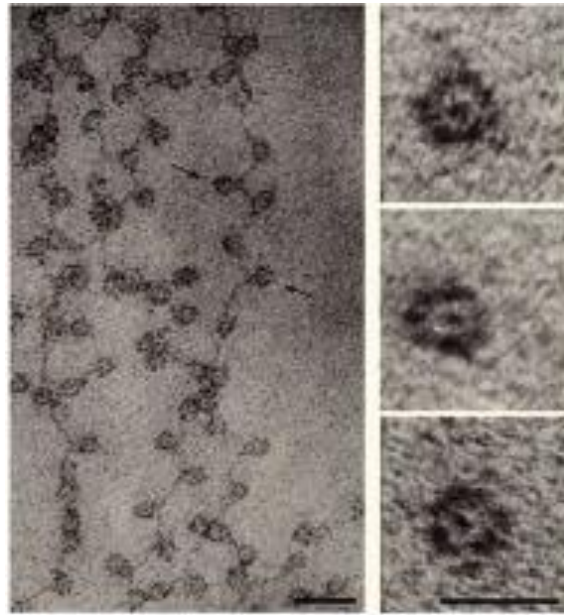
C'est R. Kornberg qui identifia l'unité de base, composée de 4 paires d'histones associées à environ 200 paires de bases d'ADN (Kornberg, 1974), et cette structure fut ensuite nommée nucléosome par P. Chambon en 1975 (Oudet et al., 1975).

La première structure par cristallographie aux rayons X fut obtenue à une résolution de 7 Å par T.J. Richmond en 1984 (Richmond et al., 1984). La structure de l'octamère d'histones sera ensuite proposée à une résolution de 3.1 Å par E. Moudrianakis en 1991 (Arents et al., 1991). Une structure de la particule de cœur à la résolution de 2.8 Å fut obtenue en 1997 et enfin à 1.9 Å en 2003 (Figure 2C) (Luger et al., 1997 ; Richmond and Davey, 2003).

A



B



C

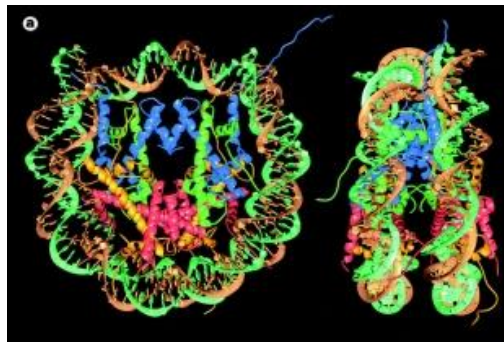


Figure 2 – Structure et composition de la chromatine.

- A- Structure chimique de la molécule d'ADN (illustration de M. Price Ball). Celle-ci est composée de deux chaînes de polynucléotides, chaque nucléotide comprenant un groupement phosphate, un groupement désoxyribose et une base azotée. Le squelette est composé des groupements phosphate et désoxyribose. Les deux chaînes sont liées grâce à des liaisons hydrogène entre les bases azotées A et T d'une part (deux liaisons) et C et G d'autre part (trois liaisons).
- B- Image de microscopie électronique dévoilant la structure de la chromatine « en collier de perles », avec à droite des nucléosomes pris individuellement (issue de Olins et al., 2003).
- C- Vue supérieure (gauche) et vue latérale de la structure cristallographique du nucléosome (issue de Luger et al., 1997). La double hélice d'ADN entourant le nucléosome et contenant 146 paires de bases est représentée en vert et marron. Les histones sont représentées en bleu (H3), rose (H2B), vert (H4) et orange (H2A).

1- 2. a. Les histones de cœur

La particule de cœur comprend 4 paires d'histones H2A (14kDa), H2B (14kDa), H3 (15kDa) et H4 (11 kDa), organisées en deux dimères H2A/H2B associés à un tétramère H3/H4, autour desquelles s'enroulent 146 paires de bases d'ADN. Le séquençage de ces protéines a permis de mettre en évidence que ce sont de petites protéines très conservées, leur taille variant de 100 à 130 acides aminés. De plus, ce sont des protéines très riches en lysine et arginine ce qui explique leur basicité et par conséquent leur affinité pour l'ADN. En effet, leur richesse en lysine et arginine permet l'établissement de liaisons hydrogènes avec le groupement phosphate du squelette de l'ADN. S'il y a aussi des contacts non polaires entre le désoxyribose et les histones, il n'y a, par contre aucun contact entre les histones et les bases azotées, ce qui permet d'assurer l'absence de spécificité de séquence.

Toutes les histones de cœur possèdent un domaine dit « histone fold » qui est la zone globulaire centrale (Figure 3A). Cette zone globulaire est composée de 3 hélices α entre lesquelles se trouvent 2 boucles flexibles (Figure 3B).

C'est grâce à ce domaine que par des interactions de nature hydrophobe nommées « poignées de mains » (Figure 3C) s'établissent des hétérodimères H2A-H2B et H3-H4 (Figure 3D). L'octamère est ensuite composé de deux dimères H2A-H2B et un tétramère H3-H4 (Figure 3E). Il est important de souligner le rôle central de H3 car à la jonction des deux protéines H3 se trouve un axe de symétrie du nucléosome. D'autre part, l'histone H3 est également à la jonction avec les dimères H2A-H2B (Luger et al., 1997).

Enfin, les parties N-terminale et C-terminale des histones se trouvent à l'extérieur du nucléosome et peuvent faire l'objet de modifications post-traductionnelles. Ces modifications interviennent dans l'établissement de la structure de la chromatine (Khorasanizadeh, 2004).

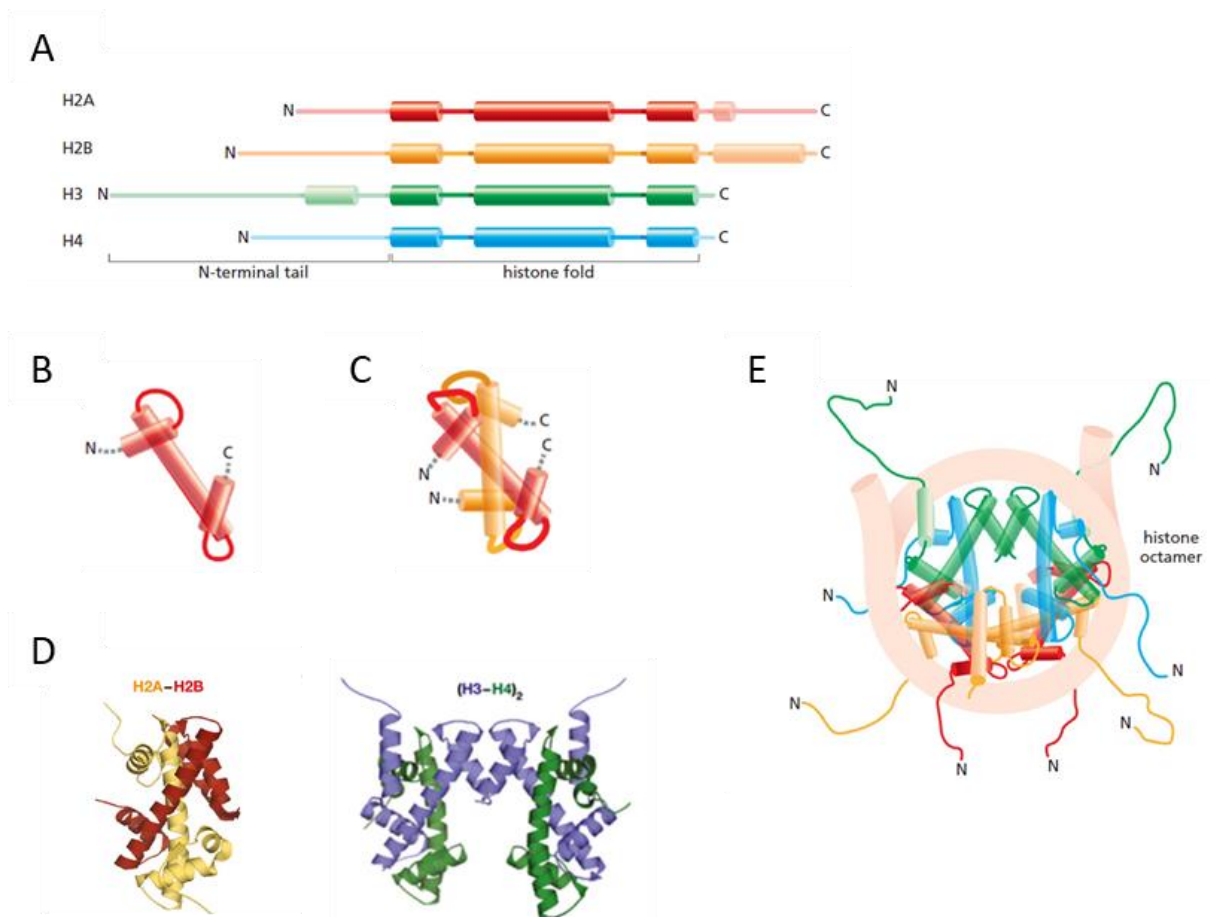


Figure 3 – Structure du nucléosome.

A - Alignement des structures secondaires des histones (issue de Alberts et al., 2017).

B – Agencement en « Histone fold » (issue de Alberts et al., 2017). Les cylindres représentent des hélices α .

C - Structure en « poignée de mains » entre 2 « histone fold » (issue de Alberts et al., 2017).

D – Structures d'un dimère H2A-H2B et d'un tétramère H3-H4 (issue de Mattioli et al., 2015).

E – Structure finale du nucléosome avec l'ADN entourant l'octamère d'histones. Ici H2A est en rouge, H2B en jaune, H3 en vert et H4 en bleu. Les parties N-terminales des histones se trouvent à l'extérieur du nucléosome (issue de Alberts et al., 2017).

1- 2. b. L'histone de liaison

La cinquième histone est l'histone H1, dont 10 isoformes ont été découvertes à ce jour (H1.1 à H1.5, H1°, H1t, H1T2, H1LS, H1oo). Celle-ci a été découverte en 1978, lorsque R. Simpson réalisa une digestion ménagée de la chromatine, permettant d'obtenir un « chromatosome » c'est-à-dire une particule de cœur de nucléosome avec une histone de liaison (Simpson, 1978). Plusieurs isoformes, H1t, H1T2 et H1LS, sont des isoformes spécifiques du testicule.

La structure des histones de liaison est différente des histones canoniques : l'histone de liaison possède une partie N-terminale courte enrichie en lysine, un domaine globulaire central et une longue partie C-terminale sans structure particulière mais fortement chargée positivement. La seule partie très conservée est le domaine central qui contient un motif dit « wing-hélice » qui se positionne à l'entrée et à la sortie des deux ADNs de liaison. En se liant aux ADNs de liaison le domaine central jouerait un rôle essentiel de stabilisation de la

structure. Le domaine C-terminal ne se lierait qu'à un des deux ADN de liaison et induirait une asymétrie du nucléosome, ce qui jouerait un rôle indispensable à l'établissement des niveaux supérieurs de compaction (Figure 4) (Bednar et al., 2017). Enfin, du fait de sa forte charge positive, le domaine C-terminal permettrait de neutraliser les charges de l'ADN de liaison auquel il est lié.

À la différence des histones de cœur, il est important de souligner que l'inactivation d'un gène d'une histone de liaison n'est pas létale. Il existe, en effet, une certaine redondance entre les histones de liaison, redondance qui a été mise en évidence à la suite d'inactivation de plusieurs gènes (pour revue : Khochbin, 2001). En revanche il y a dans ce cas des altérations de la structure de la chromatine ce qui laisse supposer qu'il existe des mécanismes de régulation entre les histones de liaison et la structure de la chromatine (Khochbin, 2001 ; Robinson et Rhodes, 2006 ; Hergeth et Schneider, 2015).

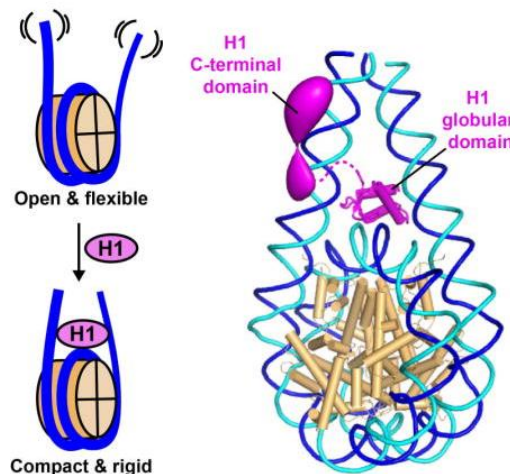


Figure 4 – Structure du nucléosome avec l’histone de liaison (issue de Bednar et al., 2017).

En se liant aux deux ADN de liaison l’histone de liaison stabilise la structure. De plus le domaine C-terminal permet d’induire une asymétrie en ne se liant qu’à un seul ADN, cette asymétrie étant nécessaire à l’établissement de niveaux supérieurs d’organisation.

2- Organisation fonctionnelle de la chromatine

2- 1. Niveaux d’organisation de la chromatine

Pour bien comprendre à quel point l’ADN doit être organisé dans la cellule il est important de souligner que dans une cellule humaine l’ADN mesure environ 2 m et doit tenir dans un noyau moyen de 10 μm ce qui fait un facteur de réduction de 2×10^5 (Holmes et Cozzarelli, 2000).

De plus, l’organisation se doit d’être structurée suffisamment finement pour que la cellule soit fonctionnelle, ce qui signifie que toutes les régions doivent rester accessibles si un gène doit

être transcrit. Mis à notre échelle cela équivaut en somme à faire rentrer de façon organisée 14km de fil de pêche dans une orange de 7 cm de diamètre !

Afin de répondre à cette exigence, plusieurs niveaux d'organisation sont donc nécessaires. Le premier niveau est obtenu grâce aux nucléosomes qui forment la structure en « collier de perles » qui correspond à un nucléofilament de 11nm de diamètre, sachant qu'entre 2 nucléosomes se trouve quelques dizaines de paires de bases d'ADN (Figure 5A) (Felsenfeld et Groudine, 2003).

Le deuxième niveau correspond à une fibre de 30 nm obtenue grâce à l'interaction entre les nucléosomes et plus particulièrement grâce à l'histone H1 qui interagirait avec l'ADN de liaison et la particule de cœur des nucléosomes. Il existe cependant deux modèles pour cette fibre de 30 nm et, à ce jour, la structure réelle n'a pas été résolue. Le premier modèle serait que deux nucléosomes successifs se retrouvent côte à côte pour former une structure en solénoïde ou hélice à un brin, tandis que le deuxième serait que les nucléosomes seraient en contact avec les seconds nucléosomes et non pas le nucléosome adjacent pour former une structure en zig-zag ou hélice à deux brins (Figure 5B). Des arguments pour chacun de ces modèles ont été obtenus par cryo-microscopie (Dorigo et al., 2004; Robinson et al., 2006).

Les deux modèles coexistent sans doute au sein de la cellule et correspondraient à différents états fonctionnels : la chromatine serait plus compacte avec l'histone de liaison et plus relâchée sans histone de liaison, ce qui permettrait l'activité transcriptionnelle dans ces régions (Robinson et Rhodes, 2006 ; Grigoryev et al., 2009).

Une étude plus récente montre que la structure cristallographique d'un hexanucléosome lié à l'histone H1 formerait une hélice plate à deux brins qui, en présence de conditions salines différentes, pourrait adopter une conformation torsadée, suggérant un possible mécanisme de formation de la fibre de 30 nm (Figure 5C) (Garcia-Saez et al., 2018).

Les niveaux supérieurs d'organisation pourraient être obtenus par repliements successifs et, dans le cas des chromosomes métaphasiques, qui est le niveau de compaction le plus élevé, la fibre de 30nm s'organiserait tout d'abord sous forme de boucles qui se replieraient le long d'une matrice centrale avant de s'enrouler en spirale (Figure 5A) (Felsenfeld et Groudine, 2003). Les différentes boucles formeraient des sous-domaines chromosomiques (Taddei et al., 2004).

Cependant, à ce jour, les preuves expérimentales font défaut par manque de méthodes d'investigation.

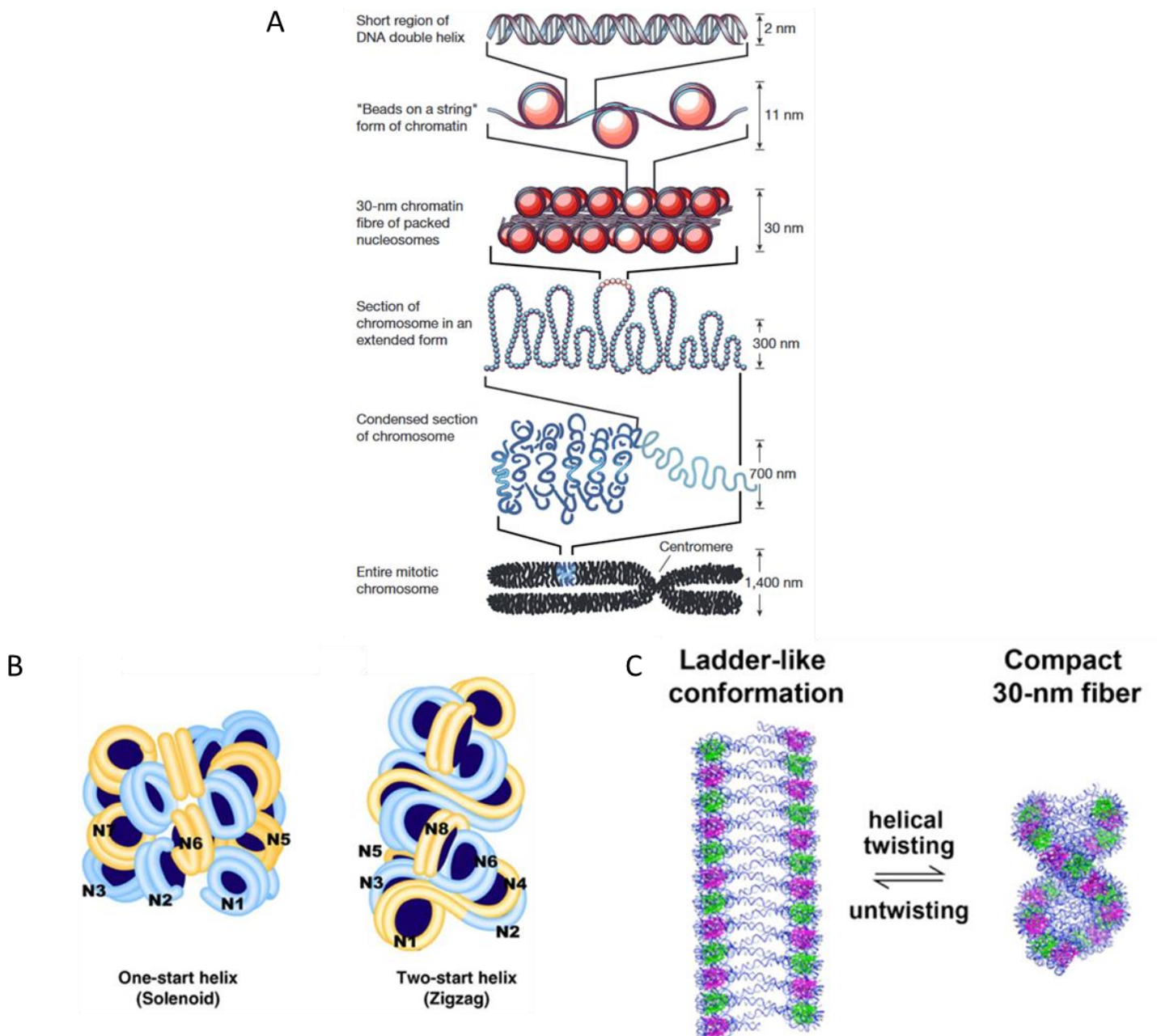


Figure 5 – Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.

A – Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine, les nucléosomes s'organisent en « collier de perles ». Le collier s'organise ensuite en fibre de 30 nm, fibre qui s'organise ensuite sous forme de boucles et qui par repliements successifs génère le chromosome métaphasique, correspondant au niveau de compaction le plus élevé. À droite se trouve l'échelle approximative des niveaux de compaction (issue de Felsenfeld et Groudine, 2003).

B – Les différents modèles de la fibre de 30 nm : hélice à un brin avec interaction entre les nucléosomes adjacents et hélice à deux brins avec interaction entre les nucléosomes n et $n+2$ (issue de Maeshima et al., 2010).

C – Modèle récent suggérant la possibilité de passer d'une hélice plane à deux brins à une hélice torsadée de 30 nm en fonction des conditions ioniques (issue de Garcia-Saez et al., 2018).

2- 2. Domaines chromatinien

Au sein du noyau, afin que la cellule soit fonctionnelle, la chromatine se doit d'être organisée en domaines fonctionnels. Ces domaines comprennent des gènes qui ont des profils d'expression différents. Ceux-ci furent pour la première fois mis en évidence en 1928 par E. Heitz qui distingua 2 types de régions dans le noyau (Figure 6A) :

- Des zones peu colorées qu'il nomma euchromatine correspondant à une chromatine relâchée.
- Des zones plus denses qu'il nomma hétérochromatine correspondant à une chromatine compacte.

Par la suite différents types de colorations sur les chromosomes en métaphase ont permis de distinguer une alternance de bandes ayant des colorations distinctes (Craig et Bickmore, 1993):

- Des bandes répliquées tardivement en phase S, les bandes C et G qui correspondent à l'hétérochromatine et qui sont plus denses (Figure 6B).
- Des bandes répliquées précocement en phase S, les bandes R qui correspondent à l'euchromatine et qui sont moins colorées.

L'euchromatine correspond à des régions riches en gènes actifs qui sont plus accessibles à la DNase I. Ces régions pourraient être dépourvues d'histone H1 et avoir par conséquent un arrangement de nucléosomes moins réguliers. Certaines modifications d'histones sont fréquemment retrouvées telles que l'acétylation des lysines (Strahl et Allis, 2000).

L'hétérochromatine peut être subdivisée en 2 catégories qui sont l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive. L'hétérochromatine facultative est dense et donc peu favorable à l'activité transcriptionnelle, mais cet état est réversible. Ce sont donc des régions contenant des gènes. Un des exemples les plus connus est le corpuscule de Barr qui correspond à la compaction sous forme d'hétérochromatine facultative d'un des chromosomes X chez les mammifères femelles afin de réprimer la transcription (Arthold et al., 2011).

L'hétérochromatine constitutive regroupe plusieurs régions du génome qui sont les télomères, les centromères et les régions péricentromériques. Celles-ci sont souvent associées à la triméthylation de la lysine 9 de l'histone 3 (H3K9me3) (Guthmann et al., 2019). Les chromocentres correspondent à l'association au sein du noyau des régions péricentromériques de plusieurs chromosomes. Ce sont des régions enrichies en séquences répétées et appauvries en gènes. Si ce sont des régions qui restent durablement sous forme d'hétérochromatine et qui se transmettent ainsi à chaque division cellulaire, il n'empêche qu'elles sont parfois transcrites de manière transitoire à un moment donné. C'est le cas par exemple au cours du développement embryonnaire précoce ou pour l'assemblage des kinétochores durant la division cellulaires (pour revue Saha et Mishra, 2019). Cependant les rôles et les mécanismes exacts restent à ce jour pour la plupart incertains.

Enfin, il est important de souligner qu'en interphase la chromatine est organisée au sein du noyau. Ainsi, les régions riches en gènes actifs sont situées dans la partie interne du noyau tandis que les régions d'hétérochromatine se situent à la périphérie (Dillon, 2004). D'autre part, en fonction du type cellulaire, les chromosomes ne se situent pas au même endroit au sein du noyau puisque ce sont les plus actifs qui se situent à l'intérieur du noyau. Un exemple est illustré par le chromosome 5 qui, chez la souris, se situe dans la partie interne du noyau des cellules de foie alors qu'il se trouve dans la partie périphérique du noyau des cellules de poumon (Parada et al., 2004). Le champ d'investigation d'organisation de domaines chromosomiques en topologically associating domain (TAD) est à l'heure actuelle en pleine expansion.

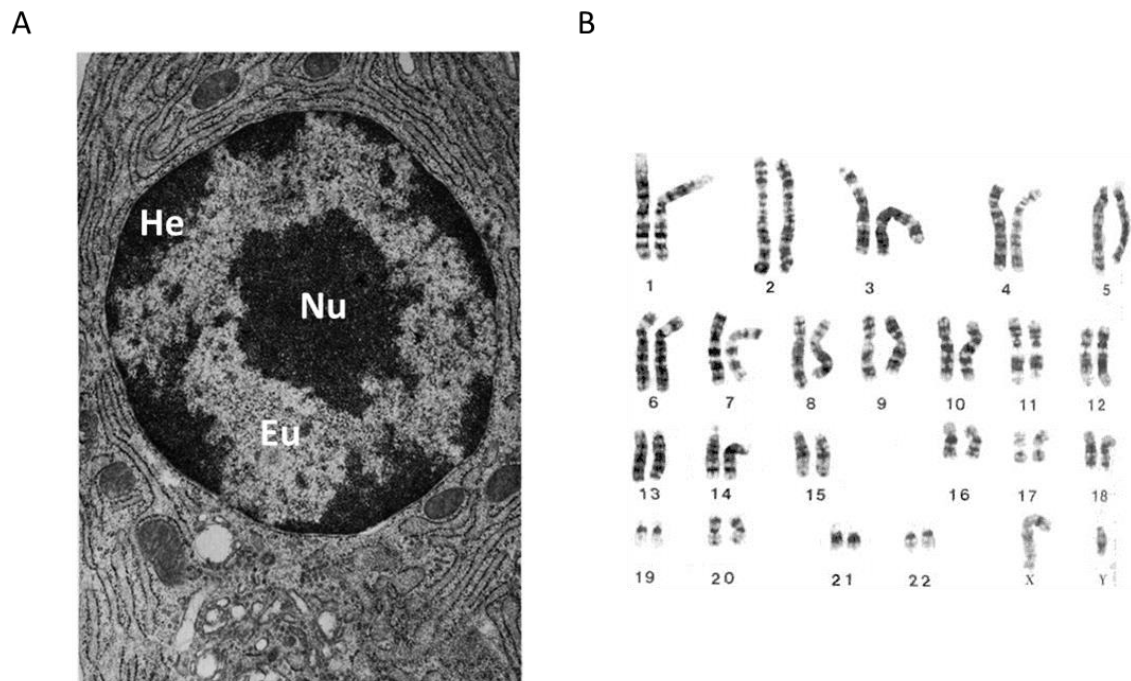


Figure 6 – Organisation de la chromatine en domaines distincts

A - Image de microscopie électronique de noyau de plasmocyte de moelle osseuse de cochon d'Inde (issue de Fawcett, 1981). L'hétérochromatine (He) apparaît dense comparativement à l'euchromatine (Eu). Elle est située en périphérie du noyau ainsi qu'au niveau du nucléole (Nu).

B – Caryotype humain après coloration au Giemsa montrant des bandes plus denses nommées bandes G et correspondant à l'hétérochromatine (issue de <http://www.mun.ca>)

II. La spermatogenèse chez les mammifères

1- Description générale de la spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus permettant la production et la différenciation des cellules germinales mâles.

Les spermatozoïdes sont les seules cellules capables de quitter l'organisme paternel pour transmettre l'ADN à la descendance. Ce processus est unique en de nombreux points et notamment en matière de réorganisation génomique car, afin d'éviter tout dommage et de permettre un développement embryonnaire correct, l'ADN doit être soigneusement compacté et protégé jusqu'à la fécondation.

Chez tous les mammifères la première étape a lieu durant la vie embryonnaire et la deuxième démarre à la puberté. Entre ces 2 étapes, les spermatogonies traversent une phase de quiescence chez l'homme qui n'existe pas chez la souris.

Chez l'homme comme chez la souris, l'ectoderme extra-embryonnaire sécrète le facteur de croissance BMP4 qui permet le développement des cellules germinales primordiales (CGPs) à partir de l'épiblaste postérieur proximal (Dolci et al., 2015). Ces cellules vont ensuite migrer tout en continuant à proliférer par mitoses jusqu'à coloniser les ébauches génitales. La différenciation des gonades aura lieu à E12,5 chez la souris et commencera à la 7^{ème} semaine de développement embryonnaire chez l'homme.

L'implication de plusieurs gènes dans la différenciation des gonades a été décrite chez la souris et notamment l'expression du gène SRY, qui est un facteur de transcription. Celui-ci induit la différenciation des cellules de Sertoli et donc initie le développement des testicules (Manku et Culty, 2015). Ainsi à 12,5 jours de développement embryonnaire chez la souris, les cellules de Sertoli sont différenciées et ont établi des jonctions entre elles. Elles englobent les CGPs grâce à des prolongements cytoplasmiques et forment ainsi des cordons testiculaires.

La première phase de la spermatogénèse consiste en la multiplication des spermatogonies qui donnent naissance aux spermatocytes. Celles-ci subissent deux divisions méiotiques et deviennent des spermatides rondes (cellules haploïdes). Après la méiose, dans les spermatides, un processus de maturation appelé spermiogénèse se déroule impliquant des réorganisations majeures des différents compartiments cellulaires. Pendant les stades de spermatides allongées et condensées, ce processus inclut notamment une réorganisation et une compaction drastique du génome paternel qui sera par la suite transmis à la future descendance.

2- Organisation du testicule

L'appareil reproducteur masculin comprend notamment deux testicules, des voies spermatiques excrétrices (épididymes notamment) ainsi que des glandes annexes.

Les testicules ont deux fonctions :

- Une fonction exocrine qui est la production des spermatozoïdes.
- Une fonction endocrine qui est la synthèse des androgènes.

Chez les mammifères les testicules sont protégés par le scrotum, poche qui leur permet de rester à une température inférieure à la température corporelle.

Cette température inférieure est nécessaire à la spermatogenèse. De plus, les testicules sont entourés d'une enveloppe rigide, la tunica albuginea ou albuginée, qui est un tissu conjonctif fibreux (Figure 7).

L'intérieur du testicule est, quant à lui, divisé en lobules séparés par des invaginations de l'albuginée. Il est abondamment vascularisé et comprend également des cellules produisant les hormones stéroïdes, les cellules de Leydig.

Les lobules contiennent les tubes séminifères qui sont le lieu de production des spermatozoïdes. Les tubes séminifères contiennent, quant à eux, les cellules germinales ainsi que des cellules de soutien, les cellules de Sertoli.

Ces tubes ont une structure hélicoïdale et convergent tous vers le rete testis, où tous les spermatozoïdes sont collectés pour être ensuite délivrés à l'épididyme.

Enfin, afin de favoriser le mouvement des spermatozoïdes dans les tubes séminifères se trouve des cellules musculaires, les cellules myoïdes.

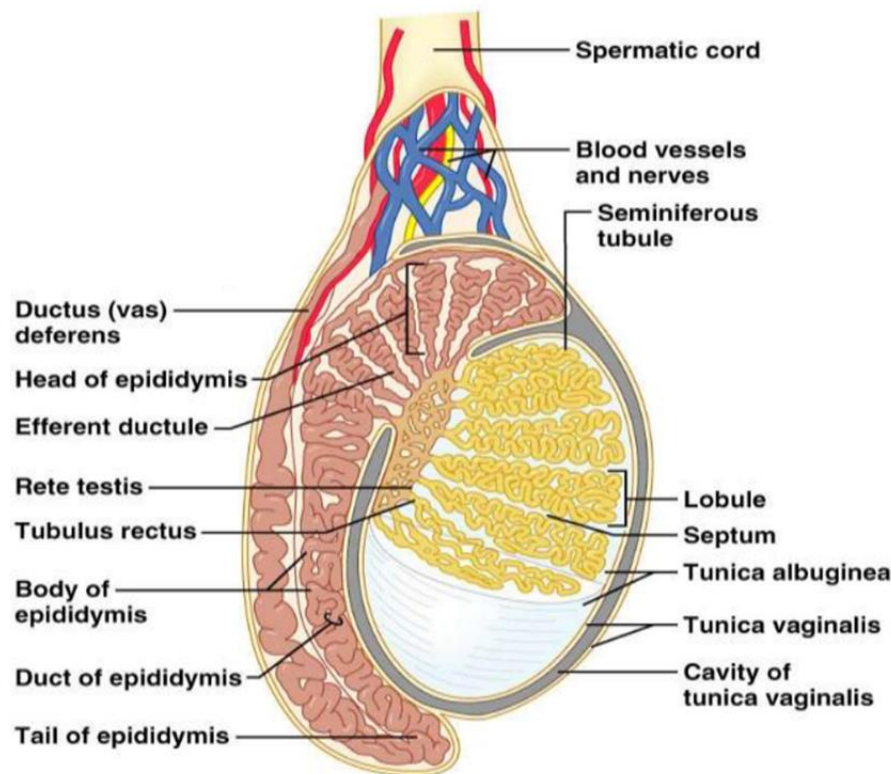


Figure 7 – Structure du testicule (issue de Marieb, 2006).

Le testicule est le lieu de production des spermatozoïdes et est entouré d'un tissu conjonctif fibreux, l'albuginée. L'intérieur est composé de nombreux lobules. Chaque lobule contient des tubes séminifères où sont produits les spermatozoïdes et du tissu interstitiel, entre les tubes séminifères. Les tubes séminifères débouchent sur le rete testis, réseau tubulaire où la maturation des spermatozoïdes se poursuit. Ce réseau se poursuit en dehors du testicule par les voies d'excrétion des spermatozoïdes, comprenant l'épididyme, un long conduit qui coiffe le testicule, lui-même en continuité avec le canal déférent. Les deux canaux déférents rejoignent l'urètre.

3- Les différentes phases de la spermatogenèse

La spermatogenèse comprend 3 étapes successives (Figure 8) :

- La spermatocytogenèse qui est une phase de prolifération des spermatogonies et de différenciation des spermatocytes, encore appelée phase mitotique.
- La phase méiotique qui est une phase de division des spermatocytes qui donnent naissance aux spermatides rondes.
- La spermiogénèse qui est une phase de différenciation des spermatides rondes en spermatozoïdes, encore appelée phase post-méiotique.

Un cycle se déroule en 35 jours chez la souris et 74 jours chez l'homme. Il y a ensuite chez les mammifères une phase de maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme qui dure entre 10 et 12 jours.

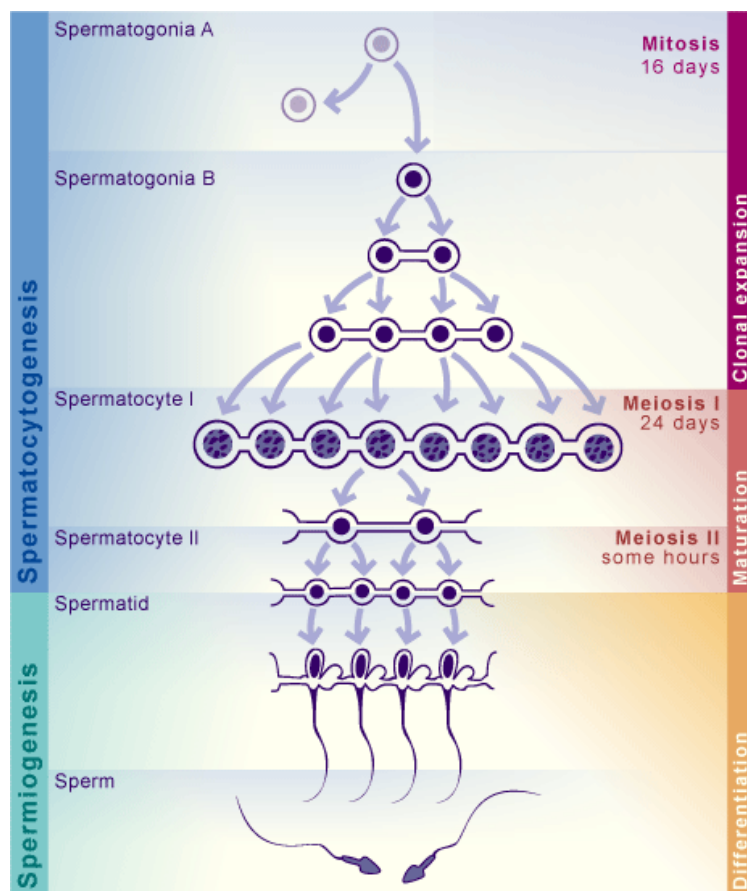


Figure 8 – Les 3 étapes successives de la spermatogénèse (issue de <http://www.embryology.ch/francais/cgametogen/spermato03.html>).

La spermatogénèse comprend 3 grandes étapes qui sont i/ la phase pré-méiotique au cours de laquelle les spermatogonies se divisent par mitose, ii/ la phase méiotique correspondant aux deux divisions méiotiques affectant les spermatocytes et aboutissant aux spermatides rondes, qui sont des cellules haploïdes, puis iii/ la phase post-méiotique (ou spermiogénèse) correspondant à la différenciation des spermatides en spermatozoïdes.

Les tubes séminifères sont organisés de manière à ce que ces 3 étapes successives puissent se dérouler correctement. Celles-ci se déroulent donc de la paroi vers la lumière du tube : les spermatogonies sont ainsi situées à la base du tube, au niveau de l'épithélium séminifère tandis que les cellules les plus différenciées, les spermatozoïdes, se trouvent au niveau de la lumière du tube (Figure 9).

Les cellules de Sertoli forment la barrière hémato-testiculaire en établissant entre elles des jonctions serrées étanches (zona occludens). Cela a pour conséquence la division de l'épithélium en 2 compartiments distincts qui sont nommés basal et ad-luminal. C'est au sein du compartiment ad-luminal que se déroulent les phases méiotique et post-méiotique. Cette barrière est en effet nécessaire pour protéger les cellules du système immunitaire.

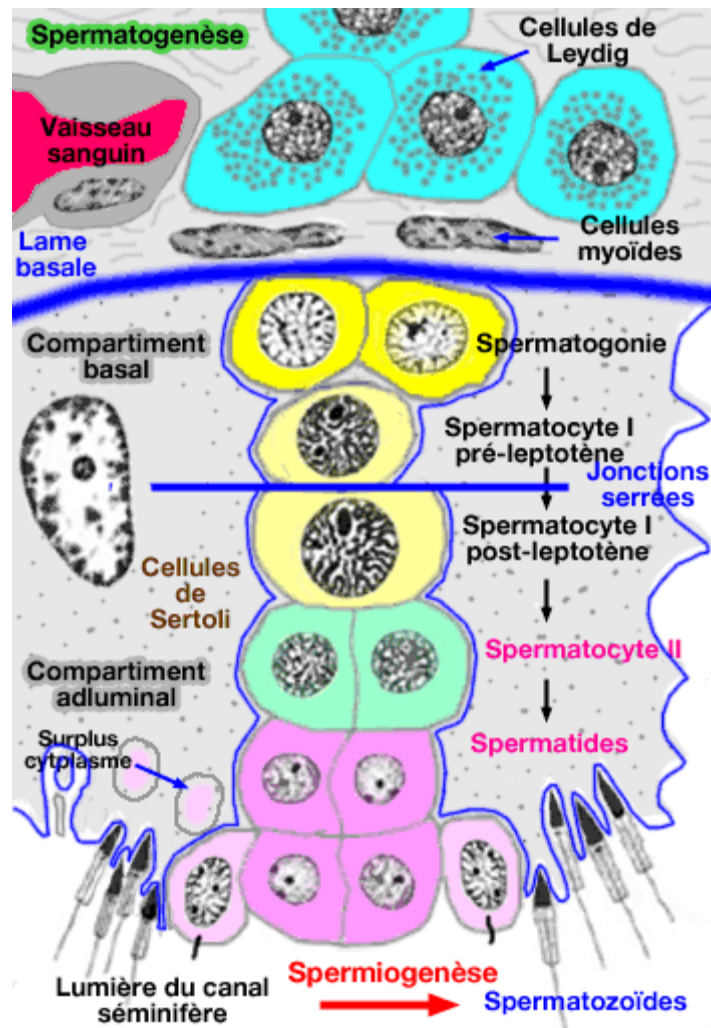


Figure 9 – Organisation des tubes séminifères (issue de <http://www.vetopsy.fr/reproduction/male/spermatogenese-sertoli.php>).

La différenciation des cellules germinales mâles (ou spermatogenèse) se déroule depuis la périphérie des tubes séminifères (où se localisent les spermatogonies) vers la lumière des tubes séminifères où les spermatozoïdes sont libérés (spermiation). La barrière hémato-testiculaire divise un compartiment basal et un compartiment adluminal. Cette barrière est composée de jonctions serrées et permet de protéger les cellules germinales des cellules immunitaires.

3- 1. La phase mitotique

Les cellules souches germinales ou spermatogonies prolifèrent par mitose afin d'assurer leur perpétuel renouvellement tout en produisant des spermatocytes primaires. Ce sont des cellules diploïdes situées dans la partie basale du tube. Il existe plusieurs sous-types de spermatogonies qui ont été décrites en fonction de l'aspect de leur hétérochromatine (Clermont, 1963) :

- Les spermatogonies de type Ad (d pour dark) qui possèdent un noyau arrondi avec une chromatine dense
- Les spermatogonies de type Ap (p pour pale) qui possèdent un noyau ovale avec une chromatine dispersée

- Les spermatogonies de type B qui possèdent un noyau arrondi avec une chromatine en amas

Les spermatogonies de type Ad se divisent pour donner naissance à une spermatogonie de type Ad et une Ap. Cette division permet à la fois d'engager une cellule vers la différenciation tout en assurant la réserve. Chaque spermatogonie Ap se divise ensuite pour donner deux spermatogonies de type B qui se divisent également pour donner chacune deux spermatocytes primaires diploïdes. Il existe des ponts cytoplasmiques entre toutes les spermatogonies d'une même génération.

3- 2. La phase méiotique

La méiose est une étape clé de la reproduction sexuée car c'est pendant celle-ci qu'a lieu la recombinaison du matériel génétique (Figure 10). Elle permet *in fine* de produire 4 cellules haploïdes génétiquement différentes à partir d'une cellule diploïde. À cette fin, deux divisions successives ont lieu après une seule réplication du matériel génétique. La première division est dite réductionnelle puisqu'elle divise le nombre de chromosomes par 2 dans chaque cellule et la deuxième est dite équationnelle puisque le stock génétique est, cette fois-ci, préservé.

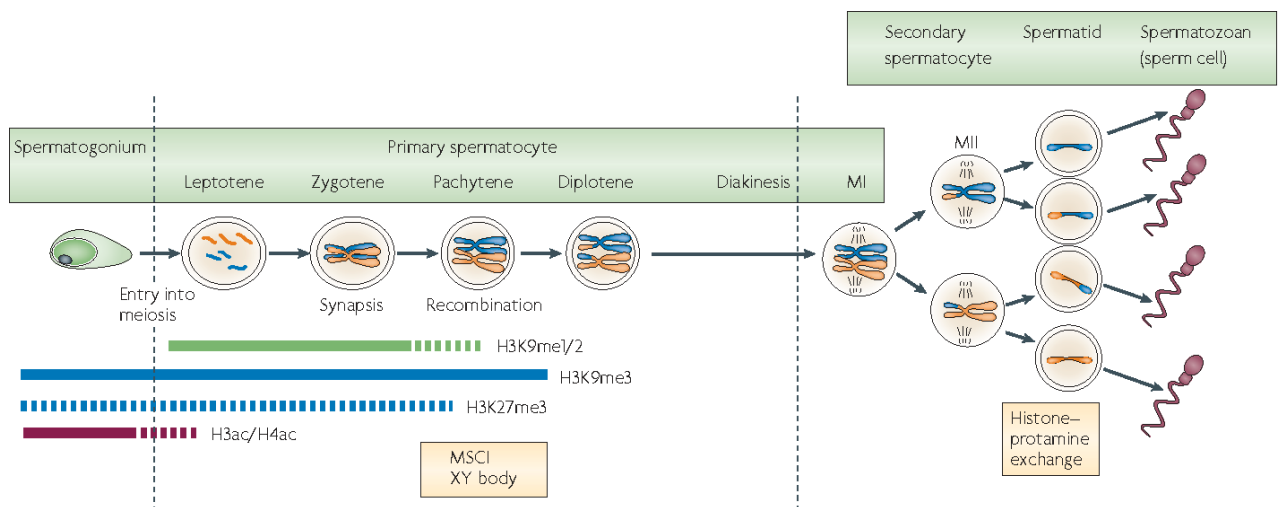


Figure 10 – Déroulement de la méiose lors de la spermatogenèse (issue de Sasaki et Matsui, 2008).

La méiose comporte deux divisions successives permettant d'obtenir 4 cellules haploïdes à partir d'une cellule diploïde. Chaque division est décomposée en prophase, métaphase, anaphase et télophase. La prophase de la première division méiotique est très longue et est elle-même subdivisée en leptotène, zygotène, pachytène (phase pendant laquelle les chromosomes homologues sont appariés et échangent du matériel génétique) et diplotène. C'est durant cette prophase (au stade pachytène) qu'ont lieu les recombinaisons entre les chromosomes homologues. Lors de la deuxième division méiotique il y a séparation de chromatides sœurs.

Cette phase est initiée par les spermatocytes primaires issus des spermatogonies de type B. Ceux-ci vont tout d'abord répliquer leur ADN durant une courte interphase (stade pré-leptotène). Les chromosomes sont à ce moment-là constitués de 2 chromatides reliés entre

elles par le centromère. C'est au moment de leur entrée en phase méiotique que les spermatocytes primaires passent dans le compartiment ad-luminal afin d'être isolés du système immunitaire.

La prophase de la première division méiotique est une étape très longue qui est elle-même subdivisée en 5 stades : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse.

C'est au cours du stade leptotène que les chromosomes se condensent et que les éléments latéraux des complexes synaptonémaux sont assemblés, ces éléments comprennent les protéines SYCP3 et SCYP2. Ensuite, au stade zygotène, il y a appariement des chromosomes homologues, qui sont alors nommés bivalents, grâce à l'assemblage des éléments centraux des complexes synaptonémaux. SCYP1 est un élément transverse du complexe qui relie les éléments centraux et latéraux (Figures 11 et 12).

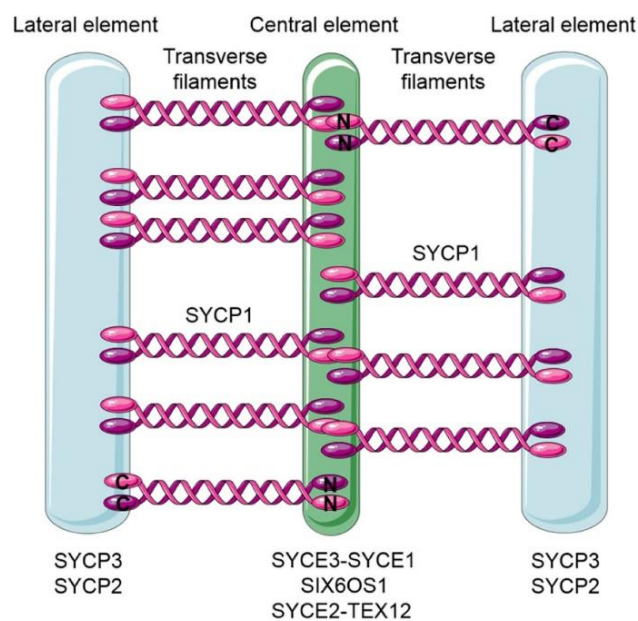


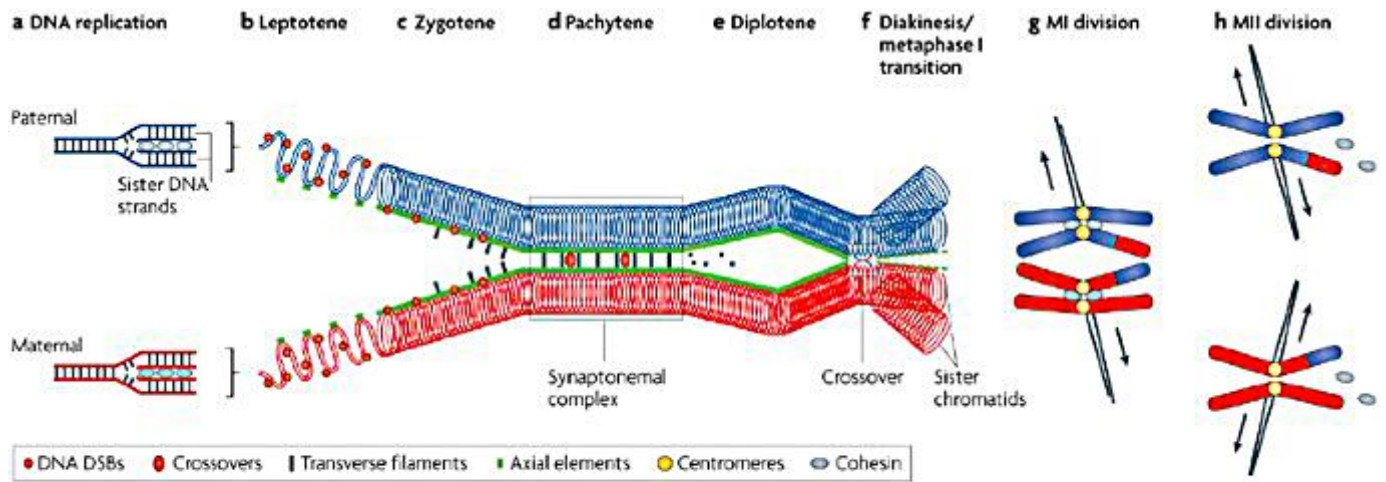
Figure 11 – Le complexe synaptonémal (issue de Zwettler et al., 2020).

Le complexe synaptonémal permet l'association des chromosomes homologues durant la méiose. Il est composé d'éléments latéraux comprenant les protéines SCYP2 et SCYP3 et d'un élément central, lui-même constitué des protéines SYCE1 à 3, TEX12 et SX6OS1. La protéine transverse SYCP1 relie entre eux les éléments centraux et latéraux.

C'est ensuite durant le stade pachytène qu'a lieu l'échange de matériel génétique (crossing-over) entre les chromatides non-sœurs. Il y a également une forte augmentation des activités transcriptionnelles et traductionnelles à ce stade.

Puis les chromosomes se séparent au stade diplotène du fait de la dissociation du complexe synaptonémal. Les chromosomes homologues conservent par contre des sites d'appariement étroits qui sont appelées chiasmas. Cela permettra une séparation plus progressive des chromosomes qui est indispensable pour minorer le risque d'aneuploïdie (Handyside, 2012).

La dernière étape de la Prophase I est la diacinese et est définie par la disparition de la membrane nucléaire. Lors de cette étape les chiasmas glissent progressivement vers les télomères.



Nature Reviews | Genetics

Figure 12 – Assemblage et dissociation du complexe synaptonémal (issue de Burgoyne et al., 2009).

Pendant le stade zygotène de la prophase de première division méiotique les chromosomes s'apparient grâce au complexe synaptonémal. Pendant le stade pachytène les chromosomes homologues sont appariés et ils échangent du matériel génétique (crossing-over) entre leurs chromatides. La dissociation des chromosomes homologues aura ensuite lieu au stade diplotène, mais ceux-ci restent associés au niveau des chiasmas (zones où les crossing-over ont eu lieu) pendant la métaphase I. Lors de l'anaphase I, les chiasmas sont clivés et les chromosomes homologues se répartissent dans les cellules filles, les spermatocytes II, qui très rapidement subissent la 2ème division méiotique.

Durant la métaphase I, Les chromosomes se positionnent de part et d'autre de la plaque équatoriale excepté les chiasmas qui restent alignés sur la plaque. L'anaphase I est ensuite marquée par la séparation des chromosomes homologues qui migrent chacun de façon aléatoire vers un pôle différent de la cellule.

C'est lors de la télophase I, la dernière étape de la méiose I, qu'a lieu la division en deux cellules filles haploïdes qui sont les spermatocytes secondaires, chaque spermatocyte secondaire comprenant un lot de chromosomes avec 2 chromatides sœurs.

Après une très courte interphase, les spermatocytes secondaires vont démarrer la deuxième division méiotique sans qu'il n'y ait au préalable une nouvelle duplication de l'ADN. La prophase II à la différence de la prophase I est très courte. Cette deuxième division se déroule donc comme une mitose conventionnelle et se caractérise par la séparation des chromatides sœurs. Celle-ci permet la formation de cellules rondes haploïdes, les spermatides rondes, qui entreront en phase de différenciation.

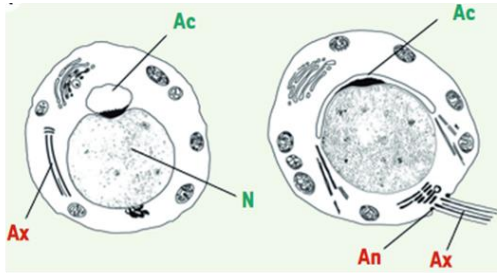
3- 3. La phase post-méiotique

La phase post-méiotique est également appelée spermiogénèse et correspond à l'étape de différenciation des spermatides rondes en spermatozoïdes. Trois événements majeurs ont lieu durant cette phase qui sont la formation du flagelle nécessaire au déplacement du spermatozoïde, la formation de l'acrosome qui permettra la fécondation et enfin la compaction du génome afin que celui-ci soit protégé jusqu'à la fécondation.

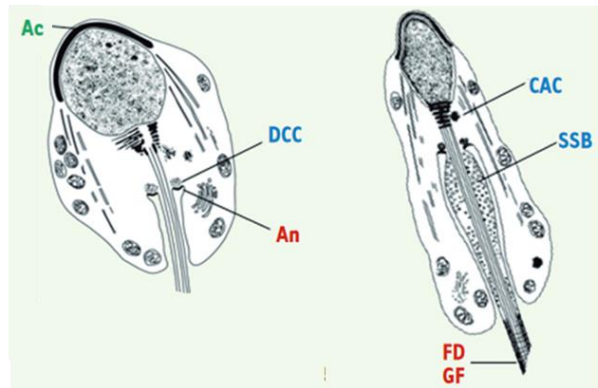
Les cellules de Sertoli forment des cryptes cytoplasmiques permettant d'y inclure les spermatides avec lesquelles elles établissent des jonctions communicantes. La spermiogénèse se divise en 6 étapes chez l'homme et en 16 étapes chez la souris qui se subdivisent elles-mêmes en 3 grandes étapes (Figure 13) :

- Les spermatides rondes (Figure 13A) sont les spermatides du départ (étapes 1 à 7 chez la souris). La vésicule acrosomale commence à se former au niveau de l'acroplaxome à partir de la fusion des vésicules de l'appareil de Golgi. L'acroplaxome est une structure transitoire présente au niveau du pôle antérieur du noyau qui est constituée d'actine et de kératine (Kierszenbaum et al., 2003). L'acrosome contient les enzymes nécessaires à la digestion de la zone pellucide de l'ovocyte. La formation de l'axonème du futur flagelle démarre à partir du centriole distal de la spermatide. La chromatine est homogène et il existe une activité transcriptionnelle modérée. Chez la souris, les spermatides rondes sont les spermatides 1 à 7.
- Les spermatides allongées (Figure 13B) constituent l'étape intermédiaire (étapes 8 à 11 chez la souris). Il y a allongement du noyau et étalement de l'acrosome le long du noyau. Cette étape est appelée étape de la coiffe. Il y a aussi formation de la manchette qui est un réseau de microtubules formé à partir du pôle antérieur du noyau jusqu'au flagelle en formation, cette structure permet non seulement un transport actif du Golgi vers le noyau mais aussi participe à l'allongement du noyau ainsi qu'à la migration des mitochondries (Zhou et al., 2009). Une fois que la chromatine commence à se condenser il y a arrêt de la transcription et migration du Golgi vers le flagelle via la manchette.
- Les spermatides condensées (Figure 13C) sont les spermatides en fin de différenciation (étapes 12 à 16 chez la souris). L'axonème grandit jusqu'à ce que le flagelle atteigne sa taille finale, les structures péri-axonémales se mettent en place, la chromatine se condense jusqu'à devenir la plus compacte possible et l'acrosome termine sa maturation. Il y a également formation de la gouttelette spermatique qui contient les différents organites inutiles au spermatozoïde mature, qui se détachera en corps résiduel puis sera phagocytée par les cellules de Sertoli.

A



B



C

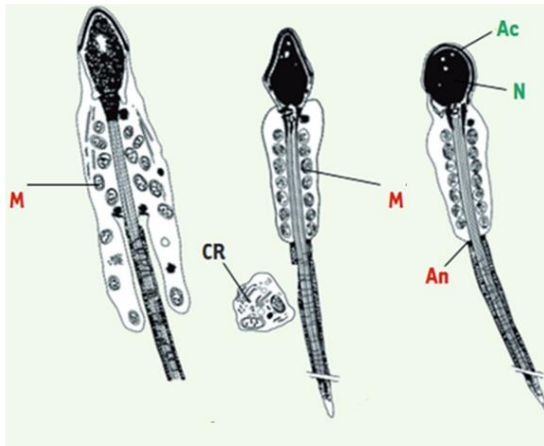


Figure 13 – Représentation des différentes étapes de la spermiogénèse (d'après Escalier et Touré, 2012).

A– Spermatides rondes (étapes 1 à 7). Au départ l'acrosome (Ac) commence à se former au niveau du pôle antérieur du noyau (N). Dans les premières étapes il forme une vésicule ronde. L'axonème (Ax) démarre sa formation à partir du centriole distal.

À la fin du stade des spermatides rondes, l'acrosome est aplati. L'axonème se positionne au niveau du pôle postérieur pour former le futur flagelle.

B – Spermatides allongées (étapes 8 à 11 chez la souris). La manchette permet la migration des mitochondries vers le flagelle. Le noyau s'allonge.

C – Spermatides condensées (étapes 12 à 16 chez la souris). La chromatine se condense, le flagelle termine sa croissance et il y a détachement et élimination du cytoplasme (corps résiduels).

Ac : Acrosome ; An : Annulus ; Ax : Axonème ; CAC : Corps associé au centriole ; CR : Corps résiduel ; DCC : Dérivé du corps chromatoïde ; FD : Fibres denses ; GF : Gaine fibreuse ; M : Mitochondries ; N : Noyau ; SSB : Spindle shaped body. Les structures transitoires sont légendées en bleu.

4- La maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme

Après le processus de spermiation (relargage des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères), les spermatozoïdes transitent dans l'épididyme. Au cours de leur trajet dans ce dernier il a été montré que les spermatozoïdes acquièrent une mobilité progressive et leur pouvoir fécondant (Dacheux et Dacheux, 2013). De nombreuses modifications biochimiques ont lieu durant ce trajet comme l'intégration de nouvelles protéines à la surface du spermatozoïde (Sullivan et Mieusset, 2016) et de plus, la compaction de la chromatine se

poursuit grâce à l'établissement de ponts disulfures entre les protamines (Calvin et Bedford, 1971).

5- Les cycles de la spermatogenèse

L'engagement des spermatogonies dans la voie de la différenciation n'est pas un phénomène aléatoire, mais au contraire un phénomène bien synchronisé ayant lieu tous les 8,6 jours chez la souris. Toutes les cellules d'une même génération forment un groupe qui se différencie suivant le même rythme et sont donc reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Chaque stade a une chronologie bien précise : chez la souris 13 jours pour les spermatocytes I, 1 jour pour les spermatocytes II et 13 jours pour les spermatides. Ainsi les premiers spermatocytes n'apparaîtront chez les souris que 11 à 14 jours après leur naissance et à partir de 21 jours pour les spermatides rondes.

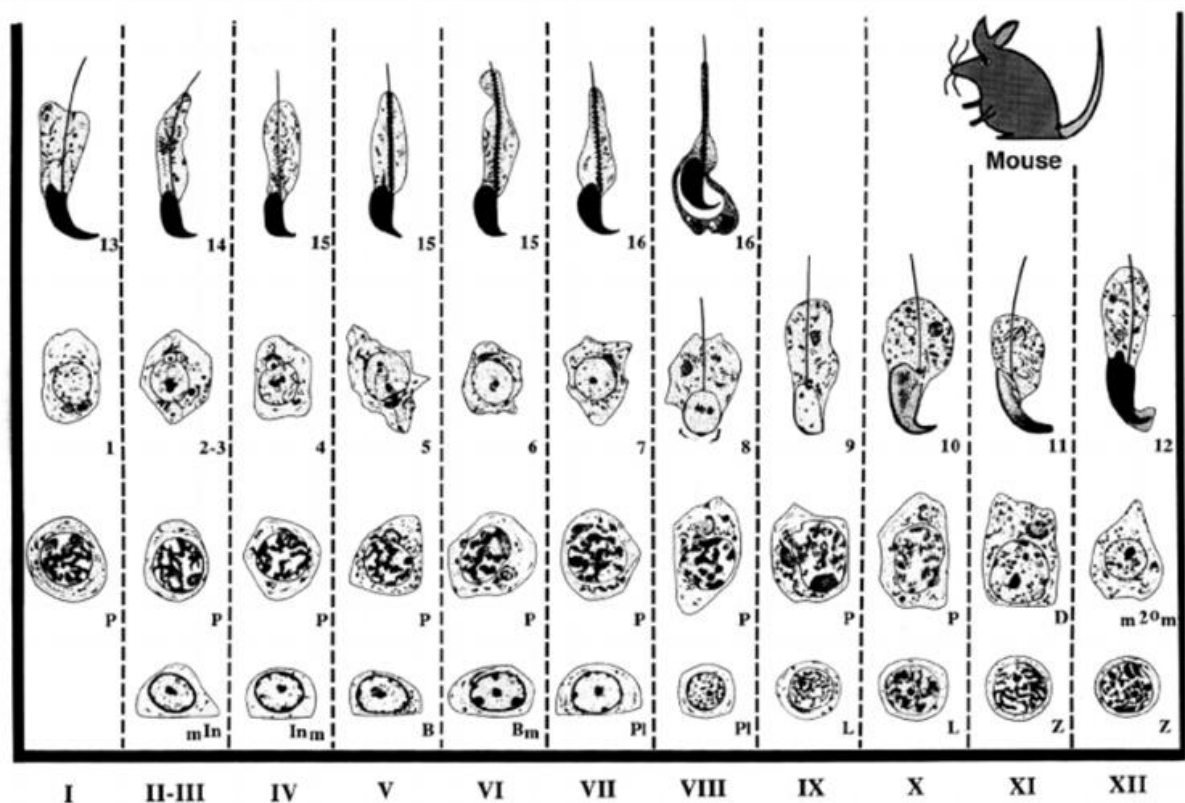
Du fait que la spermatogenèse dure au total 35 jours et qu'il s'agit d'un processus continu depuis la puberté, il ne peut y avoir tous les stades de la spermatogénèse en un même endroit du tube séminifère. Il existe donc des associations spécifiques de cellules sur des coupes de tubes séminifères. Ces associations, toujours constantes permettent de définir 12 stades chez la souris (6 chez l'homme) (Figure 14). Il existe, de plus, une organisation spatio-temporelle, c'est-à-dire que chaque stade est situé à côté du stade suivant dans les tubes séminifères (stade I suivi du stade II suivi du stade III, etc ...)

Les spermatogonies de type A sont très peu nombreuses et présentes à tous les stades.

Les spermatogonies intermédiaires sont présentes entre les stades II et IV tandis que les spermatogonies de type B aux stades V et VI.

Les spermatocytes pré-leptotène (PI), leptotène (L), zygotène (Z) se retrouvent respectivement aux stades VII-VIII, IX-X et XI-XII. Le stade pachytène est quant à lui présent entre les stades I à X alors que le stade diplotène n'est observable qu'au stade XI. Les spermatocytes secondaires ($m^{20}m$ de la Figure 14) sont quant à eux révélateurs du stade XII. Les spermatides rondes sont ensuite classées en 7 catégories en fonction de la taille de la vésicule acrosomale et sont donc présentes entre les stades I et VII. Les spermatides allongées 8 à 11 se retrouvent dans les tubes de mêmes stades (VIII à XI). Enfin si les spermatides condensés 12 sont présentes au stade XII, celles de stades 13 à 16 sont présentes entre les stades I et VIII.

A



B

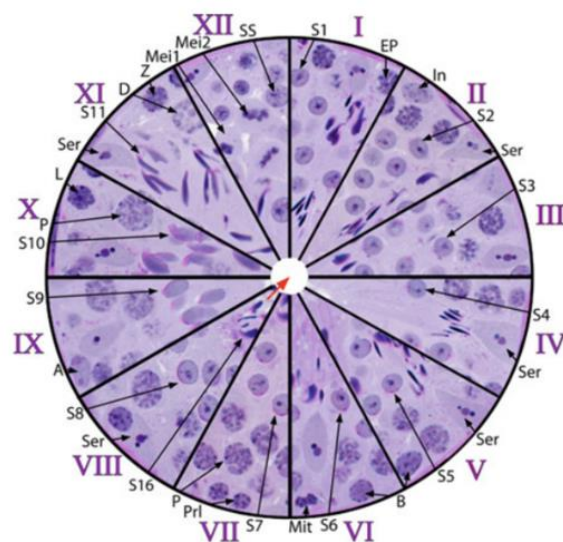


Figure 14 – Les différents stades de la spermatogenèse chez la souris à l'intérieur des tubes séminifères.

- A- Associations caractéristiques de cellules formant 12 stades (issue de Thibault et Levasseur, 2001). Les premiers stades sont facilement repérables grâce aux spermatides rondes qui peuvent elles-mêmes être différenciées en fonction de la taille et de la forme de la vésicule acrosomale. Les stades VIII à XI se repèrent grâce à l'évolution de la forme du noyau des spermatides allongées. Enfin le stade XII est le seul stade où il est possible de visualiser les chromosomes métaphasiques des spermatocytes secondaires.
- B- Vue d'ensemble des 12 stades de la spermatogenèse (issue de Meistrich et Hess, 2013)

6- Morphologie finale du spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule hautement différenciée et mobile. Il est constitué de 3 parties principales que sont la tête, le cou et le flagelle (Figure 15). Le cou est la pièce reliant la tête à la pièce intermédiaire du flagelle.

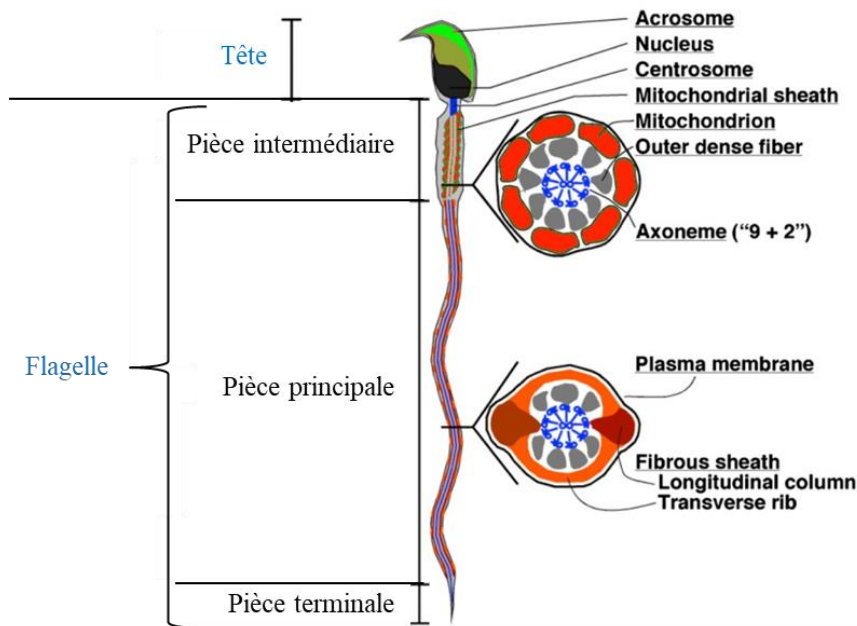


Figure 15 – Anatomie du spermatozoïde murin (d'après Vadnais et al., 2014).

Le spermatozoïde comprend 3 parties : la tête, le cou et le flagelle. Le flagelle peut-être subdivisé en pièce intermédiaire, pièce principale et pièce terminale en fonction des éléments para-axonéaux présents. La tête est composée par le noyau et l'acrosome qui comprend des enzymes protéolytiques permettant au spermatozoïde de traverser la zone pellucide de l'ovocyte.

6- 1. La tête du spermatozoïde

La tête du spermatozoïde est composée de l'acrosome et du noyau.

6- 1. a. L'acrosome

L'acrosome est une vésicule sécrétoire au pH acide qui fait partie de la famille des lysosomes et qui recouvre environ les 2/3 du noyau spermatique. L'acrosome est délimité par une double membrane interne et externe et il contient de nombreuses enzymes protéolytiques qui permettront au spermatozoïde, suite à son exocytose, de traverser la zone pellucide de l'ovocyte (Berruti, 2016). Sa biogenèse commence dès le début de l'étape des spermatides rondes et se poursuit jusqu'à la fin de la spermiogénèse. Plusieurs gènes nécessaires à sa biogénèse ont été mis en évidence grâce à leur inactivation chez la souris, c'est notamment le cas de *Dpy19l2* (Coutton et al., 2015).

6- 1. b. Le complexe acrosome-acroplaxome-manchette

La morphologie finale de la tête du spermatozoïde est dépendante du complexe acrosome-acroplaxome-manchette (Figure 16).

L'acrosome est ancré à l'enveloppe nucléaire par une structure transitoire appelée acroplaxome. Ainsi, au niveau de la jonction entre l'acrosome et l'enveloppe nucléaire la membrane nucléaire externe est très rapprochée de la membrane acrosomale interne (Kierszenbaum et Tres, 2004). Il s'agit d'une structure transitoire qui se met en place avant l'attachement des vésicules proacrosomales et qui est composée de filaments de F-actine et de kératine 5. Elle contient également de la myosine permettant le transport des vésicules proacrosomales. De plus, il a été montré que les microtubules sont également essentiels au trafic de ces vésicules (Wei et Yang, 2018 ; O'Donnell et O'Bryan, 2014).

Enfin, la lamina nucléaire qui borde l'enveloppe nucléaire interne en regard de l'acrosome est particulièrement dense et, à ce jour, sa composition moléculaire n'a pas été caractérisée. Par contre, l'attachement de l'enveloppe nucléaire à l'acrosome semble passer par l'interaction entre cette lamina et l'acroplaxome (Kierszenbaum et Tres, 2004).

La manchette est également une structure transitoire présente dans le cytoplasme, son apparition coïncide avec le début de l'élongation du noyau de la spermatide ronde (étapes 8-9 de la spermiogénèse) et donc de la condensation de l'ADN. Elle est composée d'un anneau périnucléaire qui est adjacent à l'anneau marginal de l'acroplaxome et d'un réseau qui est attaché à l'anneau périnucléaire et qui descend vers le flagelle en formation. Tous les modèles murins dont un des gènes codant pour des protéines de cette structure a été inactivé ont des défauts morphologiques de la tête ou du noyau (Zhou et al., 2009).

De plus, il a été montré chez le rat que le variant spécifique du testicule des protéines Ran est présent au sein du noyau spermatique ainsi que le long des microtubules de la manchette suggérant un transport nucléocytoplasmique de protéines (Kierszenbaum et al., 2002).

Enfin la manchette joue également un rôle dans le transport de protéines vers le flagelle en formation.

Afin de permettre l'élongation nucléaire, des forces internes et externes s'exercent sur la spermatide. Pour se faire, les cellules de Sertoli, dans lesquelles les spermatides sont insérées, vont former des boucles de F-actine qui vont enserrer la tête du spermatozoïde. Ces boucles vont générer des forces transmises ensuite par l'intermédiaire de jonctions adhérentes. Ces jonctions sont indispensables au maintien de la spermatide et toute défaillance sur une molécule utile à ce processus entraîne un défaut de la spermatogénèse. C'est le cas notamment pour Formine 1, une protéine de nucléation de l'actine (Li et al., 2015). Les forces internes, découlent quant à elle, de la constriction de l'anneau marginal de l'acroplaxome et de l'anneau périnucléaire de la manchette ainsi que de l'allongement progressif de la

manchette. La constriction des deux anneaux est un phénomène parfaitement synchronisée (Kierszenbaum et al., 2011).

Enfin, l'effet de ses forces est modulé par l'acroplaxome et par la lamina nucléaire (Sun et al., 2011).

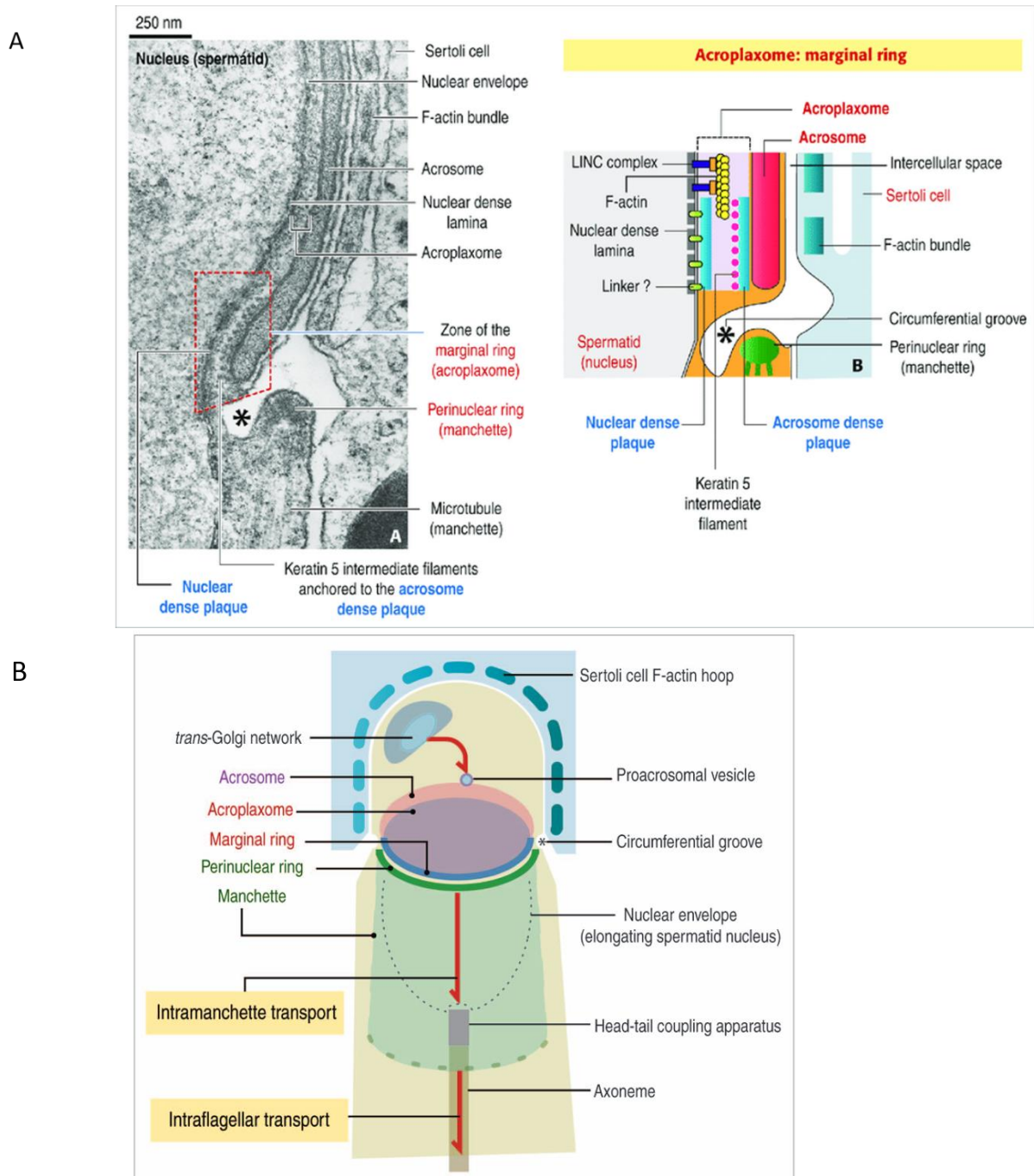


Figure 16 – Le complexe acrosome-acroplaxome-manchette (issues de Kierszenbaum et al., 2011).

- A- Coupe en microscopie électronique (panel de gauche) et représentation schématique (panel de droite) des différentes structures composant l'acroplaxome. L'anneau marginal de l'acroplaxome et l'anneau périnucléaire de la manchette se font face.
- B- Schéma d'une spermatide en cours d'élongation, détaillant les structures générant les forces internes et externes exercées sur celle-ci ainsi que le flux du transport intra-manchette et intra-flagellaire. L'acroplaxome ancre l'acrosome à l'enveloppe nucléaire et ses bords sont entourés par un anneau appelé anneau marginal. La manchette est composée d'un anneau périnucléaire et d'un réseau de microtubules attaché à cet anneau, réseau qui descend vers le flagelle en formation. Les vésicules pro-acrosomales, issues de l'appareil de Golgi, sont acheminées à l'acrosome via les microtubules et les filaments d'actine. La manchette comprend des protéines motrices et non motrices permettant le transport intra-manchette et des échanges entre le noyau et le cytoplasme. Ainsi il existe un lien entre la tête et le flagelle en formation.

6- 1. c. Le noyau

Le noyau spermatique est caractérisé par une condensation extrême de l'ADN. Celle-ci est nécessaire pour protéger le génome mâle jusqu'à la fécondation et d'autre part la réduction de la taille du noyau confère au spermatozoïde une meilleure mobilité (propriété hydrodynamique). Il est important de souligner que la compaction de l'ADN est non seulement dû à des mécanismes intrinsèques de restructuration mais qu'elle est aussi liée à une biogenèse correcte de l'acrosome et du complexe acrosome-acroplaxome-manchette. Les mécanismes spécifiques de compaction de l'ADN au sein du spermatozoïde seront étudiés de façon détaillée dans le chapitre suivant.

6- 2. Le flagelle

Le flagelle est la structure permettant la mobilité du spermatozoïde. Il est divisé en trois parties qui sont la pièce intermédiaire, la pièce principale et la pièce terminale (Figure 15). Il est composé d'une structure nommée axonème et par des structures para-axonémales. L'axonème est composé d'une paire centrale de microtubules et de 9 doublets périphériques. Au sein de celui-ci existe de nombreux multi-complexes protéiques permettant de stabiliser la structure ou permettant l'activité motrice (mouvement oscillatoire du flagelle). Les structures para-axonémales sont les mitochondries dans la pièce intermédiaire, les fibres denses dans les pièces intermédiaire et principale et la gaine fibreuse dans la pièce principale. Toutes ces structures ont pour rôle de produire de l'énergie nécessaire au glissement des microtubules ainsi qu'un rôle structural.

III. Réorganisation post-méiotique de la chromatine durant la spermatogenèse

1- Organisation finale du génome mâle

Le génome spermatique est environ six fois plus condensé que le génome des cellules somatiques. Si la majeure partie de l'ADN est associée aux protamines, le pourcentage d'ADN restant associé aux histones est encore débattu. Cela varie entre 10 et 15% chez l'Homme (van der Heijden et al., 2008) et 1 à 10% chez la souris (Erkek et al., 2013 ; Jung et al., 2017).

Les protamines qui sont riches en résidus arginine établissent avec les groupements phosphates de l'ADN des liaisons hydrogène et des interactions d'ordre électrostatiques. Cela permet de former des complexes ADN-protamines qui vont ensuite s'empiler en lamelles. Ces dernières vont ensuite s'organiser sous forme de toroïdes (Figure 17) ce qui permet de condenser considérablement l'ADN (Ward et Coffey, 1991). Chaque toroïde est relié à la matrice nucléaire grâce à une séquence d'ADN de 20 à 50 kb appelée MAR qui s'organise sous forme de boucles. Ces régions liant les toroïdes sont dépourvues de protamines et donc sensibles à la DNase1. Les protamines sont également reliées entre elles par de nombreux ponts disulfures grâce à leurs résidus cystéines.

De plus, les PRM 2 seraient liées par des ponts salins à « doigts de zinc » (Björndahl et Kvist, 2010). Cette structure de l'ADN spermatique aurait la propriété d'être résistante à la digestion par des nucléases, contrairement à l'ADN lié aux histones (Sotolongo et al., 2005).

La matrice nucléaire est, quant à elle, constituée d'un réseau protéique fibreux lui-même composé de la lamina nucléaire à laquelle s'associe de nombreuses protéines liées à l'enveloppe nucléaire interne. Celle-ci comprend des protéines structurales telles que l'actine, la myosine, et la lamine B mais aussi des facteurs de transcription ainsi que des « remodeleurs de chromatine » (Johnson et al., 2011). De plus, la matrice est également associée à de l'ARN qui joue également un rôle structural (Mika et Rost, 2005). Son rôle est essentiel à la transcription des gènes nécessaires au développement embryonnaire ainsi qu'à la réplication du génome paternel. À ce titre, il existe plusieurs évidences montrant que la matrice nucléaire jouerait un rôle dans la fertilité masculine (Ankem et al., 2002 ; Barone et al., 2000).

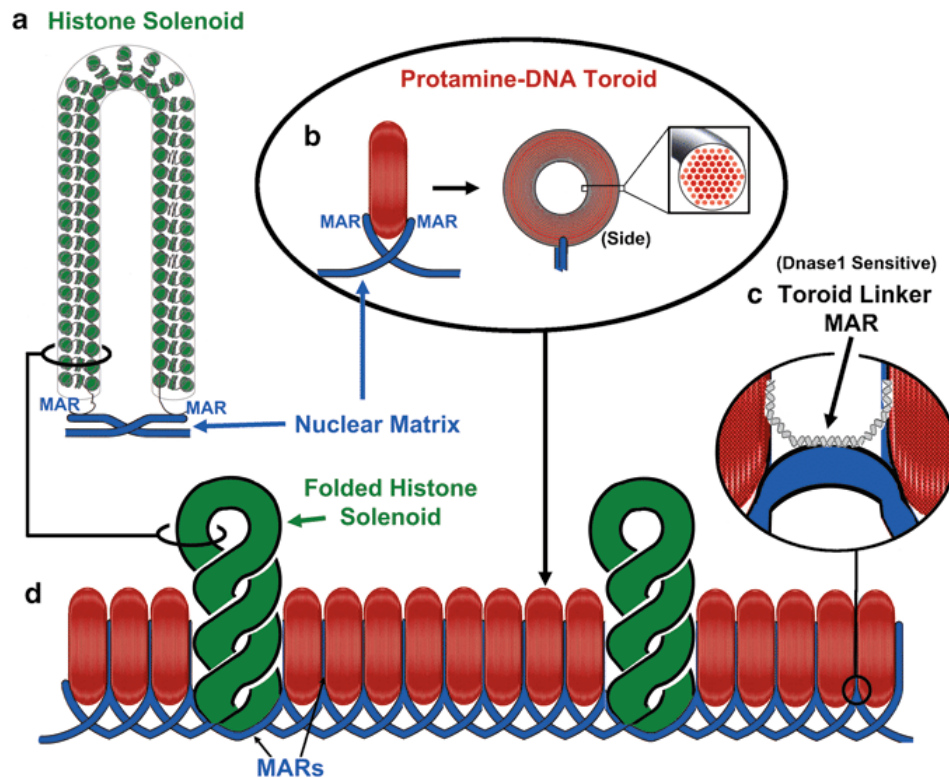


Figure 17 – La structure en toroïde des protamines (issue de Ward, 2010).

Les histones sont remplacées par les protamines au cours de la spermatogenèse. Celles-ci s'organisent en lamelles avant de former des toroïdes. Ces toroïdes sont reliés à la matrice nucléaire par l'intermédiaire d'une séquence d'ADN appelé MAR qui reste sensible à la Dnase. De plus, des régions d'ADN restent associées à des solénoïdes d'histones.

2- Les acteurs de la réorganisation de la chromatine au cours de la maturation post-méiotique des cellules germinales mâles

Dans les spermatides en cours d'élongation se produit tout d'abord une vague d'hyperacétylation des histones dépendant des facteurs Nut et p300. L'hyperacétylation des lysines 5 et 8 de l'histone H4 va permettre l'action du facteur Brdt, l'enlèvement du dimère TH2B-H2A et l'incorporation du dimère TH2B-H2A.L2. Ce dernier crée un nucléosome plus ouvert qui permet ensuite son invasion par les protéines de transition, ces dernières permettant le recrutement des protamines. La protamine-2 est synthétisée sous forme d'un précurseur immature, la pré-protamine-2 (pré-Prm2), qui sera clivée par la suite (Figure 18). Le rôle des différents acteurs sera détaillé par la suite.

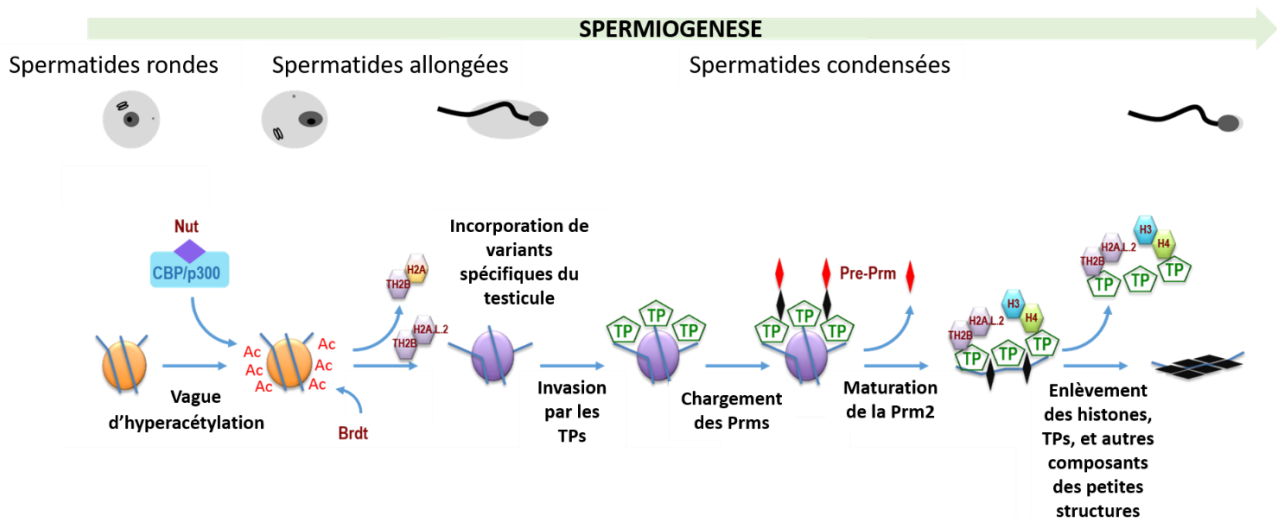


Figure 18 – Les différents acteurs de la réorganisation de la chromatine au cours de la spermatogénèse.

Le processus de réorganisation s'initie par une vague d'hyperacétylation des histones qui est dépendante des facteurs Nut et p300. Cette hyperacétylation est reconnue par le domaine BD1 du facteur Brdt, qui permet l'enlèvement du dimère TH2B-H2A et son remplacement par le dimère TH2B-H2A.L2. Ce dernier crée un nucléosome plus ouvert qui permet l'invasion de la chromatine par les protéines de transition (TPs) et le chargement des protamines. Après le clivage de la Prm2, les différents composants de ces structures transitionnelles sont enlevés.

3- Rôle des modifications post-traductionnelles des histones dans le processus de remplacement des histones par les protamines

Si des modifications épigénétiques telles que la méthylation sont présentes sur l'ADN, il est important de souligner que les modifications post-traductionnelles (MPTs) sur les histones ont également un rôle essentiel dans l'organisation de la chromatine. Ces modifications réversibles consistent en l'ajout d'un ou plusieurs groupements chimiques sur des sites spécifiques et sont catalysées par des enzymes (Figure 19). La majeure partie de ces modifications a lieu sur les extrémités N-ter des histones même si elles peuvent également toucher la partie centrale (Lawrence et al., 2016). Comme dit plus haut, ces MPTs ont un rôle essentiel sur l'organisation de la chromatine et permettent le recrutement de protéines sur un locus à un moment donné via des domaines très conservés. Ainsi certaines modifications favorisent la transcription active de la chromatine tandis que d'autres la répriment.

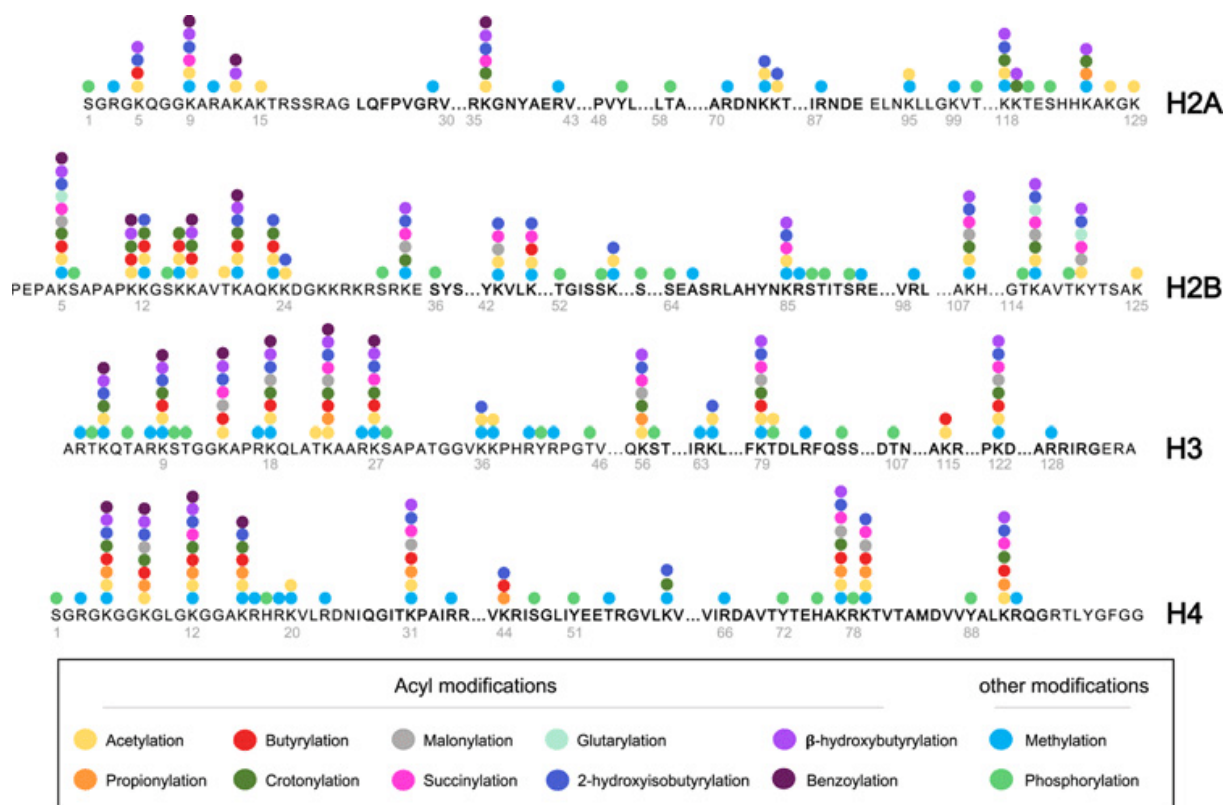


Figure 19 – Illustration des différentes combinaisons possibles de modifications post-traductionnelles des histones (issue de Barnes et al., 2019).

Les histones peuvent subir de très nombreuses modifications post-traductionnelles des acides aminés qui les composent. Ces modifications peuvent altérer les propriétés des nucléosomes et permettent le recrutement de protéines spécifiques dans une région génomique. Ces modifications peuvent favoriser ou empêcher certaines activités de la chromatine, par exemple activer ou réprimer la transcription des gènes.

Toutes les modifications découvertes à ce jour ne seront pas détaillées dans ce manuscrit, mais seront seulement évoquées celles utiles à la compréhension de celui-ci.

3- 1. Acétylation des histones

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupement acétyl ($\text{CH}_3\text{-CO}$) au groupement amine des lysines (K). Cet ajout permet de neutraliser leurs charges positives, ce qui a pour conséquence de déstabiliser l'interaction entre les charges positives des lysines et les charges négatives de l'ADN. Le nucléosome sera de fait plus accessible, ce qui permettra le recrutement de facteurs de transcription et la stimulation de la transcription des gènes situés à ce niveau (Kouzarides, 2007, Zentner et Henikoff, 2013).

Cette modification est très dynamique au sein des cellules et est catalysée par deux groupes d'enzymes : les histones acétyltransferases (HAT) qui permettent l'ajout du groupement en utilisant le co-enzyme A comme donneur de groupement acétyl et les histones déacétylases (HDAC) qui permettent leur enlèvement.

3- 2. Méthylation des histones

La méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (CH₃) au groupement amine des lysines et des arginines. Il n'y a ici pas d'effet sur la charge et l'effet dépendra du résidu méthylé. Ainsi H3K4 est par exemple associée à une activation de la transcription tandis que H3K9me₃ est associée à une répression. Enfin, si les résidus arginines peuvent être mono ou di-méthylés, les résidus lysines peuvent également être tri-méthylés. Les méthylation les plus fréquentes sont celles des histones H3 et H4 (Di Lorenzo & Bedford, 2011). Elles sont catalysées par les histones méthyltransférases (HMT) qui sont subdivisées en 2 groupes : les HKMT pour les lysines (Qian et Zhou, 2006) et les PRMT pour les arginines (Krause et al., 2007). Le nombre de groupements méthyl ajoutés dépend de l'enzyme et de la présence ou non de cofacteurs. La déméthylation est permise grâce à des déméthylases qui se subdivisent également en 2 familles en fonction de l'acide aminé sur lequel elles opèrent (Christophorou et al., 2014 ; Walport et al., 2012).

3- 3. Autres modifications post-traductionnelles des histones

Les groupements OH des sérines, thréonines et tyrosine peuvent être phosphorylés (PO₄) par des kinases, ce qui induit une charge négative pour ces résidus et donc une interaction bouleversée avec l'ADN lui aussi chargé négativement. Il a notamment été montré que la phosphorylation jouait un rôle dans la réparation des cassures double brins de l'ADN via l'histone H2A.X (Rossetto et al., 2012).

Les lysines peuvent enfin être la cible d'ajouts de groupements protéiques (ubiquitination et sumoylation) mais aussi de nombreuses autres modifications comme la glutarylation (Kglu), l'2-hydroxyisobutyrylation (Khib), la crotonylation (Kcr), la butyrylation (Kbu), la propionylation (Kpr), la succinylation (Ksucc), la malonylation (Kmal), la β -hydroxybutyrylation (Kbhb) et la benzoylation (Kbz) (Barnes et al., 2019). Ces modifications peuvent être classées en 3 types en fonction des propriétés des groupements :

- celles qui neutralisent la charge positive des résidus lysine (Kbz, Kpr, Kbu, Kcr)
- celles qui changent la charge positive en charge négative (Ksucc, Kglu, Kmal)
- celles qui permettent l'établissement de liaisons hydrogènes (Khib et Kbhb)

Comme les charges des résidus sont modifiées, les interactions entre histones et ADN le sont également et, de ce fait, ces résidus sont généralement associés à une transcription active.

4- Rôle des variants d'histones dans le processus de remplacement des histones par les protamines

Il existe de nombreux variants d'histones dont l'expression est restreinte aux cellules germinales mâles (Figure 20). Si certains sont exprimés tout le long de la spermatogenèse d'autres le sont seulement à certains stades. La plupart remplacent leurs variants canoniques (Hoghoughi et al., 2018). Ils permettent d'induire un signal spécifique ou de conférer une propriété structurale au nucléosome. Deux d'entre eux feront l'objet d'un paragraphe spécifique.

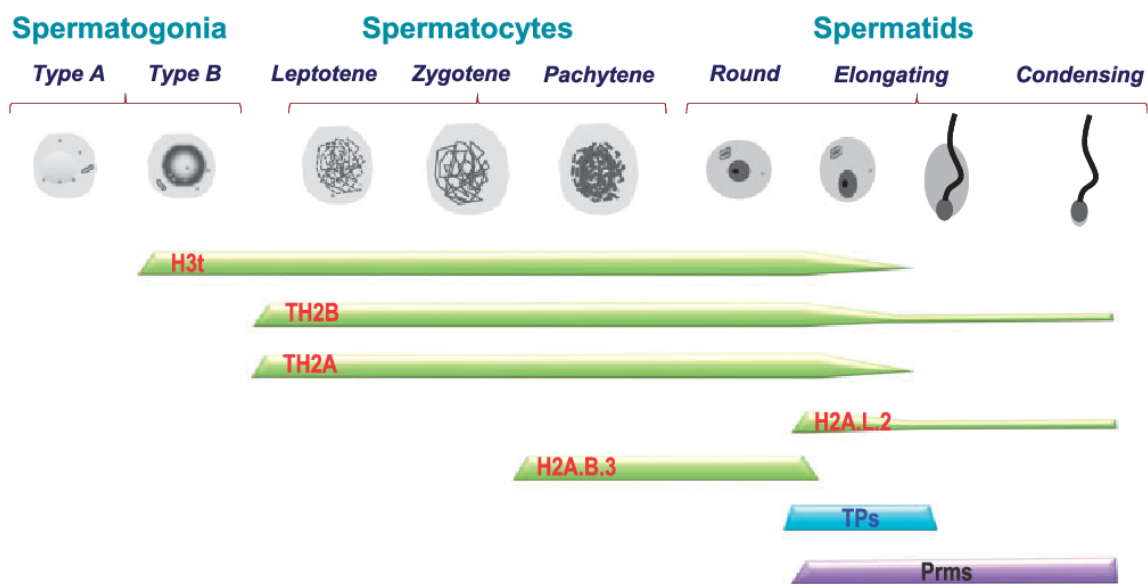


Figure 20 – Profil d'expression des différents variants d'histones au cours de la spermatogenèse (issue de Hoghoughi et al., 2018).

Certains variants d'histone, comme TH2B s'accumulent dès le stade des spermatocytes tandis que d'autres comme H2A.L.2 ne sont exprimés que tardivement au cours de la spermiogénèse.

4- 1. Le variant TH2B

TH2B a été pour la première fois mis en évidence en 1975 (Branson et al., 1975 ; Shires et al., 1975). Il s'agit d'un variant très conservé entre les espèces et qui est exprimé depuis les spermatocytes jusqu'aux spermatozoïdes. Des analyses de spectrométrie de masse ont montré que comparativement à H2B, TH2B possède 2 sites de phosphorylation en partie N-terminale (S11, T22) ainsi qu'un site de phosphorylation (T117) et un de méthylation (K116) en partie C-terminale (Lu et al, 2009).

Il a également été précédemment montré qu'un octamère d'histones contenant TH2B serait plus instable qu'un octamère avec H2B (Li et al., 2005). Cette instabilité pourrait jouer un rôle essentiel dans la réorganisation de la chromatine durant la spermatogenèse au cours des échanges d'histones.

Les premières études de TH2B en contexte physiologique ont ainsi montré que si TH2B est exprimé durant toute la spermatogenèse, il commence à s'accumuler dans les spermatocytes et il remplace massivement H2B dès le début de la phase méiotique de la spermatogenèse, (Montellier et al., 2013). D'autre part, de manière surprenante, l'absence de TH2B n'empêche pas le déroulement normal de la spermatogenèse. Une étude protéomique plus approfondie sur des nucléosomes testiculaires de souris déficientes en TH2B a permis de mettre en évidence des mécanismes compensatoires avec d'une part, une accumulation d'H2B pour permettre de former des nucléosomes et, d'autre part, l'établissement chez les autres histones de nouvelles MPTs à des positions stratégiques permettant d'induire une instabilité du nucléosome. En effet, H4R34, H4R55, H4R67 et H2BR72 sont par exemple méthylés, ce qui a pour effet d'affaiblir les interactions entre les histones et l'ADN.

Par contre, chez les souris exprimant une protéine TH2B avec une partie C-terminale étiquetée, la spermatogenèse s'arrête au stade de l'élongation des spermatides. La présence de l'étiquette induirait un changement de conformation de la protéine qui empêcherait par la suite le remplacement du dimère TH2B-H2A par le dimère TH2B-H2A.L.2, lui-même nécessaire pour l'invasion de l'ADN par les protéines de transition et des protamines (Montellier et al., 2013 ; Barral et al., 2017).

Une étude récente a confirmé que le variant TH2B de l'homme rendait les nucléosomes plus instables (Padavattan et al., 2017).

4- 2. Le variant H2A.L.2

H2A.L.2 a été mis en évidence par mon laboratoire d'accueil à la suite d'une étude protéomique sur des spermatides de souris au moment du remplacement des histones par les protamines (Govin et al., 2007). H2A.L.2 possède 70 % d'homologie avec H2A. Il existe 2 différences majeures entre H2A et H2A.L.2. La première différence réside en l'existence d'un "docking domain" réduit chez H2A.L.2 mais aussi d'une séquence protéique modifiée pour ce domaine (Syed et al., 2009). Or il a été montré que ce domaine situé en partie C-terminale permet l'interaction entre H2A et H3 au sein du nucléosome. La deuxième différence réside en l'absence des 6 résidus acides situés dans le cœur d'H2A, résidus qui interagissent avec les résidus basiques de la partie N-terminale de l'histone H4 du nucléosome adjacent et qui favorisent donc la compaction de l'ADN (Chodaparambil et al., 2007).

Des études menées au sein de mon laboratoire d'accueil ont montré tout d'abord qu'H2A.L.2 se dimérise préférentiellement avec TH2B ce qui induit une instabilité du nucléosome (Govin et al., 2007) et qu'ensuite il est présent dans les structures de transition des spermatides en cours d'élongation. Une étude plus approfondie a montré le rôle essentiel d'H2A.L.2 dans le processus de remplacement entre histones et protamines. H2A.L.2 est en effet exprimé à partir du stade 9 des spermatides allongées et son expression coïncide avec celle des protéines de transition (Barral et al., 2017). Chez les souris dont le gène H2A.L.2 a été invalidé, le

phénotype est d'ailleurs très proche de celui des souris dont les gènes codant pour les protéines de transition TP1 et TP2 ont été invalidés. Ainsi, si l'histologie testiculaire est préservée et si la quantité de spermatozoïdes est normale, les souris mâles sont stériles. Cependant, un défaut de compaction de la chromatine a été mis en évidence par microscopie électronique à transmission ainsi qu'un défaut de maturation de la protamine-2 par immunoblot.

Ainsi, après dimérisation avec TH2B, le dimère H2A.L2-TH2B est intégré dans le nucléosome pour remplacer le dimère H2A-TH2B. Ce dimère permet d'obtenir un nucléosome plus ouvert avec des extrémités d'ADN flexibles qui va créer une plateforme permettant l'invasion du nucléosome par les protéines de transition, protéines qui vont-elles-mêmes permettre le recrutement des protamines puis la maturation de la protamine-2. Ce serait donc les protamines qui permettraient l'éviction des histones. Au contraire, lorsque la protéine H2A.L2 est absente, l'invasion par les protéines de transition ne peut se faire. Celles-ci s'accumulent autour de la chromatine et le recrutement et la maturation des protamines ne peut donc pas se faire correctement (Barral et al., 2017).

Enfin ce variant s'accumule dans les régions péricentromériques et reste présent dans ces régions dans les spermatozoïdes. Mon laboratoire d'accueil a montré que ce variant possède un domaine de liaison à l'ARN en partie N-terminale, dont la séquence est enrichie en arginines comparativement à H2A (Hoghoughi et al., 2020). La capacité intrinsèque d'H2A.L2. à cibler les régions péricentromériques ainsi que sa capacité à lier l'ARN lui permet ainsi de se stabiliser dans la région péricentromérique durant les étapes finales de la spermatogenèse. Ces arguments sont en faveur du fait que la rétention d'histones dans les spermatozoïdes serait dans les régions péricentromériques. En effet, la question de la localisation des histones dans les spermatozoïdes est encore débattu (Saitou et Kurimoto, 2014) et ces données obtenues par données in situ (immunofluorescence et FISH) vont dans le sens des conclusions de deux autres groupes (Carone et al., 2014 ; Samans et al., 2014) qui soutiennent que les histones s'associent préférentiellement avec les séquences répétitives. D'autres groupes soutiennent que les nucléosomes seraient associés à des promoteurs de gènes spécifiquement essentiels pour le développement embryonnaire (Hammoud et al., 2009 ; Erkek et al., 2013) à la suite de résultats obtenus par immunoprécipitation de chromatine. Cependant, la question reste ouverte dans la mesure où il y a également protamination dans les régions péricentromériques.

5- Rôle d'autres acteurs connus dans l'échange histones-protamines

5- 1. Le facteur à double bromodomaine, BRDT

Il a été montré chez de nombreuses espèces différentes que l'enlèvement des histones dans les spermatides allongées était lié à une vague d'hyperacétylation des histones (Hazzouri et al., 2000). Le facteur Brdt (Bromodomain testis-specific), a été étudié dans mon laboratoire d'accueil. En effet, cette protéine fait partie de la famille des protéines à bromo- et extra-terminal domaines (BET). Or cette protéine est spécifiquement exprimée dans le testicule à partir du stade pachytène des spermatocytes I et des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'elle avait la propriété de condenser la chromatine lorsque la chromatine est fortement acétylée (Pivot-Pajot et al., 2003). La protéine Brdt possède deux bromodomaines BD1 et BD2 qui permettent la reconnaissance des marques d'hyperacétylation des histones. Ces bromodomaines sont suivis d'un domaine extra-terminal impliqué dans l'interaction entre protéines.

Des études structurales ont par la suite montré que l'acétylation simultanée des lysines 5 et 8 de l'histone H4 induit leur interaction avec le domaine BD1 de Brdt, acétylation simultanée qui est un marqueur de l'hyperacétylation de cette histone (Morinière et al., 2009). En revanche, il n'y avait pas de reconnaissance par le domaine BD1 en cas de mono-acétylation. Ainsi, cette reconnaissance de l'hyperacétylation permet l'initiation du processus d'échange entre histones et protamines.

Enfin, des études réalisées chez les souris dont le premier BD1 a été délété (qui sont nommés Brdt ^{ΔBD1/ΔBD1}) ont montré, d'une part, que les mâles sont complètement stériles et d'autre part, que la spermatogenèse s'arrête au stade d'élongation (Shang et al., 2007) au moment de l'initiation du processus d'échange entre histones et protamines (Gaucher et al., 2012). Cette délétion affecte la localisation des protéines de transition et des protamines mais pas leur expression. En effet, elles s'accumulent dans le cytoplasme en périphérie du noyau. Ainsi chez ces souris, il n'y a pas d'enlèvement des histones hyperacétylées, empêchant le recrutement des protéines de transition et des protamines et donc le déroulement normal de la spermiogenèse.

5- 2. Le facteur nucléaire testiculaire, Nut

Nut (Nuclear protein in Testis) est une protéine dont l'expression est exclusivement testiculaire. Ce gène a la particularité de se retrouver fusionné aux gènes BRD3 et BRD4 dans un carcinome très agressif, le NMC (Nut midline carcinoma ; Miyoshi et al., 2003). L'expression de la protéine de fusion BRD3-Nut ou BRD4-Nut génère chez les patients atteints de NMC des

foyers de chromatine hyperacétylée après recrutement de CBP/p300. p300 est une acétyltransférase dont l'activité est augmentée en présence de NUT (Reynoird et al., 2010).

Mon laboratoire d'accueil a généré une souris dont le gène Nut a été inactivé afin de déterminer le rôle de la protéine dans la spermatogenèse (Nut-KO).

La protéine Nut est exprimée dans les spermatides rondes et en début d'élongation. Chez les souris Nut-KO la spermatogenèse s'arrête en début d'élongation, au moment de l'initiation du processus d'échange entre histones et protamines (Shiota et al., 2018). Ces souris sont complètement stériles puisqu'il n'y a pas de production de spermatozoïdes matures. Mais plus intéressant encore, des études de spectrométrie de masse et l'utilisation d'anticorps spécifiques ont montré qu'il y avait une diminution franche du niveau d'acétylation des histones H4 au niveau des lysines 5 et 8.

Enfin, comme dans l'étude concernant le NMC, cette étude a non seulement montré l'association dans les spermatides de Nut et de l'acétyltransférase p300 mais aussi que c'est Nut qui permet son recrutement. De plus, la comparaison des études transcriptomiques réalisées sur des extraits d'ARN de souris p300 et CBP-KO (double KO dans les cellules post-méiotiques ; Boussouar et al., 2014) et de Nut-KO (Shiota et al., 2018) ont révélé que c'est la même population de gènes qui se retrouve affectée dans les deux cas.

Ainsi, l'interaction de Nut avec p300 permet d'accroître fortement son activité et donc, par conséquent, l'acétylation de H4K5 et H4K8. Cette hyperacétylation sera ensuite reconnue par le domaine BD1 de Brdt, ce qui enclenchera le processus d'enlèvement des histones (Figure 18).

IV. Implication des protéines de transition et des protamines dans la maturation post-méiotique des cellules germinales mâles

Durant la spermiogenèse les histones sont remplacées par une action combinée des protéines de transition et des protamines dont les rôles respectifs vont être détaillés dans ce chapitre.

1- Les protéines de transition (TPs)

1- 1. Structure

Il existe 4 protéines de transition identifiées à ce jour chez les mammifères, mais TP1 et TP2 sont celles ayant été le plus étudiées et caractérisées. Elles représentent 90% des protéines nucléaires basiques des spermatides de stade 12-13 avec une quantité de TP1 environ 2,5 fois supérieure à celle de TP2 (Yu et al., 2000). Ce stade correspond à celui du début de remplacement des histones.

TP1 et TP2 sont des protéines de faible poids moléculaire, respectivement 6,2 kDa pour TP1 et 13 kDa pour TP2. Ce sont des protéines basiques, même si leur basicité est moindre que celle des protamines (Grimes et al., 1977). La séquence de TP1 comprend 20% d'arginines et 20% de lysines mais ne comprend pas de cystéines tandis que TP2 comprend 10 % de lysines, 10% d'arginines et environ 5% de cystéines mais aussi de la sérine et de la proline (Grimes et al., 1977). TP2 a la particularité de posséder également deux domaines à doigt de zinc présents tous deux en partie N-Terminale, domaines qui permettent la liaison à l'ADN et qui se lient plus spécifiquement aux sites CpG en amont des séquences promotrices (Kundu et Rao, 1996) ainsi qu'une partie C-terminale très basique.

D'autre part, si TP1 est très conservée entre les espèces (environ 90 % d'homologie chez les mammifères), ce n'est pas le cas de TP2 qui, de plus, a un taux d'expression variable suivant les espèces (Kremling et al., 1989 ; Steger et al., 1998). Le gène codant pour TP2 est situé au niveau du cluster Protamine1 - Protamine2 - Protéine de transition2 et Protamine3. Chez la souris et chez l'homme ce cluster se situe sur le chromosome 16 et est flanqué de deux MARs (Matrix attachment region) impliqués dans la régulation de la transcription des gènes de ce cluster (Martins et al., 2004). Ces séquences ont été nommées SMARs pour « sperm nuclear matrix attachment regions » (Kramer et Krawetz, 1996). Le gène codant pour TP1 se situe quant à lui sur le chromosome 1 chez la souris et sur le chromosome 2 chez l'homme. Les deux gènes sont composés de deux exons et d'un intron. La transcription de TP1 et du cluster contenant TP2 a lieu au même moment, c'est à dire dans les spermatides rondes de stade 6-7 (Mali et al., 1989). Leurs ARNm sont stockés sous forme de ribonucléoprotéines dans le

cytoplasme durant 3 à 7 jours avant d'être traduits dans les spermatides de stade 11 à 13 (Kwon et Hecht, 1993 ; Grimes et al., 1977 ; Alfonso et Kistler, 1993; Heidaran et al., 1988 ; Meistrich et al., 2003). Afin de retarder leur traduction et donc de maintenir leurs ARNm dans un statut inactif, l'extrémité 3' des ARNm est polyadénylée par addition de 150 bases d'adénine (Kleene, 1989). Le rôle essentiel de ce signal de polyadénylation a été mis en évidence chez la souris : si la séquence 3'UTR du gène TP2 est remplacée par la séquence 3'UTR de l'hormone de croissance humaine, la traduction a lieu de suite après transcription et dans ce cas, les souris sont stériles (Tseden et al., 2007).

Les TP subissent plusieurs modifications post-traductionnelles qui pourraient jouer un rôle dans leur capacité à condenser l'ADN (Brewer et al., 2002).

Elles sont tout d'abord phosphorylées sur leurs parties C-terminales juste après leurs traductions, cette phosphorylation leur permettant de moduler leur interaction avec l'ADN. Elles seront déphosphorylées par la suite afin d'augmenter leur affinité avec l'ADN. En effet, après déphosphorylation leurs résidus basiques vont pouvoir interagir avec le phosphosquelette de l'ADN et permettre ainsi la condensation de l'ADN (Dadoune, 2003). Il a été montré que l'efficacité de condensation de TP2 était supérieure à celle de TP1 (Baskaran et Rao, 1990).

Il a ensuite été montré chez la souris et chez le rat que la phosphorylation de TP2 est catalysée par une protéine kinase A spécifiques des cellules germinales, la Cs-PKA, et qu'elle a lieu sur les résidus sérine 109 et thréonine 101 (Meetei et al., 2002). Cette phosphorylation joue également un rôle dans le transport nucléaire de TP2 (Ullas et al., 2003) et ce transport implique également l'importine β 4 (Pradeepa et al., 2008).

Cependant, des études par spectrométrie de masse ont notamment montré chez le rat qu'il existait 16 et 19 modifications post-traductionnelles sur TP1 et TP2 respectivement (Gupta et al., 2015) (Figure 21). Ainsi l'acétyltransférase p300 est impliquée dans l'acétylation de TP2 sur sa partie C-terminale (Pradeepa et al., 2009) et diminuerait sa propriété à condenser l'ADN. D'autre part, plusieurs sites de méthylation ont été mis en évidence *in vitro* pour TP2. C'est le cas des arginines 71, 75, 92 pour lesquelles la méthylation est catalysée par PRMT4 mais aussi des lysines 88 et 91 méthylées par PRMT7. Deux de ces sites ont également été mis en évidence *in vivo* (K88 et R92) (Gupta et al., 2015).

Enfin la liaison des domaines à doigt de zinc de TP2 avec les séquences riches en CpG pourrait permettre l'initiation de la condensation de la chromatine sur ce locus spécifique (Pradeepa et Rao, 2007). Cependant, les mécanismes permettant l'incorporation des protéines de transition à l'ADN sont encore obscurs même s'il a été montré que la protéine chaperonne HSP70.2 est associée aux TP lorsqu'elles ne sont pas liées à l'ADN (Govin et al., 2006).

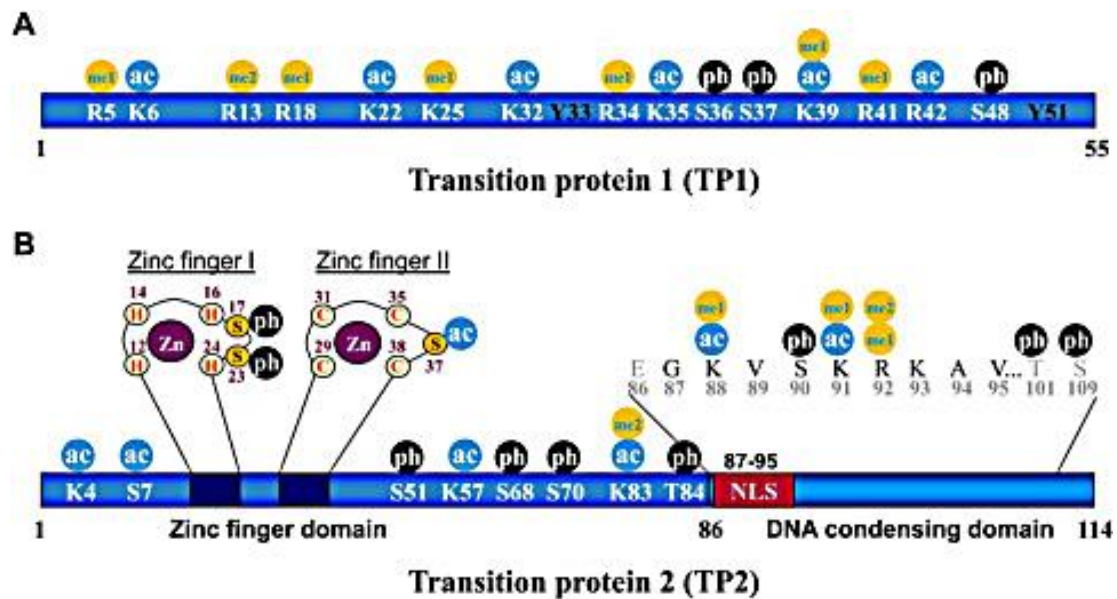


Figure 21 – Structure des protéines de transition chez le rat avec leurs modifications post-traductionnelles (issue de Gupta et al., 2015).

Les différents domaines comme les domaines à doigt de zinc de TP2 et les modifications post-traductionnelles (Acétylation ac, Méthylation me et Phosphorylation ph) sont indiqués. Les domaines à doigt de zinc permettent la liaison à l'ADN. Les modifications post-traductionnelles permettent de moduler leurs propriétés d'interaction avec l'ADN.

1- 2. Fonction

Comme les protéines de transition ne sont pas présentes chez toutes les espèces, elles sont notamment absentes chez les oiseaux, cela a donné naissance à de nombreux questionnements sur leur fonction précise pour les espèces chez qui elles sont présentes.

Ainsi, un des premiers rôles mis à jour pour TP1 est de stimuler la réparation des cassures simple brin de l'ADN suite à sa liaison avec l'ADN au niveau du site endommagé, l'ADN étant chargé négativement et TP1 positivement. Le rôle de TP1 est de permettre un meilleur alignement des brins cassés d'ADN afin de stimuler la réparation. Une ligase inconnue serait ensuite recrutée permettant aux fragments d'être reliés.

Un second rôle démontré *in vitro* est sa capacité à diminuer la température de fusion de l'ADN (Singh et Rao, 1987) ainsi que sa capacité à non seulement déstabiliser l'interaction entre l'ADN et le nucléosome mais aussi à relâcher la chromatine en présence d'un complexe ADN-nucléosome (Singh et Rao, 1988).

Concernant TP2, il a été proposé que celle-ci participe à la régulation de la transcription et à l'initiation de la compaction de la chromatine (Baskaran et Rao, 1990 ; Kundu et Rao, 1996).

En effet, TP2 par l'intermédiaire de ses domaines à doigt de zinc se lie aux séquences CpG qui sont situés en amont des séquences promotrices, ce qui permet d'initier la condensation spécifiquement sur ces locus (Kundu et Rao, 1996). *In vivo*, il a été montré dans les spermatides de rats qu'il y avait colocalisation entre TP2 et la chromomycine A3 ou la 7-aminoactinomycine D, deux composés fluorescents à haute affinité pour les séquences CpG de l'ADN (Kolthur-Seetharam et al., 2009).

Enfin, une étude portant sur TP4 chez le sanglier a montré qu'elle stimule la topoisomérase I aidant par conséquent à relâcher l'ADN (Akama et al., 1999).

D'autre part, afin de mieux comprendre le rôle de TP1 et/ou TP2 durant la spermatogenèse, des souris invalidées pour l'un ou les deux gènes ont été générées.

Si les souris invalidées pour TP1 ou TP2 sont hypofertiles, il n'y a pas un phénotype particulièrement sévère. En effet, les testicules sont de taille normale et la spermatogenèse l'est également. Cependant malgré que la concentration en spermatozoïdes soit normale l'absence de TP1 a un effet sur la morphologie de la tête des spermatozoïdes ainsi que sur la mobilité de ceux-ci tandis que l'absence de TP2 entraîne quelques défauts de morphologie flagellaire. Cependant il a été montré un effet de compensation lors de l'absence de l'une des protéines puisque TP1 est surexprimée en l'absence de TP2 et TP2 est surexprimée en l'absence de TP1. Par contre, fait important, tant chez les souris TP1-KO que chez les souris TP2-KO, il existe une anomalie de compaction de la chromatine et un défaut de maturation de la pré-protamine 2 en protamine-2, dont la structure et la fonction seront détaillées dans la partie suivante (Adham et al., 2001; Yu et al., 2000; Zhao et al., 2001 ; Zhao et al., 2004).

Du fait qu'il existe un phénomène de compensation lors de l'absence d'une seule des deux protéines, des souris invalidées pour les deux gènes ont été générées afin de comprendre plus précisément le rôle des TP au cours de la spermatogenèse et plus particulièrement au niveau de la compaction de la chromatine (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004).

Les souris double KO TP1-KO et TP2-KO sont complètement stériles. Si la spermatogenèse est normale, il y a rétention des spermatozoïdes au niveau testiculaire avec une mortalité d'environ 80% dans l'épididyme. Chez les spermatozoïdes restants, de nombreux défauts morphologiques sont présents tels qu'un ancrage incorrect de l'acrosome à l'enveloppe nucléaire, une désorganisation totale du manchon mitochondrial situé dans la pièce intermédiaire ainsi qu'une mobilité particulièrement diminuée (Shirley et al., 2004). De plus, la compaction de l'ADN est particulièrement déficiente et des anomalies majeures apparaissent chez les spermatides condensées dès les stades 12-13 (Zhao et al., 2004). En effet, chez des souris sauvages, à partir des stades 12-13, il y a un épaississement des fibres de chromatine et la compaction se fait dans la direction antéro-postérieure jusqu'au stade 16 où les fibres s'agrègent pour former une chromatine uniformément dense. Chez les doubles KO, les fibres ne s'épaississent pas, et si des foyers de compaction se créent et s'agrandissent jusqu'au stade 16, la compaction de la chromatine reste incomplète au stade 16 où les foyers restent proches les uns des autres en laissant des lacunes entre eux. La maturation de la protamine-2 était également affectée avec persistance de la pré-Prm2 dans les spermatozoïdes épididymaires. Par contre l'absence de TP1 et TP2 n'a pas entraîné de rétention des histones et leur remplacement par les protamines puisque la chronologie d'enlèvement des histones et de déposition des protamines est normale chez les doubles KO (Zhao et al., 2004).

Enfin, si l'injection in vitro de noyaux des spermatozoïdes testiculaires double KO TP1-KO et TP2-KO à des ovocytes sauvages entraîne un taux de fécondation et de développement embryonnaire normal, l'injection de noyaux de spermatozoïdes épидидymaires TP1-KO et TP2-KO entraîne en revanche un taux de fécondation et de développement embryonnaire très bas, ce qui signifie que la compaction défectueuse de l'ADN provoque des dommages à celui-ci pendant le transit épидидymaire, ce qui provoque la stérilité des souris.

Ainsi les protéines de transition sont essentielles à la compaction du génome spermatique et à la maturation de la protamine-2. Elles ont également un rôle dans la réparation ou la prévention des cassures de l'ADN. De part ce rôle essentiel dans la compaction du génome, leur absence ou mauvaise expression donnant lieu à des altérations génétiques, elles peuvent aussi être responsables d'une infertilité chez l'homme. Ceci sera détaillé dans un chapitre ultérieur.

2- Les protamines (Prms)

Durant les stades tardifs de la spermatogenèse, la compaction du génome est assurée par des petites protéines encore plus basiques que les TP qui sont les protamines.

2- 1. Structure

Comme dit ci-dessus, chez la souris et chez l'homme les gènes codant pour les protamines font partie d'un cluster sur le chromosome 16 dont fait également partie TP2. Les deux gènes comprennent 2 exons et un intron (Dadoue, 2003). Comme expliqué dans le paragraphe concernant les TPs, le cluster est flanqué de deux séquences régulatrices (MARs) et la transcription des gènes *Prm1* et *Prm2* a donc lieu au même moment que *TP2*, c'est-à-dire dans les spermatides de stade 7. Là encore, ils sont stockés sous forme de ribonucléoprotéines dans le cytoplasme. Un signal de polyadénylation permet également de maintenir leurs ARNm dans un état inactif, il comprend environ 160 résidus lorsque les ARNm sont transcriptionnellement inactifs (Kleene, 1989). Les protamines sont traduites en même temps que les protéines de transition, dans les spermatides à partir du stade 12 (Balhorn et al., 1984 ; Biggiogera et al., 1992). D'autres études opteraient pour une traduction plus tardive pour la *Prm1*, c'est à dire à partir des stades 13-14 (Mali et al., 1988). Il a été montré que si les ARNm de *Prm1* et *Prm2* comprenant un signal de polyadénylation de 160 résidus sont inactifs, 80 à 95% des ARNm de *Prm1* et *Prm2* comprenant un signal de polyadénylation de 30 résidus sont transcriptionnellement actifs (Kleene et al., 1984 ; Heidaran et Kistler, 1987 ; Kleene, 1989, 1993).

Le rôle essentiel de ce signal de polyadénylation a également été mis en évidence chez la souris : si la séquence 3'UTR du gène codant pour la *Prm1* est remplacée par la séquence 3'UTR de l'hormone de croissance humaine, la traduction a lieu de suite après transcription et

dans ce cas, les souris sont stériles et la maturation de la protamine2 n'a pas lieu (Lee et al., 1995).

Les séquences 5'UTR et 3'UTR des protamines et TP sont très conservées entre les espèces suggérant là encore une pression forte afin de réguler la transcription et traduction de ces protéines dans la mesure où leur présence prématurée induit une stérilité et est toxique pour les cellules somatiques (Kleene et Bagarova, 2008 ; Lee et al., 1995). Dans la partie 3'UTR de la Prm1 se trouve notamment la séquence YBS (Y-box recognition site) qui permet la fixation de MSY2 et MSY4, deux protéines Y-box qui font partie des ribonucléoprotéines testiculaires (Giorgini et al., 2001). La partie 3'UTR contient plus précisément le TCE (Translational control element) qui joue un rôle indispensable puisque qu'un changement de cette séquence induit une traduction prématurée (Zhong et al., 2001).

En outre, les régions flanquantes de ces gènes sont également conservées entre les espèces et la région 5' contient notamment un enhancer dépendant de l'AMPc en amont de la TATA box, appelé « cAMP response element » (CRE) dont la séquence diffère d'une ou deux bases de la séquence consensus avec des séquences spécifiques des gènes. De plus, il y a une proportion importante de dinucléotides CA adjacent à la séquence CRE. Ce motif est unique aux PRMs et aux TP suggérant un motif CRE élargi qui pourrait permettre une expression coordonnée de ces protéines (Oliva et Dixon, 1990).

Enfin, la répression de la transcription implique des répresseurs qui se lient à des séquences spécifiques des séquences 3'UTR ou du signal de polyadénylation (Stern et al., 1983 ; Hecht, 1988, 1990 ; Morales et al., 1991 , Dadoune, 1995 ; Kleene, 1996 ; Steger, 1999).

Les protamines sont des protéines de faible poids moléculaire riches en arginine et cystéine qui vont se localiser dans le petit sillon de l'ADN (Dadoune, 2003). Leurs gènes dérivent d'un gène ancestral également à l'origine des gènes des histones (Eirín-López et Ausió, 2009). Il en existe 2 chez les mammifères PRM1, qui comprend 50 acides aminés (environ 5,5 kDa), et PRM2 qui est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la pré-PRM2, comprenant respectivement 101 et 106 aminés chez l'homme et la souris (Balhorn, 2007). La maturation de la PRM2 sera étudiée dans la partie suivante. Si PRM1 est exprimée chez tous les mammifères, PRM2 n'est en revanche exprimée que chez certains mammifères dont l'homme, les primates et la souris.

Alors que la séquence de la PRM1 est très conservée, ce n'est pas le cas pour PRM2. Néanmoins elles comportent toutes deux des domaines structuraux leur conférant un certain nombre de propriétés (Figure 22). Le domaine central est très riche en arginine (cluster comprenant 3 à 11 résidus) qui leur permet d'interagir avec l'ADN grâce à l'établissement de liaisons H⁺ entre l'ADN et les deux groupements amines des arginines, il s'agit donc d'un domaine d'ancrage. Ce domaine est entouré de courts segments riches en cystéine. Dans le cas de la Prm2 mature les domaines arginines sont espacés. Il y a également plus d'histidines que chez Prm1 (20% pour Prm2 et 5% pour Prm1 ; Yelick et al., 1987).

De plus, des résidus cystéines sont présents dans les parties amino et carboxy-terminales des PRMs (Vilfan et al., 2004). Ces résidus sont oxydés durant le transit épидидymaire et forment

des ponts disulfures intra et inter-protamines. En étant ainsi reliées entre elles toute dissociation est évitée (Carrell et al., 2007) et le complexe ADN-protamines est stabilisé. L'oxydation des groupements thiols des cystéines consécutives est réalisée par nGPx4 une sélénoprotéine nucléaire (Puglisi et al., 2014).

Enfin, chez l'homme et la souris la partie C-terminale de la PRM2 possède un domaine à doigt de zinc qui comprend 2 cystéines et 2 histidines. Le zinc pourrait participer à la condensation de la chromatine en protégeant de l'oxydation les groupements thiol des cystéines, permettant de limiter la formation de ponts disulfures intra et inter protamines (Björndahl et Kvist, 2010). Ce domaine aurait aussi un rôle dans l'inhibition de la transcription à la fin de la spermiogenèse (Bianchi et al., 1992). Il est important de souligner que le zinc est suffisamment abondant dans la cellule pour qu'une molécule se fixe sur chaque PRM2 (Bench et al., 2000).

Comme pour les TPs les protamines sont phosphorylées immédiatement après leur traduction et transportées vers le noyau (Green et al., 1994) (Figure 22-A). Les kinases responsables de cette catalyse ne sont pas les mêmes pour la Prm1 et la Prm2 : il s'agit de SRPK1 pour Prm1 (Papoutsopoulou et al., 1999) et CAMK4 pour la Prm2 ainsi que pour ses formes intermédiaires (Carrell et al., 2007). CAMK4 est d'ailleurs détectée dans les stades tardifs des spermatides (Wu et al., 2000). Dans le cas de la Prm1, ce sont les résidus sérine et thréonine de la partie amino-terminale qui sont phosphorylées, tandis que pour Prm2 les sites de phosphorylation sont situés dans la partie centrale de la protéine, ce qui suggérerait des différences quant à leurs propriétés d'interaction (Pirhonen et al., 1994).

La phosphorylation des protamines est en effet indispensable à leur liaison avec l'ADN et une fois fixées, leur déphosphorylation est indispensable à la stabilité de l'interaction avec le phosphosquelette de l'ADN (Rathke et al., 2014 ; Dadoune, 2003). Une étude plus récente chez la souris a montré que la déphosphorylation de la sérine 56 par la phosphatase Ppp1cc (Ppp1cc2) est indispensable à la spermiogenèse (Itoh et al., 2019). Ce résidu est également suggéré phosphorylé chez l'homme (Chirat et al., 1993).

Enfin, il a été découvert plus récemment que la Prm1 avait également des résidus acétylés et méthylés et que la Prm2 avait des résidus acétylés (Brunner et al., 2014) (Figure 22-B).

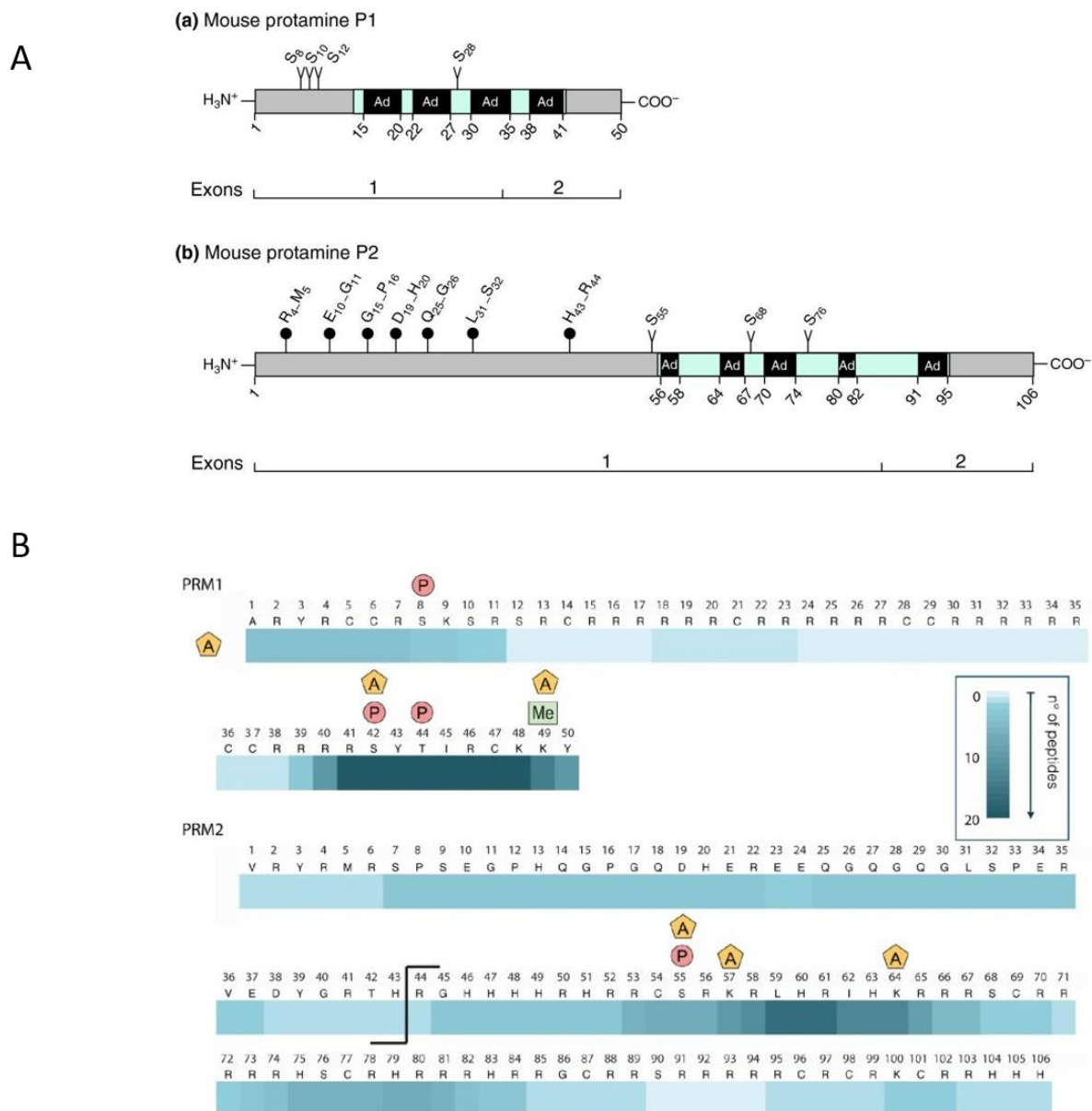


Figure 22 – Structure des protamines chez la souris.

- A- Représentation des différents domaines des protamines chez la souris. Les sites de clivages , les domaines de liaison à l'ADN  et les sites de phosphorylation sont indiqués  (issue de Balhorn, 2007). Les domaines d'ancrage à l'ADN (Ad) sont très riches en arginine permettant l'établissement de liaisons hydrogènes entre l'ADN et les groupements amines de celles-ci.
- B- Séquence des protamines chez la souris et sites de modifications post-traductionnelles : Acétylation A, Méthylation Me et Phosphorylation P (issue de Brunner et al., 2014). Il a notamment été montré que la phosphorylation est nécessaire à leur liaison à l'ADN.

Il existe également une Prm3 mais qui à la différence des deux autres possède des résidus chargés négativement, ce qui exclue un rôle de liaison à l'ADN (Balhorn, 2007). Ceci est renforcé par le fait que c'est une protéine cytoplasmique qui est absente du spermatozoïde mature (Grzmil et al., 2008). Cependant, c'est une protéine conservée chez 14 espèces représentant 7 ordres de mammifères et dont la séquence comprend un domaine présumé « coiled-coil », ces domaines étant impliqué dans l'interaction entre protéines.

Le fait que les spermatozoïdes issus de mâle *Prm3*^{-/-} aient une mobilité réduite pourraient être liés à un défaut d'interaction entre plusieurs protéines durant la spermiogénèse (Grzmil et al., 2008).

2- 2. Maturation de la PRM2

C'est une fois incorporé à l'ADN que le précurseur de la *Prm2* va subir plusieurs clivages successifs qui s'étalent sur plusieurs jours chez la souris (Chauvière et al., 1992 ; Carre-Eusebe et al., 1991). Cela aboutit à l'existence de 6 formes intermédiaires de la protéine, les excisions ayant lieu en position 4, 10, 15, 19, 25, 31 et 43 (Figure 22-A). Les protéines *Prm2/5*, *Prm2/11*, *Prm2/16*, *Prm2/20*, *Prm2/26* et *Prm2/32* ont été isolées à partir de noyaux de spermatides de souris et montrent que la partie N-terminale de chaque protéine chevauche une partie distincte de la partie N-terminale de la pré-*Prm2* tandis que la partie C-terminale est toujours identique.

Au final ces clivages séquentiels vont aboutir au clivage de plus de 40% de la partie amino-terminale. La PRM2 mature possède donc 54 et 63 acides aminés chez l'homme et la souris respectivement (de Mateo et al., 2011). Il est important de souligner que la maturation de la PRM2 se poursuit dans l'épididyme (Debarle et al., 1995) et qu'il y a également une persistance des protéines intermédiaires à un taux très bas dans les spermatozoïdes (Gusse et al., 1986).

La voie protéolytique impliquée dans cette maturation est encore inconnue à ce jour mais la présence simultanée des formes intermédiaires dans le testicule pencherait en faveur du fait que certains sites sont clivés de manière préférentielle (Yu et al., 2000 ; Zhao et al., 2001).

2- 3. Fonction

Les protamines permettent donc une compaction extrême du génome, de l'ordre de six fois supérieure celle du génome somatique (Ward et Coffey, 1991). Ainsi, la chromatine est organisée de façon totalement différente, non plus sous forme d'euchromatine et d'hétérochromatine mais sous forme de nucléo-protamines. Ceci permet de protéger le génome paternel de lésions oxydatives et des endonucléases jusqu'à la fécondation. Pour cela le ratio PRM1/PRM2 doit être de 1/1 chez l'homme.

Les protamines sont essentielles à la spermiogénèse, l'invalidation de *Prm1* ou de *Prm2* entraînant une stérilité chez les souris (Cho et al., 2001 ; Schneider et al., 2016). Les spermatozoïdes présentent en effet une forme anormale, une mobilité réduite et des défauts majeurs de compaction associés à une fragmentation élevée de leur ADN. De plus, une diminution de l'expression de l'une ou l'autre des protamines entraîne des défauts nucléaires. Dans le cas de la *Prm2* cela a pour conséquence une mauvaise compaction de l'ADN associée à un échec de développement embryonnaire (Cho et al., 2003).

D'un point de vue mécanique, la Prm1 se lie à 10 ou 11 paires de bases d'ADN tandis que la Prm2 se lie à 15 paires de bases (Balhorn, 2007). La liaison des protamines au phosphosquelette annihile la charge du complexe chromatinien, permettant de le condenser dans un noyau qui est 1/20^{ème} fois celui d'une cellule somatique. Cela contribue indirectement à la forme de la tête et aux propriétés hydrodynamiques de celle-ci.

V. Infertilité chez l'homme

1- Définition et données épidémiologiques

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit l'infertilité comme étant l'échec d'obtention d'une grossesse pour des couples en âge de procréer (femmes de 18 à 45 ans) après 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés. Elle peut-être primaire quand il n'y a jamais eu de grossesse ou secondaire lorsque le couple est parvenu à obtenir au moins une grossesse dans le passé.

On estime en moyenne qu'entre 8 et 12% des couples seraient confrontés à ce problème avec cependant des disparités en fonction des régions du globe (Boivin, 2007 ; Vander Borgh et Wyns, 2018). À ce titre, l'infertilité a été définie par l'OMS comme préoccupation majeure de santé. Il faut tout de même signaler qu'il est très difficile d'obtenir des données précises concernant la prévalence de l'infertilité du fait des différences territoriales quant à la définition même de l'infertilité mais aussi du fait du manque de données concernant l'infertilité masculine dans certaines régions du globe (Inhorn et Patrizio, 2015).

On estime que dans 50% des cas un facteur masculin est impliqué (Vander Borgh et Wyns, 2018).

A l'heure actuelle il existe 30% d'infertilités idiopathiques (Tüttelmann et al., 2011). De plus lorsqu'un couple doit avoir recours à une technique de procréation médicalement assistée (PMA), les taux de réussite en France s'échelonnent entre 10 et 20% en fonction de la technique utilisée d'après le rapport scientifique 2018 de l'agence de biomédecine. En conséquent, après les 4 tentatives de PMA remboursées par la sécurité sociale, en moyenne un couple sur deux n'aura pas obtenu de grossesse clinique.

Sachant que la spermatogenèse est un processus physiologique unique et d'une extrême complexité et qu'il existe plus de 500 gènes spécifiquement exprimés dans le testicule, une composante génétique est impliquée dans de très nombreux cas pour lesquels l'étiologie est encore inconnue à ce jour (Tüttelmann et al., 2011). D'autant qu'il existe une augmentation des cas d'infertilité au sein d'une même fratrie et qu'il existe des modèles murins KO dont le phénotype est une stérilité (Matzuk et Lamb, 2008). Les phénotypes vont être détaillés par la suite mais tous phénotypes confondus, les défauts génétiques sont retrouvés dans moins de 5 % des cas d'infertilité masculine (Hwang et al., 2010).

Ainsi la compréhension du processus physiologique de transition entre les histones et les protamines pourrait permettre de progresser sur certaines causes d'infertilité. D'autant qu'un taux de fragmentation d'ADN élevé, qui est un marqueur d'une mauvaise compaction de l'ADN, ou un ratio histones/protamines élevé sont notamment des indicateurs de mauvais pronostic même en cas de FIV-ICSI (fécondation *in vitro* avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes) (Fournier et al., 2018 ; Deng et al., 2019).

Enfin, de nombreuses études ont montré que des facteurs environnementaux tels que des perturbateurs endocriniens pourraient être impliqués. Les études portant sur la souris suggèrent que les antiandrogènes auraient un impact important et des études chez l'homme doivent être maintenant réalisées (Gore et al., 2015).

2- Facteurs génétiques impliqués dans certains phénotypes

2- 1. L'azoospermie

L'azoospermie est définie comme une absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat, dont l'origine peut-être obstructive ou non obstructive. Plusieurs gènes ont été mis en évidence dans les deux cas. C'est un phénotype fréquent dans la mesure où cela concerne 10 à 20% des hommes infertiles (Jarow et al., 1989).

Dans le cas des azoospermies obstructives (AO), il s'agit dans 25 % des cas d'une mutation du gène *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator ; Yu et al., 2012). La présence d'agénésie bilatérale des canaux déférents (CBAVD) chez les patients atteints de mucoviscidose a permis par la suite de mettre ce gène en évidence pour des agénésies isolées. Dans ce cas, il s'agit souvent de l'association entre une mutation majeure avec une mutation mineure, ce qui implique que les patients ne présentent pas de symptômes de la mucoviscidose (Yu et al., 2012). Chez 4 autres patients avec CBAVD, le gène *ADGRG2* (adhesion G protein-coupled receptor G2) a été mis en évidence (Patat et al., 2016).

Concernant les azoospermies non-obstructives (ANO), les premières études ont montré des implications chromosomiques telles qu'une microdélétion du chromosome Y et notamment de la région AZF (Azoospermia factor). Il faut souligner que le chromosome Y comprend 78 gènes impliqués dans la différenciation sexuelle masculine et la spermatogenèse (Skaletsky et al., 2003). La région AZF contient un certain nombre de gènes essentiels à la spermatogenèse (Figure 23). Ces microdélétions sont présentes chez 10% des patients présentant une ANO (Hotelling et Carrell, 2014). Elles sont également retrouvées chez 5% des patients présentant une oligospermie sévère (≤ 5 millions de spermatozoïdes par mL d'éjaculat). Une autre cause fréquente d'azoospermie est le syndrome de Klinefelter (caryotype XXY, 14% des ANO).

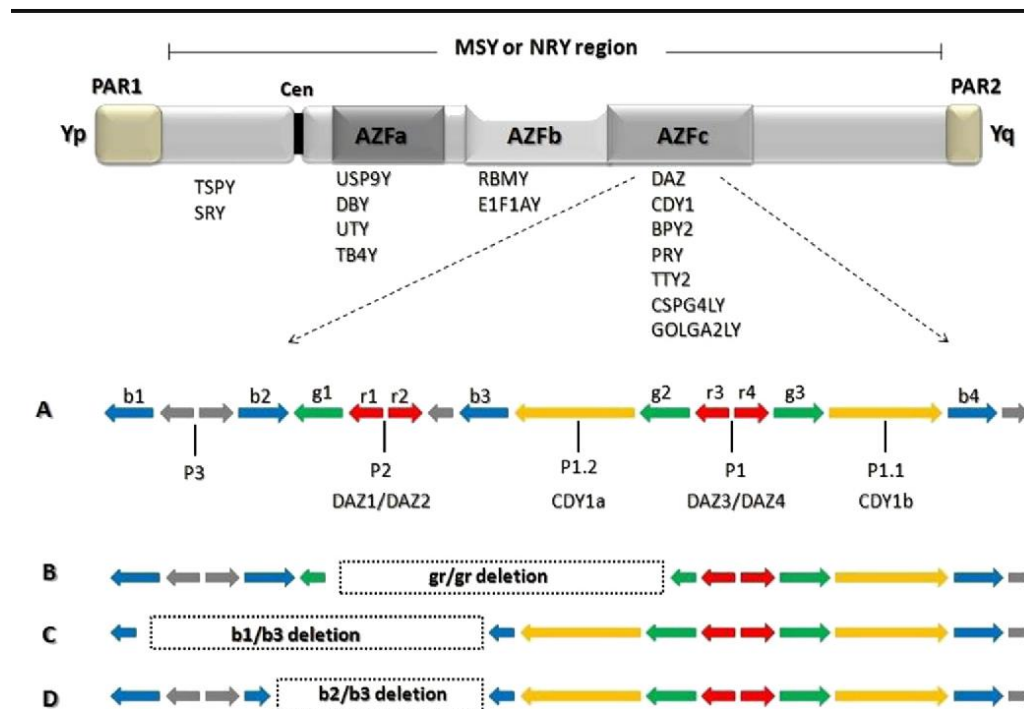


Figure 23 – Représentation du chromosome Y, de la région AZF et des gènes contenus dans cette région (issue de Tahmasbpour et al., 2014).

En A la région AZFc normale est représentée tandis que les microdélétions de cette même région AZFc sont indiquées en B, C et D. Les délétions de ces régions sont impliquées dans des phénotypes d'azoospermie non-obstructive.

L'implication de plusieurs gènes dans la stérilité masculine a ensuite été démontrée dans plusieurs études. C'est le cas notamment de *Scyp3*, une protéine faisant partie des complexes synaptonémaux étudiée dans le chapitre 2 (Yuan et al., 2000). À ce jour, il reste encore de nombreuses causes d'étiologie inconnue et au vu de la sévérité du phénotype, une cause génétique est fortement probable.

2- 2. La globozoospermie

La globozoospermie correspond à la présence de spermatozoïdes dépourvus d'acrosome, et ayant donc une tête globulaire. Plusieurs gènes ont été identifiés comme *DPY19L2*, gène codant pour une protéine de la membrane nucléaire interne des spermatides (Pierre et al., 2012 ; Yassine et al., 2015). Il a été montré qu'il y avait un défaut d'invasion des protéines de transition et donc de recrutement des protamines chez les souris dont ce gène a été invalidé. Plusieurs études montrent que des défauts de compaction du génome sont constatés dans des spermatozoïdes avec des défauts de formation de l'acrosome suggérant un véritable lien entre les deux phénomènes.

2- 3. L'asthénozoospermie et les phénotypes flagellaires

L'asthénozoospermie correspond à une diminution de la mobilité spermatique. Selon l'OMS le diagnostic est obtenu lorsque l'on observe moins de 32% spermatozoïdes mobiles progressifs. Dans un certain nombre de cas s'y associe des malformations flagellaires.

Certains gènes comme celui codant pour la protéine IFT140 impliquée dans le transport intraflagellaire sont également liés à des dyskinésies ciliaires primitives (Perrault et al., 2012) ; Wang et al., 2019). En effet un certain nombre de gènes codent pour des protéines liées à l'axonème qui est une structure présente dans les cils et flagelles (Inaba et Mizuno, 2016). Chez des patients dont les spermatozoïdes correspondent au phénotype MMAF (malformation multiple des flagelles) mais avec un défaut de formation de l'acrosome, un taux important de fragmentation de l'ADN a, là encore, été retrouvé (Ghedir et al., 2014).

3- Les techniques de procréation médicalement assistée (PMA)

Ces techniques consistent à manipuler les gamètes dans le but d'obtenir une fécondation. Si elles ne corrigent pas la cause intrinsèque à l'origine de l'infertilité, elles permettent en revanche dans un certain nombre de cas d'obtenir une grossesse clinique. En France d'après l'agence de biomédecine, pour exemple en 2018, 148 711 tentatives d'AMP ont été recensées et toujours en 2018, selon l'INSEE, un peu plus de 3% des enfants sont nés après une assistance médicale à la procréation.

3- 1. L'insémination artificielle (IA)

Cette technique consiste à injecter des spermatozoïdes dans la cavité utérine après que l'ovulation ait été déclenchée chez la femme. Cela suppose d'obtenir suffisamment de spermatozoïdes mobiles et donc que les anomalies spermatiques soient modérées.

3- 2. La fécondation *in vitro* (FIV)

La FIV consiste à réaliser les étapes de fécondation et les premières étapes de développement embryonnaire en laboratoire. Pour cela, l'ovulation doit être induite chez la femme puis les gamètes de l'homme et la femme prélevés. Les spermatozoïdes préalablement sélectionnés sont ensuite mis en présence des ovocytes recueillis dans un milieu approprié. Les embryons obtenus après fécondation sont cultivés *in vitro* 48H jusqu'au stade 4 cellules ou 5 jours jusqu'au stade blastocyste avant d'être transférés dans la cavité utérine. Les autres embryons seront cryoconservés ou vitrifiés. La FIV est indiquée dans le cas où le nombre de spermatozoïdes mobiles est insuffisant pour une IA ou notamment lors d'infertilités inexplicables.

3- 3. La FIV avec injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (FIV-ICSI)

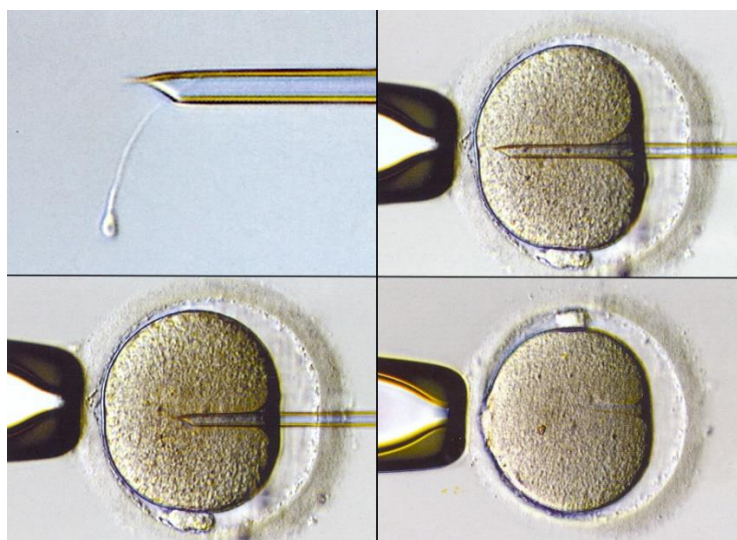


Figure 24 – Injection d’un spermatozoïde dans un ovocyte lors d’un protocole de FIV-ICSI (image issue de l’UNC Fertility clinic, Raleygh, Etats-Unis d’Amérique).

Un spermatozoïde est prélevé à l’aide d’une micropipette puis injecté dans le cytoplasme d’un ovocyte mature qui est maintenu à l’aide d’une micropipette de contention.

La FIV-ICSI rajoute une étape à la FIV classique. Un spermatozoïde est injecté à l’aide d’une micropipette dans le cytoplasme d’un ovocyte mature (en métaphase II) décoronisé (Figure 24). Dans le cas d’une IMSI (injection intracytoplasmique de spermatozoïdes morphologiquement sélectionnés) une étape de sélection du spermatozoïde avec un microscope à fort grossissement a lieu. Les infertilités masculines majeures constituent l’indication de cette technique et notamment si le nombre de spermatozoïdes mobiles et de bonne qualité est faible. Elle peut également être utilisée avec l’obtention de spermatozoïdes testiculaires ou épидидymaires dans les azoospermies obstructives et certaines azoospermies non obstructives.

Ainsi, si ces techniques de PMA ont permis de pallier à un certain nombre d’infertilités sans pour autant résoudre leurs causes, le fait que 50 % des couples n’aient pas d’enfant à la fin du parcours implique que dans un certain nombre de cas les gamètes produits ne sont pas viables pour la fécondation et/ou pour le développement embryonnaire. La compréhension des mécanismes de la gamétogenèse, de sa fine régulation et des multiples gènes impliqués est donc aujourd’hui nécessaire pour pallier à ces infertilités. D’autant que si la protection du génome est compromise suite à un défaut génétique ou épigénétique pendant la gamétogenèse, un conseil génétique peut-être indiqué.

VI. Implication des protéines de transitions (TPs) et des protamines (PRMs) dans l'infertilité masculine

1- Les TPs

Si en 2006 il n'avait pas été retrouvé de mutations des TPs liées à une infertilité masculine (Aoki et al., 2006a), une étude plus récente a retrouvé une mutation de *TP1* chez 15 patients infertiles ayant une varicocèle sur une cohorte de 82 patients (Heidari et al., 2014). Si un lien entre une varicocèle et une mutation de *TP1* est suggéré, la cause exacte n'est pas encore connue d'autant que la mutation se situe au niveau de l'intron et que, de fait, l'effet de celle-ci sur l'expression de *TP1* n'est pas connu. Une autre étude sur des patients atteints de varicocèle a identifié une mutation située dans l'intron de *TP2* cette fois (Heidari et al., 2019).

En outre, une analyse sur une cohorte de 282 patients infertiles a permis de trouver 5 mutations au sein du gène *TP2* et une délétion de 15 nucléotides du promoteur du gène de *TP1* (Miyagawa et al., 2005), mutations qui ne sont pas présentes chez les patients fertiles. Cette délétion dans le promoteur de *TP1* induit une diminution de l'expression de la protéine chez ce patient.

Enfin, une mutation dans la séquence 3'UTR de *TP1* a été retrouvée chez un patient atteint d'oligozoospermie sur une cohorte de 100 patients (Venkatesh et al., 2011).

Pour conclure, peu de corrélations ont été retrouvés dans le cas des TPs, ce qui peut s'expliquer par la redondance entre *TP1* et *TP2*.

2- Les protamines

Les liens entre intégrité du génome paternel, infertilité et réussite en PMA ont été démontrés par le biais de très nombreuses études. Les premières études ont montré que chez certains hommes ayant recours aux techniques de PMA, la PRM2 était absente des spermatozoïdes (De Yebra et al., 1993). Par la suite, une diminution des transcrits de PRM1 a également été montrée chez des hommes infertiles (Steger et al., 2003).

Une déviation du ratio PRM1/PRM2 de 1/1 dans un sens comme dans l'autre a également été corrélée à une mauvaise qualité spermatique et à la réussite en PMA et ce même en FIV-ICSI (De Mateo et al., 2009 ; Aoki et al., 2005 ; Aoki et al., 2006b). Les blastocystes issus de spermatozoïdes d'hommes ayant un ratio PRM1/PRM2 supérieur à 1 sont en effet de mauvaise qualité (Nasr-Esfahani et al., 2004). Il a également été démontré que le ratio PRM1/PRM2 pouvait être augmenté chez des hommes ayant une oligospermie du fait que la PRM2 était diminuée (Mengual et al., 2003).

Si plusieurs études ont supposé que c'est la présence de précurseurs de la PRM2 qui était la cause d'un ratio altéré (De Yebra et al., 1998), cela fut ensuite démontré chez une cohorte de patients infertiles (Torregrosa et al., 2006). Chez d'autres cohortes de patients une déficience complète en PRM2 a été mise en évidence (Carrell et al., 2001 ; Hammoud et al., 2009).

Ainsi, des outils comme la coloration à la chromomycine A3 (CMA3) ont été développés pour évaluer la qualité nucléaire des spermatozoïdes avant leur utilisation pour des techniques de PMA. La CMA3 est un fluorochrome qui se fixe sur les séquences riches en guanosine-cytosine, séquences accessibles lorsque l'ADN est incorrectement protaminé. Il permet donc de détecter indirectement une mauvaise protamination de l'ADN (Bianchi et al., 1993).

Il y a une corrélation entre un pourcentage important de positivité à la coloration à la CMA3 et une diminution des taux de réussite en PMA y compris en FIV-ICSI (Marchiani et al., 2017 ; Nasr-Esfahani et al., 2008 ; Nasr-Esfahani et al., 2005). Par contre, en cas de ratio PRM1/PRM2 altéré si les FIV-ICSI sont réalisées avec des spermatozoïdes testiculaires, le taux de fécondation est meilleur (Sarasa et al., 2020), ce qui va dans le sens qu'un déficit en PRM2 induit des dommages par stress oxydatif à l'ADN durant le transport épидидymaire (Schneider et al., 2020). Inversement, pour les hommes chez qui ce ratio est normal, les résultats en FIV et FIV-ICSI sont meilleurs (Rogenhofer et al., 2013).

Lors de la fécondation, le noyau du spermatozoïde se trouve en G1 alors que celui de l'ovocyte se trouve bloqué en M2. Les facteurs de promotion méiotique n'agissent que sur les histones et pas sur les protamines. Quand les facteurs d'activation du spermatozoïde sont libérés au sein de l'ovocyte, cela résulte en l'activation de la méiose de ce dernier. Pendant l'inactivation de ces facteurs, les protamines sont remplacées par des histones dans le noyau spermatique, l'ovocyte termine sa méiose et les deux se retrouvent donc synchronisées en phase G1. Lorsque le taux de protamination est trop bas, il peut y avoir une condensation prématurée des chromosomes du spermatozoïde, ce qui provoque un échec de fécondation (Nasr-Esfahan et al., 2006 ; Nasr-Esfahan et al., 2007).

L'index de fragmentation de l'ADN (DFI) est un autre outil permettant d'évaluer la qualité nucléaire, il est souvent mesuré grâce à une technique de cytométrie en flux (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA). Plusieurs études ont fait un lien entre un ratio PRM1/PRM2 altéré et un DFI élevé (Aoki et al., 2005 ; Amor et al., 2019). D'autres ont établi un lien entre des anomalies morphologiques des spermatozoïdes et des CMA3 et DFI plus élevés : c'est le cas pour la globozoospermie (Hosseinfar et al., 2015) mais aussi pour les phénotypes MMAF (Atshan et al., 2019). Le DFI est un bon indicateur des chances de grossesse puisqu'un DFI supérieur à 30% réduit de 3 fois les chances d'implantation du blastocyste et un DFI supérieur à 45 % rend la probabilité d'implantation nulle (Guérin et al., 2005). Il a ensuite été directement relié au taux de fécondation et à la qualité embryonnaire post-ICSI (Cebesoy et al., 2006). Finalement, une méta-analyse de 12 études a montré une corrélation entre une déficience en protamines et des dommages à l'ADN (Ni et al., 2016).

De plus, la présence de certaines mutations dans les gènes des protamines a été associée à l'infertilité masculine (Iguchi et al., 2006; Ravel et al., 2007; Gázquez et al., 2008 ; Imken et al., 2009). Une première étude a montré que chez plusieurs patients atteints d'oligozoospermie sur une cohorte de 281 patients, il y avait une substitution d'un acide aminé situé dans la séquence codante (3 patients), dans la région flanquante 5' (4 patients) ou dans la région 3'UTR (1 patient) de la *PRM1* (Ravel et al., 2007). Une deuxième a identifié une substitution d'un acide aminé dans la séquence codante de *PRM1*, une mutation dans la région promotrice de *PRM2* dans une cohorte de 125 patients atteints d'azoospermie ou d'oligozoospermie (Imken et al., 2009). L'étude de C. Gazquez *et al.* sur une cohorte de 220 patients infertiles a permis de mettre en évidence un risque accru de défauts de morphologie des spermatozoïdes et de ratio *PRM1/PRM2* chez les patients porteurs d'un variant (substitution d'un acide aminé) de la *PRM1* (Gazquez et al., 2008). Enfin l'étude d'Iguchi *et al.* reporte la substitution d'un nucléotide dans le gène de la *PRM1* chez 3 hommes infertiles sur une cohorte de 30 (Iguchi et al., 2006).

Enfin, plus récemment, un lien a été montré entre le ratio Histones/PRMs et le taux de fragmentation de l'ADN (Fournier et al., 2018). Cependant, la question de la maturation de la *PRM2* reste essentielle et de nouveaux outils permettant d'en comprendre les conséquences sur la spermiogenèse et l'infertilité sont nécessaires. Une méthode permettant de l'évaluer permettrait de comprendre si un défaut de maturation est impliqué dans certaines infertilités masculines et si oui, à quelle fréquence. D'autant plus que des défauts de déméthylation sont retrouvés sur plusieurs loci soumis à empreinte parentale chez des patients avec un ratio *PRM* altéré (Hammoud et al., 2010) et que les enfants nés à la suite de techniques de PMA ont quatre à huit fois plus de risques d'avoir une maladie liée à l'empreinte parentale (Hattori et al., 2019). Pour rappel, la *PRM2* possède des domaines à doigt de zinc qui participent à l'inhibition de la transcription à la fin de la spermiogénèse.

Une meilleure connaissance de la maturation de la *PRM2* permettrait ainsi de diriger au mieux les couples vers la technique de PMA la plus adaptée, comme l'utilisation ou non de spermatozoïdes testiculaires.

OBJECTIFS DE THESE

Une réorganisation drastique de la chromatine a lieu durant les phases post-méiotiques de la spermatogenèse. Cette réorganisation a pour but, d'une part de compacter le génome afin que celui-ci soit protégé au cours du transit du spermatozoïde avant et pendant la fécondation et d'autre part de préparer un épigénome spécifique permettant un développement embryonnaire normal.

Lors de la spermatogenèse la chromatine nucléosomale subit des transformations majeures puisque la quasi-totalité des histones est remplacée par d'autres protéines plus basiques spécifiques de la lignée germinale mâle, les protéines de « transition » (TPs) et les protamines. Ces dernières s'associent et compactent le génome mâle dans le spermatozoïde. Bien que ce remplacement des histones par les protamines ait été décrit dans la plupart des espèces animales, notamment chez les mammifères, et que cette étape soit cruciale pour la procréation, les mécanismes qui gouvernent ces transitions sont encore très peu connus. Mon laboratoire d'accueil a pour objectif de disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus.

La compréhension détaillée des différentes étapes menant à l'organisation finale du génome dans le spermatozoïde peut améliorer la prise en charge de certaines infertilités. En effet, en moyenne 10% des couples dans le monde sont confrontés à un problème d'infertilité et pour un couple sur deux un facteur masculin est en cause. Il est donc essentiel de mieux appréhender les causes d'infertilité masculine afin que la prise en charge médicale non seulement augmente les chances de conception mais aussi minimise les risques pour la descendance puisqu'il a été montré que le risque de maladies liées à l'empreinte génomique est supérieur chez les enfants issus de techniques de procréation médicalement assistée.

Mes travaux de thèse portent plus spécifiquement sur le rôle fonctionnel de la maturation de la protamine 2. En effet, cette protéine est essentielle à l'organisation du génome dans les spermatozoïdes. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la pré-protamine 2 (pré-Prm2), qui est par la suite clivée. Il est connu que les protéines de transition sont impliquées dans ce clivage, mais l'importance de cette maturation dans la spermatogénèse normale et son implication dans l'infertilité masculine n'ont pas été explorées de manière systématique.

Le premier objectif de mon travail est de réaliser une caractérisation fine de la présence et de la distribution de la pré-Prm2 au cours de la différenciation des cellules germinales mâles chez la souris. Au cours de la spermatogénèse normale, la pré-Prm2 est normalement majoritairement clivée.

Un deuxième objectif est de rechercher systématiquement une accumulation de la pré-Prm2 dans des modèles de souris produits au laboratoire présentant un blocage de la phase post-méiotique de la spermatogenèse. Afin de caractériser cette accumulation dans ces modèles et d'appréhender les mécanismes impliqués dans ce processus, un anticorps spécifique contre la pré-Prm2 a été généré par mon équipe d'accueil avant mon arrivée.

Une étude approfondie sur la pré-Prm2 sera réalisée dans la lignée de souris invalidée pour le gène H2A.L.2, un variant de l'histone H2A spécifique des étapes tardives de la

spermatogenèse, afin de confirmer la co-expression des TPs avec les pré-protamines, de définir plus précisément la chronologie d'expression des pré-protamines 2 et de rechercher un lien entre la maturation de la protamine-2 et la réorganisation de la chromatine durant la spermatogenèse. Le but de ce travail est d'affiner le modèle moléculaire expliquant la transformation des nucléosomes en nucléoprotamines.

Enfin, un dernier objectif pour le travail de thèse, mené dans un cadre collaboratif, sera d'explorer les anomalies de la maturation de la protamine-2 chez des hommes infertiles nécessitant le recours à une FIV-ICSI.

La partie résultats détaillera donc ces objectifs.

RESULTATS

Article: Direct visualization of pre-protamine 2, as a tool to score aberrant histone eviction, male infertility and embryo formation failure

Afin de caractériser la présence et la distribution de la pré-Prm2 au cours de la différenciation des cellules germinales deux anticorps polyclonaux ciblant la partie clivée de la protamine-2 ont été générés au sein de mon laboratoire d'accueil, un dirigé contre la protéine murine et un dirigé contre la protéine humaine (Fig 1A, panneau du haut).

Au cours de ma thèse j'ai utilisé l'anticorps ciblant le précurseur de la Prm2 chez des souris sauvages et chez des modèles de souris où le processus de transition entre histones et protamines est bloqué afin de mieux caractériser le processus de maturation de la Prm2. L'anticorps ciblant la pré-PRM2 humaine a, quant à lui, été utilisé sur des spermatozoïdes d'hommes infertiles.

La partie concernant l'infertilité chez l'homme a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Totonchi du Royan Institute for Reproductive Biomedicine en Iran.

Résumé des résultats

Nous avons dans un premier temps montré sur des extraits protéiques issus de spermatides condensées qu'il y avait une accumulation de pré-Prm2 dans de nombreuses situations (Fig 1B). En effet, dans un modèle où le premier bromodomaine de Brdt a été délété, la pré-Prm2 s'accumule fortement. Dans ce modèle il n'y a pas d'enlèvement des histones et il y a une absence d'assemblage du complexe TPs/Prms. La pré-Prm2 s'accumule également dans un modèle de souris où la protéine TH2B-tag est exprimée, ce qui affecte le processus au moment de la maturation des états transitionnels avec changement des dimères d'histones. Enfin, en utilisant un modèle de souris H2AL.2-KO, nous avons montré une très forte accumulation de pré-Prm2 par immunoblot (Fig 1B) et par immunofluorescence (Fig 2B). Dans ce modèle il n'y a pas d'invasion des nucléosomes par les TPs. Cette accumulation est également présente dans les extraits de spermatozoïdes issus de souris H2A.L.2-KO (Fig 1B).

Ainsi, nous avons pu montrer chez la souris qu'il y a accumulation de précurseur de la Prm2 dès qu'il y a un défaut d'enlèvement des histones ou de maturation des états transitionnels de la chromatine.

Dans un deuxième temps, nous avons montré par immunohistochimie sur des coupes des testicules sauvages que la pré-prm2 était exprimée à partir des spermatides allongées de stade 10 (Fig 2A). Nous avons ensuite tiré profit de l'accumulation de pré-Prm2 dans les spermatides condensées de souris H2A.L.2-KO pour montrer par immunofluorescence que la Pré-Prm2 est présente dans les spermatides allongées et les spermatides en début de condensation (Fig 2B). Si par immunofluorescence nous avons confirmé que la pré-prm2 était exprimée à partir des spermatides de stade 10, cela a également permis de montrer que dans

les stades plus tardifs celle-ci subsistait seulement dans les régions sub-acrosomales (Fig 3). De plus, il y a une remarquable co-expression de la pré-Prm2 avec les TP au sein des spermatides allongées (Fig 4A) suggérant fortement qu'il y a une action simultanée des deux protéines dans le remplacement des histones.

Du fait de la corrélation entre des défauts de la spermiogénèse et la maturation de la Prm2 chez la souris, nous avons ensuite voulu voir si la situation était similaire chez l'homme. Autrement dit, nous voulions savoir si l'anticorps ciblant la forme humaine pouvait être un outil efficace d'évaluation d'infertilités masculines. Pour cela une étude a été réalisée sur une cohorte de 49 patients infertiles de la clinique Royan en Iran. Celle-ci a permis de mettre en évidence que s'il y a présence de pré-PRM2 chez tous les patients y compris chez les hommes fertiles, certains patients infertiles ont un taux de pré-PRM2 élevé dans les spermatozoïdes (Fig 5A-B) et que chez ces mêmes patients le processus d'enlèvement des histones est défectueux (Fig 6 A-C). De plus, nous avons montré par microscopie électronique qu'il y avait un défaut de compaction de l'ADN des spermatozoïdes de ces patients (Fig 6D). Ces spermatozoïdes ont également une mobilité réduite (Fig 6E) et un défaut de formation de l'acrosome (Fig 7). Une maturation correcte de la PRM2 est donc non seulement corrélée à une compaction normale du génome paternel mais aussi à la formation de l'acrosome et à la mobilité spermatique.

Les patients issus de cette cohorte ont eu recours à la FIV-ICSI. Afin d'évaluer si les défauts de compaction de l'ADN liés à un défaut de maturation de la PRM2 pouvaient avoir un impact sur la fécondation, le pourcentage de zygotes au stade 2 cellules issus de la fécondation d'ovocytes par ces spermatozoïdes a été évalué. Cette analyse a montré que lorsque le taux de pré-PRM2 atteint une certaine limite, le taux de fécondation est diminué (Fig 8).

En conséquent, le pourcentage de rétention de pré-PRM2 est un bon indicateur du taux de fécondation et pourrait dans l'avenir être utilisé en clinique humaine.

Ces résultats feront l'objet d'un article scientifique où je suis co-première auteure et vont être soumis pour publication très prochainement.

Direct visualization of pre-protamine 2, as a tool to score aberrant histone eviction, male infertility and embryo formation failure

Maryam Rezaei-Gazik^{1,2+}, Alexandra Vargas³⁺, Amir Amiri-Yekta^{1,3}, Arvand Akbari¹, Vahid Esmaeili⁴, Mohammad Ali Sadighi-Gilani⁵, Poopak Eftekhari-Yazdi⁴, Anne-Laure Vitte³, Sophie Barral³, Yohann Couté⁶, Florent Chuffart³, Sophie Rousseaux³, Saadi Khochbin^{3*}, Mehdi Totonchi^{1,7*}

Affiliations:

¹Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

²Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

³CNRS UMR 5309, Inserm U1209, Université Grenoble Alpes, Institute for Advanced Biosciences, Grenoble 38700, France

⁴Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

⁵Department of Andrology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

⁶ Université Grenoble Alpes; CEA, INSERM, IRIG, BGE, Grenoble 38000, France.

⁷Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

+Co-first authors.

*Correspondence Authors: Saadi Khochbin “saadi.khochbin@univ-grenoble-alpes.fr” and Mehdi Totonchi m.totonchi@royaninstitute.org

Abstract

Histone-to-protamine transition is an essential step in the generation of fully functional spermatozoa in various mammalian species. In human and mouse, one of the two protamine-encoding genes, PRM2, produces a precursor pre-PRM2 protein, which is then processed and assembled. Here we designed an original approach based on the generation of pre-PRM2-specific antibodies to visualize the unprocessed pre-PRM2 by microscopy, flow cytometry and by immunoblotting. Using mouse models with characterized molecular failure in histone-to-protamine replacement, we showed that pre-PRM2 retention is tightly linked to the nucleosome dismantlement process. Additionally, in elongating spermatids, we could demonstrate a perfect pre-PRM2 – transition protein (TP) co-expression in space and time, as well as their physical interaction, indicating the simultaneous rather than successive action of these proteins in histone replacement. Finally, our anti-human pre-PRM2 antibody allowed us to measure pre-PRM2 retention rate in 49 men from infertile couples undergoing ICSI and to shed a new light on the debated relationship between pre-PRM2 retention and sperm parameters. By monitoring 2PN embryo formation, our data indicated that the extent of pre-PRM2 retention rather than pre-PRM2 accumulation *per se* in donor sperms, could indicate failure in early development. Data presented here point to the anti-pre-PRM2 antibodies as valuable tools that could be included in routine monitoring of sperm parameters and as an interesting research tool, to better understand the obscure process of histone-to-protamine transition.

Introduction

Spermiogenesis is marked by an almost genome-scale histone-to-protamine transition (Gaucher et al., 2010; Hoghoughi et al. 2018; Rathke et al. 2013; Bao and Bedford; 2016). Protamines, the final sperm-specific genome-compacting proteins, are small highly positively charged proteins (Lewis et al., 2003). In the human genome two protamine-encoding genes are present producing respectively protamine 1 (PRM1) and protamine 2 (PRM2). PRM1 is synthesized as a mature protein, while PRM2 originate from a precursor pre-PRM2, which undergoes a proteolytic processing leading to several mature PRM2s, differing in their N-terminal by 1 to 4 amino acid residues (Oliva, 2006). This pre-PRM2 processing event removes almost half of the N-terminal residues of the precursor protein (Zhao *et al.*, 2004). PRM2 is not present in all mammalian species but when it is present, it significantly contributes to genome compaction and is necessary for their fertility. In *Prm2*-deficient mice, incomplete DNA packaging, severe acrosome malformation and membrane defects result in sperm immotility and male infertility

(Schneider *et al.*, 2016). Meistrich and colleagues previously observed a significant accumulation of pre-PRM2 in the mouse spermatids in the absence of transition proteins (Shirley *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004*). We have also observed the accumulation of pre-PRM2 in the spermatids of mice lacking the late-expressing H2A histone variant, H2A.L.2. Detailed molecular investigations revealed that in the absence of H2A.L.2, although TPs are synthesized, they are not capable of efficiently invading nucleosomes leading to phenotypes that are reminiscent of those observed in *Tp1/2* ko spermatocytes (Barral *et al.*, 2017). Therefore, collectively these two studies indicate that TPs are somehow required for the processing of pre-PRM2.

In human spermatozoa PRM1 and PRM2 provide roughly equal contribution to sperm genome packaging and a 1:1 ratio has been reported in mature normal spermatozoa. Deviations from this ratio have been reported as an indicator of poor sperm parameters and possibly infertility (de Mateo *et al.*, 2009; Hamad *et al.*, 2014; Ribas-Maynou *et al.*, 2015). With this regard, a decrease in mature PRM2 levels has been frequently observed leading to a deviation from the normal PRM1/PRM2 ratio, probably as a result of incomplete processing of pre-PRM2 (Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2012). However, it is of note that the relationship between pre-PRM2 retention and the fertility related sperm parameters appears to be poorly described. In fact, on one hand it has been reported that pre-PRM2 retention has a negative correlation with sperm count, morphology and motility, hence infertility (De Yebra *et al.*, 1998; Mengual *et al.*, 2003; Torregrosa *et al.*, 2006; de Mateo *et al.*, 2009); on the other hand, a positive correlation between pre-PRM2/PRM2 ratio and pregnancy rate has been observed (de Mateo *et al.*, 2009).

These reports therefore call on a more detailed explanation of the relationship between pre-PRM2 processing and the fertility parameters. For this purpose, specific and convenient tools are required to easily monitor pre-PRM2 accumulation in sperm samples and reconsider the impact of defective pre-PRM2 processing in male infertility with the possibility to introduce critical pre-PRM2 retention threshold values for a more precise evaluation of the functional impact of aberrant pre-PRM2 retention in spermatozoa.

Here, by producing novel tools in the form of antibodies specifically detecting pre-PRM2 before processing, we managed to show that pre-PRM2 retention is tightly linked to the control of nucleosome dismantlement in spermatids and to histone-to-protamine transition.

According to our previous work, as well as the works of other groups, we know that just before their removal, histones become hyperacetylated (Goudarzi *et al.*, 2014), creating binding sites

for the first bromodomain of a testis-specific member of the BET double bromodomain protein family, Brdt. Indeed, our previously published investigations showed that Brdt's first bromodomain is somehow necessary for TPs and PRMs incorporation and subsequent histone removal (Gaucher et al., 2012). Histone hyperacetylation, specifically at H4 lysine 5 and lysine 8, recognized by Brdt, is controlled by a post-meiotic enhancer of CBP/p300 acetyltransferase activity, known as Nut (Shiota et al., 2018). The process of TP assembly itself is dependent on a prior incorporation of a histone variant known as H2A.L.2, expressed in the same cells and at the same time as TPs (Barral et al., 2017). Here, we show that pre-PRM2 first accumulates and colocalizes with TPs due to its physical interaction with TP2. Using three different mouse genetic models, we further show that a failure in TP assembly and histone-to-protamine transition, systematically leads to the accumulation of pre-PRM2. Additionally, using an anti-human pre-PRM2 antibody we report a detailed investigation of pre-PRM2 levels in 49 infertile men candidate for ICSI with different sperm parameters. This antibody also allowed for the measurement of pre-PRM2 retention rate in mature sperms, which was then correlated to two-pronuclear zygote (2PN) formation rate as a parameter for sperm's competence in embryo formation. This tool also allowed us to show the intra-cellular spatial distribution of pre-PRM2, without disturbing the genome compaction and to set up a cytometry-based evaluation of the percentage of mature sperms retaining pre-PRM2.

Overall, these studies not only shed light on the obscure process of early histone replacement in spermatids, but also introduce a convenient tool that could be routinely used in clinics to extend the evaluation of sperm characteristics.

Materials and Methods

Mouse models

Mouse models used in this study were previously generated as described in Shiota et al (2018) for Nut-KO, Barral et al (2017) for H2A.L.2-KO, Montellier et al (2013) for TH2B-tag and Gaucher et al (2012) for Brdt-KO.

Steps 12–16 Condensing spermatids extract preparation

After removal of albuginea, 2 testes were mechanically disrupted using a “motor-driven potter-homogenizer” (3000 rpm/10 strokes) in 5 mL HM1 buffer (1.5 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 0.32 M sucrose, protease inhibitor Complete EDTA free). The volume was completed to 10 mL with HM2 buffer (1.5 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 0.32 M

sucrose, protease inhibitor Complete EDTA free, 0.1% Triton). After centrifugation (1500 rpm, 10 min, 4°C), the pellet was dissolved in 3 mL HM2 buffer. The suspension was sonicated (250J) and centrifuged (1500rpm, 10 min, 4°C) twice. The pellet was washed first with 10 mL of HM2 buffer and then with 10 mL of HM3 buffer (1.5 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8, 1 mM DTT, 0.88 M sucrose, protease inhibitor Complete EDTA free, 0.1% Triton) and finally with 1 mL of HM1 buffer.

Nuclei were lysed in 50µL of urea 8M and then sonicated (200J). After centrifugation (14000rpm, 5 minutes), supernatants were collected.

The proteins of the collected fractions were analyzed by immunoblots.

Spermatozoa head extract preparation

Sperm samples were collected from cauda epididymis in 1mL of DMEM/F12 medium (Life technologies, 11330-032) and suspension was then sonicated (200J). After centrifugation (5000 rpm, 10 min, 4°C), the pellet was dissolved in DMEM/F12 and centrifuged again. The pellet was then resuspended in 500µL of DMEM/F12. A gradient of three 500µL layers was prepared (40, 70 and 90%) with Percoll (Sigma-Aldrich, P1644) and DMEM/F12, cell suspension was carefully placed on the top of the gradient. After centrifugation (4000 rpm, 30 min, 4°C), each layer was collected. Sperm heads were in the 90% layer. The suspension was then diluted in DMEM/F12 and centrifuged (4000 rpm, 10 min, 4°C). Pellet was resuspended in 50µL of a lysis buffer (7,3M urea, 0,6M NaCl, 1M ME) and sonicated (200J). Supernatant was collected after centrifugation (14000 rpm, 10 min).

The proteins of the collected fractions were analyzed by immunoblots.

Spermatogenic cell preparations for in situ analysis

Staged seminiferous tubules: Albuginea of testis was removed and seminiferous tubules were dissected at 4°C in DMEM with 100 mM sucrose. Microdissection and isolation of staged tubules was carried out under a transillumination microscope, as previously reported (Kotaja et al, 2004).

Tubules were cut into 2-mm segments and each segment was ‘squashed’ by pressure between a coverslip and the slide, prefixed 20 s in liquid nitrogen, 10 min in 90% ethanol, air dried, and processed for immunofluorescence.

Testis ‘imprints’: Testes were frozen in liquid nitrogen, cut in two parts and directly applied on slides by apposition. The slides were then incubated in 90% ethanol for 15 min, and air-dried again.

Microscopy and In Situ Immunodetection Immunofluorescence on Germ Cells

In order to permeabilize the cells prepared as described above, the slides were placed in 0.5% saponine, 0.2% Triton X-100, and 1X PBS at room temperature for 15 min.

After a wash of 5 minutes in 1X PBS, the preparations were incubated in 5% dried milk, 0.2% Tween, and 1X PBS at room temperature for 30 min. The primary antibodies were diluted in 1% dried milk, 0.2% Tween, and 1X PBS. The slides were incubated overnight in the primary antibody in a humidified chamber at 4°C and then washed three times for 5 min in the antibodies dilution buffer. The secondary antibodies were diluted at 1:500 in the same buffer and incubated in a humidified chamber for 30 min at 37°C, and then washed as for the primary antibodies. The DNA was counterstained by DAPI, and the slides were mounted in Dako fluorescent mounting medium. Fluorescence images were captured with a confocal microscope (Zeiss LSM 710).

Antibodies

The antibodies used were as follows: rabbit polyclonal anti-Preprotamine2 antibody 1/100, goat polyclonal anti-TP1 antibody 1/50, rabbit polyclonal anti-H2A.L.2 antibody 1/200 (Govin et al, 2007), mouse monoclonal anti-Protamine P2 (Briar Patch Biosciences) 1/100, Lectin PNA Alexa Fluor 647 conjugate 1/50 (Life Technologies).

Preprm2 and TP1 were expressed as GFP tagged proteins in *E. coli* (BL21) and purified using standard procedures. Anti-Preprm2 antibodies were raised in rabbit after four successive injections for a total of 6 mg of Preprm2 peptides. Anti-TP1 antibodies were raised in goat (Covalab, Villeurbanne, France) after four successive injections for a total of 0.6 mg of recombinant proteins. The sera were then purified against recombinant proteins. The secondary antibodies were Alexa 488 or Alexa 568 fluor conjugates (Invitrogen).

Immunohistochemistry

The testes were formalin-fixed overnight, dehydrated and paraffin-embedded. Four mm serial paraffin sections of fixed mouse testes were deparaffinized in toluene, incubated for 30 min in 0.3% H₂O₂ and hydrated through graded series of ethanol 100%, 90%, 70% (2 min each). The sections were then incubated 20 min in sodium citrate 10 mM pH 6 at 99.5°C. The slides were then either counterstained with eosin hematoxylin or subjected to immunohistochemistry activity. The non-specific binding of the antibodies was blocked with 5% dried milk, 1X PBS for 30 min at room temperature. The sections were incubated overnight in a humidified chamber with Preprotamine2 antibody diluted at 1/500 in 0.5% dried milk, 1X PBS. After washes in

0.5% dried milk, 1X PBS during 5 min at RT, a secondary biotinylated antibody was applied for 30 min at RT in a humidified chamber. The sections were then incubated for another 30 min in extravidin conjugated to peroxidase and then washed in 0.5% dried milk, 1X PBS. The final detection step was performed by incubating the slides in DAB (3,3'-diaminobenzidine) at RT. The slides were then washed in water and the acrosomes were stained in red by incubation during 5 min in periodic acid and 15 min in Schiff reagent at RT. The sections were subsequently dehydrated in ethanol 100% and mounted with coverslips using Eukitt. The sections were then observed with a transmission light microscope (Olympus BX41).

TP2-Immunoprecipitation

Purified step 12-16 condensing spermatids obtained from two WT and two H2A.L.2-KO mice testes were lysed (10 min, on ice) in 1000 mL LSDB500 buffer (HEPES 50 mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, KCl 500 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche). After centrifugation (20000 g, 4°C, 10 min), the supernatant was diluted with 1000 mL LSDB0 (HEPES 50 mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche) and used for immunoprecipitation with anti-TP2 polyclonal antibody (Santa Cruz) or an irrelevant antibody (pre-immune goat serum) overnight at 4°C. 25 mL of dynabeads protein G (Invitrogen) were added to the mix and incubated during 30 min at 4°C. The beads were washed 3 times with 500 mL of LSDB250 buffer (HEPES 50 mM pH 8, MgCl₂ 3 mM, KCl 250 mM, Glycerol 20%, NP-40 1%, Complete Protease inhibitor EDTA-free Roche). The bound proteins were migrated on a 4%–12% Bis-Tris SDS-PAGE (NuPAGE Precast gel, Invitrogen), transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond C5, GE).

Mass Spectrometry-Based Proteomic Analyses

The proteins from immunoprecipitation eluates were separated by SDS-PAGE on 4%–12% NuPAGE gel (Invitrogen) and stained with R-250 Coomassie blue. Each gel lanes were cut into six sections that were submitted to in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade), as previously described (Salvetti et al, 2016).

The resulting peptides were analyzed by online nanoLC-MS/MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific). For this, peptides were sampled on a 300 mm x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 mm x 250 mm PepMap C18 column (Thermo Scientific). MS and MS/MS data were acquired using the software Xcalibur (Thermo Scientific).

Peptides and proteins were identified and quantified using MaxQuant (version 1.5.3.30, Tyanova et al, 2016) using the Uniprot database (Mus musculus taxonomy) and the frequently observed contaminant database embedded in MaxQuant. Trypsin was chosen as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Peptide modifications allowed during the search were: carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter, variable) and oxidation (M, variable). Minimum peptide length and minimum number of unique peptides were respectively set to seven amino acids and one. Maximum false discovery rates - calculated by employing a reverse database strategy - were set to 0.01 at peptide and protein levels. The Match Between Run option was enabled with the default settings. Protein intensities were calculated from extracted MS intensities of unique peptides and used to compute iBAQ values (Schwanhäusser et al, 2011).

Proteins identified with less than 2 unique peptides, identified in the contaminant database, additional keratins and immunoglobulin chains were discarded from the list of identified proteins. Proteins were considered as potential partners of TP2 if they were quantified only in the TP2 eluate and not in the negative control eluate, or if their enrichment in the TP2 eluate compared to the negative control eluate was superior to 5 (as calculated by the ratio of the iBAQ values in the corresponding samples).

Patient inclusion and sample preparation

The manner of semen collection and usage in this study was approved by Royan Institute ethics committee under IR.ACECR.ROYAN.REC.1398.140. Accordingly, excessive amount of semen samples collected for ICSI or sperm parameters analysis was used for this study after sample donors were informed and a written and signed consent form was obtained.

Semen samples from 49 ICSI candidates were collected. Out of which, 9 were normozoospermic (N), 7 asthenozoospermic (A), 9 teratozoospermic (T), 18 asthenoteratozoospermic and 6 Oligoasthenoteratozoospermic (OAT). We also obtained samples from 3 fertile donors who have had at least one child last year. The samples were cryopreserved as described previously until use (Hezavehei *et al.*, 2019).

Evaluation of Pre-PRM2 positive sperms using flow cytometry

To determine the percentage of Pre-PRM2 positive sperm in a semen sample, 2×10^6 sperms were counted and washed with phosphate buffer saline (PBS). After centrifugation (300g, 5 min, room temperature) pellet was resuspended in 95% methanol and fixed for 15 minutes at room temperature (RT) followed by washing with PBST (0.2% tween in PBS). Samples were incubated in sodium citrate buffer pH 6.0, for 20 minutes at RT. Sperms were made permeable

with 2% triton X-100 for 10 minutes at RT. Blocking was performed with 5% bovine serum albumin for 1 hour at 4°C. After an overnight incubation with 1:8000 diluted primary Pre-PRM2 antibody in 1% BSA in PBST at 4°C, samples were washed with PBST and incubated with anti-rabbit secondary antibody (ab 150077). Finally, after three times washing with PBST, Pre-PRM2 positive sperms were detected using FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) flow cytometer equipped with standard optics. Raw data were analyzed using Flowing software.

Immunostaining assay

Sperm smears were prepared on 0.01% gelatin coated slides and were air dried. After fixation with 95% ethanol, slides were washed with PBST followed by incubation in sodium citrate buffer pH 6.0, for 20 minutes at RT. In order to make the sperms permeable, slides were placed in 0.2% triton X-100 in PBS for 10 minutes at RT. Smears were blocked in 5% bovine serum albumin for 1 hour at 37°C. The blocked sperms were incubated with a 1:400 dilution of primary antibody (Pre-PRM2 or acrosin) overnight at 4°C, then were washed 3 times with PBST for 5 minutes and the secondary antibody was used in dilution of 1:500 for 1 hour at 37°C. Slides were observed using Olympus BX 51 fluorescent microscope.

Total protein extraction and western blotting

To extract total protein from spermatozoa, 10^7 sperms were washed with PBS and incubated with 50 µl of buffer I (20 mM EDTA, 100 mM Tris base and 1mM PMSF, pH 8) and 50µl of buffer II (6M guanidine hydrochloride and 575 mM DDT) for 30 minutes in darkness at RT. Then, 1 ml of cold ethanol was added and incubated for 3 minutes at -20°C. After centrifugation at 12000g for 10 min at 4°C, supernatant was removed and 70 µl of urea thiourea lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris) was added into sediment and mixed well. After a centrifugation in 12000g for 10 min at 4°C, supernatant was collected for protein assay. For western blotting, 10 micrograms of the total protein per sample was loaded onto 12% SDS polyacrylamide electrophoresis gel and run at 110v, 54mA for 1.5 hour. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue or were blotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a transfer buffer with an extra amount of SDS (1% SDS) at 14v, 48 mA for 13 hours. The membrane was washed with TBST (1% tween in TBS) 3 times for 10 minutes each, and stained with ponceau S dye, then washed again and blocked with 3% non-fat dry milk. After incubation with specific primary antibody (Pre-PRM2) in dilution of 1:500 at 4°C overnight, the membrane was washed 3 times for 10 min each with TBST, and incubated with a dilution of 1:50000 of secondary antibody (ab 97051) for 1 hour at RT. The membrane was

washed 3 times 10 minutes each with TBST. Signals were visualized by incubating the membrane in ECL Plus reagent for 15 seconds to 1 minute. Images were taken using UVI-TEC Cambridge alliance Q9 advanced imaging system. Bands were quantified with Image J software. Sample 1 who was normozoospermic was used as control and pre-PRM2-level fold changes were calculated by dividing the Pre-PRM2/ α -tubulin ratio in sample x by the Pre-PRM2/ α -tubulin ratio in sample #1.

Histone retention assessment by Aniline blue

Unprocessed semen was smeared on a slide, air dried, fixed with Carnoy fixative solution (acetic acid 25% v/v and ethanol 75% v/v) for 20 minutes and stained with 5% aniline blue solution in 4% acetic acid for 5 minutes. Extra amounts of dye were rinsed for 3 times by deep wash in water. Slides were air-dried and checked for normal and abnormal histone retention in spermatozoa using light microscopy (Olympus Inc., Tokyo, Japan). Overall, 200 sperms were analyzed per slide on average. Classification was performed according to Boitrelle et al. (Boitrelle *et al.*, 2011).

Evaluation of sperm protamine deficiency by Chromomycine A3 staining

Semen was smeared on a slide and air-dried. After fixation with 95% ethanol for 15 minutes, Chromomycine A3 staining solution (0.1g/ml) was exerted on slide for 40 minutes in 4°C. Sperms were analyzed using Olympus BX51 fluorescent microscope. Overall, 200 sperms were analyzed per slide on average.

Transmission electron microscopy analysis

Mature sperms were fixed in 0.1 M sodium cacodilate buffer containing 2.5% glutaraldehyde solution for 24 hours at 4°C. After centrifugation, the pellet was put into a warm drop of 1% agar solution. Once cooled, a tiny agar block containing sperm was cut and put in 2.5% glutaraldehyde solution for almost 2 days. The block was transferred into a basket of LEICA EMTP processor and the incubation program was run as 2.5% glutaraldehyde solution for 10 min, followed by washing 3 times with PBS for 7 hours, Fixation with 1% osmium tetroxide for 3 hours, washing two times with DW for 30 minutes, dehydrating with increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 90 % acetone and 3 bathes of 100% acetone) each for 1 hour and acetone-resin with increasing resin concentrations 25, 50 and 75 % and embedding with 100% resin for 3, 4, 6 and 15 hours respectively. Thereafter resin blocks were polymerized at 65°C in two days. 70 nm sections were placed on a grid and stained with 5% uranyl acetate

and 0.4% lead citrate. Finally, micrographs were taken using a Hitachi H7000 TEM (Hitachi Ltd, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

GraphPad prism 7 was employed for statistical analysis. Data were expressed as mean $\pm$ Standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments. Statistical differences were determined through one-way or two-ways analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant when *p*-value was below 0.05.

Results

Failure in nucleosome dismantlement and transitional states maturation leads to the accumulation of pre-PRM2

We took advantage of the processing of pre-PRM2 during spermiogenesis as a unique opportunity to gain new insights into the obscure process of histone-to-protamine replacement and the incorporation of mature PRMs. To this end, we sought a strategy based on the direct visualization of pre-PRM2, thanks to specific antibodies directed against the cleaved part of the mouse pre-PRM2. Using a peptide corresponding to the processed part of mouse pre-PRM2 (Fig.1A), we generated the corresponding antibody. The antibody efficiently detected the transfected GFP-pre-PRM2, with no background signal, as well as a single band at the expected size in condensing spermatids extracts from H2A.L.2 ko mice, previously shown to accumulate pre-PRM2 (Fig.1B). We also developed a similar antibody against the human pre-PRM2. This antibody also detected a single band in extracts from human sperms with no background (Fig. 1B and Fig. 5).

We then used our anti-mouse pre-PRM2 as a tool to gain detailed information on the processing of pre-PRM2 during mouse histone-to-PRM transition.

Previously, it has been shown that nucleosomes bearing hyperacetylation of histone H4 (H4K5acK8ac), is specifically recognized by the first bromodomain (BD1) of Brdt, the testis-specific member of BET family (Morinière et al., 2009; Sasaki et al., 2009; Miller et al., 2016). This histone hyperacetylation specifically takes place in elongating spermatids; where Brdt's BD1 becomes necessary for histone removal and the incorporation of TPs and PRMs (Gaucher, 2012; Shiota et al., 2018). Here, we used extracts from spermatids expressing wild-type Brdt or spermatids from a mutant mouse model expressing a mutated form of Brdt, deleted for its first bromodomain (Shang et al., 2007), where the process of histone-to-PRM transition is impaired (Gaucher et al., 2012). Our antibody clearly revealed an accumulation of pre-PRM2 in the absence of TP/Prm assembly and histone displacement (Fig. 1B, Brdt – Δ BD1).

We then turned our attention to another model system, which expresses a C-terminally tagged endogenous TH2B (Montellier et al., 2013). Interestingly, the tagged TH2B (TH2B-tag), although expressed at the beginning of meiotic differentiation, does not interfere with any essential event during the meiotic divisions and in post-meiotic cells, until the histone-to-protamine replacement stage. However, precisely at this stage, TH2B-tag disturbs the processing of transitional states that appear during nucleosomes dismantlement (Montellier et al., 2013). Our western blot indicates that a failure in the maturation of genome repackaging

transitional states is also associated with the accumulation of non-processed pre-PRM2 (Fig 1B, TH2B tag/+). Finally, we previously showed that in the absence of H2A.L.2, nucleosomes remain resistant to invasion by TPs, leading to the accumulation of pre-PRM2 (Barral et al., 2017). Our antibody confirmed this finding and showed that in the absence of H2A.L.2, a remarkable accumulation of pre-PRM2 is observed (Fig. 1B, H2A.L.2-KO). We also prepared spermatozooids' extracts from wild-type and H2A.L.2 ko mice epididymis and probed the corresponding blots with both an anti-PRM2 and our anti-pre-PRM2 antibodies. Figure 1C shows that both antibodies detect the same accumulating protein in H2A.L.2 ko spermatozoa's extracts and hence demonstrated the persistence of pre-PRM2 in H2A.L.2 ko mature spermatozoa.

Stage-specific pre-Prm2 cleavage and its co-expression with transition proteins

The anti-pre-PRM2 gives the possibility of detecting for the first time, the precise timing of the presence of pre-PRM2 during normal spermatogenesis. An immunohistochemistry on testis sections revealed that the expression of pre-PRM2 occurs at stage X of spermatogenesis (Fig. 2A). We then took advantage of pre-PRM2 accumulation in H2A.L.2 ko spermatogenic cells to better visualize cells expressing pre-PRM2. An immunofluorescence approach on seminiferous tubule preparations clearly revealed the accumulation of pre-PRM2 in elongating and early condensing spermatids (Fig. 2B). The remarkable accumulation of pre-PRM2 in H2A.L.2 ko cells allowed to visualize the very early accumulation of pre-PRM2 at a precise and well-limited location at the cell membrane of late round early elongating spermatids (Fig. 2B H2A.L.2 ko the inset).

We completed these investigations by co-detecting acrosome and pre-PRM2 in seminiferous tubules cell preparations of a wild-type mouse. Figure 3 confirmed the genome-wide appearance of pre-PRM2 in stage 9-10 spermatids, while in more advanced stages, the residual amounts of pre-PRM2 subsists only in the sub-acrosomal areas of the nucleus.

We also used the anti-pre-PRM2 antibody to evaluate the timing of the pre-PRM2 expression with respect to that of TPs. To this end we co-detect pre-PRM2 and TP1 on a suspension of spermatogenic cells taking advantage of the fact that the two antibodies were generated in different species. Figure 4A shows that remarkably, foci of precise co-localization of TP1 and pre-PRM2 could be detected in some elongating spermatids.

To further confirm the association of TPs and pre-PRM2, we analyzed by mass spectrometry-based proteomics the eluates of TP2 co-immunoprecipitations from condensing spermatids

extracts. The immunoprecipitation was performed using extracts from stage 12-16 spermatids from wild-type and H2A.L.2 ko mice. In parallel, immunopurifications were performed using a non-specific antibody (pre-immune goat serum) to account for proteins aspecifically purified. The list of proteins identified as associated with TP2 in both wild-type cell extracts and H2A.L.2 ko condensing spermatids cell extracts are presented in supplementary Table 1. Figure 4B shows that among the identified proteins, the presence of histones as well as pre-PRM2. This Figure also shows the pre-PRM2 peptides identified in this experiment. Interestingly the identified peptides correspond to the processed part of pre-PRM2 (Fig. 4C).

It is of note that as their name indicates, transition proteins are present in a transient manner and then they disappear in condensing spermatids. It is therefore possible that TP and the associated proteins detected here are parts of cargos of cellular proteins that are targeted for either direct degradation or for elimination in residual bodies, and hence could be recovered together after immunoprecipitation (supplementary Table 1).

Pre-PRM2 retention and human male infertility

The use of mouse models described above, showed a tight correlation between an aberrant pre-PRM2 accumulation and the impairment of spermiogenesis at the histone eviction step. Indeed, the three studied models presenting characterized defective histone-to-protamine replacement resulted in the accumulation of pre-PRM2. These observations suggested that a human pre-PRM2 antibody could be a valuable tool to identify infertile men presenting a defective spermiogenesis, precisely due to the impairment of TP-mediated pre-PRM2 processing and histone replacement and genome compaction (Fig. 4B).

Accordingly, we recruited 49 males with infertility and 3 fertile donors to test the ability of our anti-hPre-PRM2 antibody to detect cases of aberrant pre-PRM2 retention. The infertile patients of our cohort were classified as follows: Asthenoteratozoospermia (A), Teratozoospermia (T), Asthenotertozoospermia (AT), Oligoasthenozoospermia (OAT).

The conventional sperm parameters of these patients are summarized in the Table 1. No significant differences were observed between groups' age, semen volume and sperm vitality ($p < 0.05$). However, there were remarkable differences in morphology, motility and concentration as described by the WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (WHO, 2010).

We used our specific anti-hPre-PRM2 antibody to monitor the levels of pre-PRM2 protein in sperm extracts from different patient groups by immunoblotting. Data showed that pre-PRM2 could be detected in mature sperms of all participants, even in the fertile ones (Fig. 5A). The

average $\pm$ SEM levels of pre-PRM2 in Fertile (F), Normozoospermia, Asthenozoospermia, Teratozoospermia, Asthenoteratozoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia groups were 0.541 ± 0.062 , 1.398 ± 0.212 , 2.587 ± 1.173 , 2.077 ± 0.473 , 2.984 ± 0.500 , and 2.214 ± 1.257 respectively (Fig. 5A).

Pre-Prm2 levels in fertile and normozoospermic groups were separated in a lower and more limited range (from 0.46 to 2.45) than the other abnormal conditions (from 0.25 to 9.31), but there was no statistically significant difference between these two groups. We considered the average of the fertile and normozoospermic pre-PRM2 levels, 1.18, as a reference of pre-PRM2 levels in normal sperm samples.

To better categorize the study samples with different levels of pre-PRM2, we divided them into 3 categories: in the groups with abnormal sperm conditions, there were some patients with very high amount of pre-PRM2, showing an obviously sharp band of pre-PRM2 marked by a star in Figure 5A. These were considered samples with very high pre-PRM2 levels, whereas the pre-PRM2 levels in fertile and normozoospermic patients were considered as low and those in between these two categories were considered as moderate.

To determine the percentage of pre-Prm2 positive sperms, we performed flow cytometry for three different characteristic patients' samples with low, moderate, and very high levels of pre-PRM2. The percentages of pre-PRM2 positive sperms for the mentioned patients were 1.81 %, 18.40 % and 68.19 % respectively (Fig. 5B).

In situ immunofluorescent study of sperms revealed that in patients with very high levels of pre-PRM2, this protein is usually stuck around the nucleus (Fig. 5C). In some sperms, we also observed pre-PRM2 accumulation in nuclear sub-acrosomal and equatorial domains (Fig. 5C). However, there was no correlation between the amounts of aberrant pre-PRM2 accumulation and its localization. Indeed, as can be seen in Figure 5C three different intracellular localizations could be observed for three very high pre-PRM2 expressing sperm samples.

Correlation between pre-PRM2 retention, DNA compaction and motility in patients with high levels of pre-PRM2 and sperm quality for fertilization

Chromomycin A3 (CMA3) staining is a known indicator of protamine deficiency. Therefore, to assess the relationship between the accumulation of pre-PRM2 and deficiency in the genome protamination, pre-PRM2 immunostained slides were also stained with CMA3 (Fig. 6A). Quantification of images showed that CMA3 positive sperms are remarkably more abundant in moderate and very high pre-PRM2 samples (mean $\pm$ SD: 37.29 ± 5.50 , 97.33 ± 0.63 , $n=3$) (Fig. 6C) in comparison with low Pre-PRM2 samples (mean $\pm$ SD: 24.42 ± 1.24 , $n=3$).

To determine whether histone eviction was defective, we stained low, moderate and high pre-PRM2 samples with aniline blue. Analysis of more than 200 sperms per slide showed that histones were not evicted well in moderate and high pre-Prm2 samples (mean $\pm$ SD: 43.25 $\pm$ 4.35, 78.99 $\pm$ 5.71, n=3) compared to low pre-Prm2 samples (mean $\pm$ SD: 14.26 $\pm$ 0.38, n=3) (Figure 6B, C).

To investigate possible unprocessed pre-PRM2 effects on DNA compaction, the genome texture was analyzed using transmission electron microscopy (TEM). Images represent a uniform texture of the genome in sperms with low pre-PRM2 levels, but there were many translucent regions in those with high pre-PRM2 levels implying incomplete DNA compaction (Fig. 6D).

Since the presence of pre-Prm2 was detected in immotile mouse sperms (Zhao *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2016), mean percentage of progressively and non-progressively motile sperms $\pm$ SEM for all very high pre-PRM2 samples acquired in this study, was calculated as 12.46 $\pm$ 2.51% and 20.77 $\pm$ 3.29% respectively (Fig. 6E). These values were noticeably lower than expected (32 and 40%) for a normal semen according to WHO 2010 semen criteria (WHO, 2010).

Since several previously published studies revealed a direct relationship between acrosome formation and histone-to-protamine transition (Yassine *et al.* 2015), we examined acrosome formation in the very high pre-PRM2 sperm group following the detection of acrosin, an acrosome specific protein, using acrosin antibody. Images showed that high pre-PRM2 sperms present defective acrosome formation while normal sperms show a normal extend acrosome (Fig. 7).

High pre-Prm2 levels were related to lower 2PN fertilization rate

The 49 patients described above were also candidate for intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI). To evaluate the relationship between pre-PRM2 retention on embryo formation, post-ICSI, -2PN formation was considered as an early success in fertilization ability of sperms. The pre-PRM2 levels/values (left vertical axes of the chart, Fig. 5A) of 49 samples were sorted from low to high and have been shown by a thick red line chart (Fig. 8). 2PN fertilization rate was calculated through dividing the number of 2PN by the number of injected oocytes for each ICSI cycle and values are shown in bars (Fig. 8A). The average 2PN formation success rate has been reported 70-80% independent from sperm's functionality (Neri *et al.*, 2014). Simultaneous comparison of the two charts shows that when pre-PRM2-level fold change is 5 or more, 2PN fertilization rate is deteriorated. We then make sure that the observed relationship between 2PN

formation success rate and the level of pre-PRM2 accumulation is statistically significant (Fig. 8B).

These observations suggested that increases in pre-PRM2 levels is accompanied by impairment of 2PN formation. The characteristics of women whose oocytes were retrieved for ICSI in groups with different levels of pre-PRM2 are presented in Table 2 showing that all the women enrolled in this study present very comparable characteristics.

Discussion

The processing of pre-PRM2 in the course of invasion of nucleosomes by non-histone proteins, TPs and PRMs, provides a unique opportunity to study the obscure process of histone-to-protamine replacement. Indeed, although previous publications reported the occurrence and modulation of pre-PRM2 cleavage during normal and defective spermiogenesis (Zhao et al., 2004; Barral et al., 2017), and its impact on sperm quality and male fertility was considered (Francis et al., 2014; de Mateo et al., 2011), until now, pre-PRM2 has been detected only in protein extracts. By generating specific antibodies against the cleaved part of human and mouse pre-PRM2s, we could directly visualize the precursor protein *in situ* by microscopy and flow cytometry, as well as in protein extracts. This approach allowed us to report unprecedented observations on the accumulation of the pre-PRM2 and its relationship with transition proteins' expression. Our data revealed that pre-PRM2 is co-synthesized with transition proteins and strictly colocalize in the nucleus. A co-immunopurification strategy coupled to a mass spectrometry-based proteomic approach showed that TPs (represented by TP2) physically interact with the unprocessed part of pre-PRM2 as well as with histones and many other cellular proteins. Since TPs are transiently expressed and they disappear in condensing spermatids, it is possible that our immunoprecipitation-proteomics of TPs detect the protein cargos that are discarded, directly degraded or eliminated through residual bodies (Fig. 4B).

The use of anti-mouse pre-PRM2 antibody confirmed the dramatic accumulation of pre-PRM2 in spermatids lacking H2A.L.2 histone variant. We could previously show that in these spermatids, nucleosomes resist invasion by TPs and hence the produced TPs remain non-functional (Barral et al., 2017). The fact that in these cells, as well as in *Tp1/Tp2* double ko spermatids (Shirley et al., 2004; Zhao et al., 2004), a dramatic accumulation of pre-PRM2 is observed, suggesting that invasion of nucleosomes by TPs is a requirement for pre-PRM2 processing (Fig. 4B). To precisely characterize the relationship between nucleosome transformation and pre-PRM2 processing, we included two other genetic models and monitored

the accumulation of pre-PRM2 in the spermatogenic cells of these models. Our first model expresses a mutated form of Brdt, the testis-specific of BET double bromodomain factor, lacking its first bromodomain (Shang et al., 2007). Our previous structural and molecular studies showed that Brdt's first bromodomain, BD1, recognizes histone H4 bearing double acetyl groups at K5 and K8 (H4K5acK8ac) (Morinière et al., 2009). H4K5acK8ac culminates at the time of histone eviction due to a Nut-dependent activation of CBP/p300 (Shiota et al., 2018). Histone eviction itself requires Brdt's BD1 (Gaucher et al., 2012). Indeed, we successfully showed that in spermatids expressing a mutated Brdt lacking its first bromodomain, TPs and PRMs are unable to replace histones (Gaucher et al., 2012). Interestingly, the use of our anti-pre-PRM2 demonstrated that the impairment of this acetylation-dependent histone replacement is also associated with dramatic accumulation of pre-PRM2. Finally, we also used another mouse model expressing a C-terminally tagged endogenous TH2B (TH2B-tag). This testis-specific H2B variant is expressed all through spermatogenesis and finally dimerizes with the H2A.L.2, just at the time of nucleosomes invasion by TPs (Govin et al., 2007; Barral et al., 2017). Nucleosomes bearing TH2B-tag also resist full histone displacement upon their invasion by TPs and PRMs (Montellier et al., 2013). Interestingly, here the use of our anti-pre-PRM2 antibody also showed an accumulation of pre-PRM2 in the condensing spermatids. Altogether these data precisely point to the invasion of nucleosomes by TPs and the full displacement of histones, as a requirement for the processing of pre-PRM2.

These data therefore further support the hypothesis that TPs and PRMs act simultaneously on nucleosomes in the process of histone-to-PRM transition, a hypothesis which we proposed earlier (Barral et al., 2017; Khochbin and Ward, 2018).

Based on these data, we can also propose that human spermatozoa retaining pre-PRM2 are affected by a defective transformation of nucleosomes occurring in elongating and condensing spermatids.

To develop a translational research based on these findings, we turned our attention to infertile men's spermatozoa to evaluate the interest of our anti-pre-PRM2 antibody in clinics.

In this study we have shown that pre-PRM2 is present in samples from fertile donors and normozoospermic patients as it had been reported by a number of previous studies in (de Mateo et al., 2011). As in the case of other studies, we found that samples with high levels of pre-PRM2 are more frequently observed in poor sperm quality conditions such as asthenozoospermia, teratozoospermia, athenoteratozoospermia and oligoathenoteratozoospermia, in comparison with fertile or normozoospermic groups. The

values of pre-PRM2 levels in fertile and normozoospermic groups were separated in a lower and more limited range than the other conditions.

Similar results were obtained by other groups reporting that the levels of Pre-Prm2/P2 ratio were correlated negatively with sperm count, motility and normal morphology (Aoki *et al.*, 2006b; Torregrosa *et al.*, 2006).

It is notable that our approach based on the generation of anti-pre-PRM2 allowed us to employ precise normalization procedure through both α -tubulin and an internal control (N1) in quantifying pre-PRM2 retention, while in almost all previous works, the experiments were done using acid-urea PAGE (Khara, 1997; Nasr-Esfahani *et al.*, 2004; Aoki *et al.*, 2006b, 2006a; Torregrosa *et al.*, 2006; Hammadeh *et al.*, 2010; García-Peiró *et al.*, 2011; Jodar *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2011, 2014; Hamad *et al.*, 2014). Therefore, this immunoblotting and comparative quantification of pre-PRM2 retention in sperm allows for a comparative pre-PRM2 retention measurement of sperm samples, which could provide a more rational basis for other correlative studies. For instance, we could monitor the early embryo formation success rate after ICSI as a function of pre-PRM2 accumulation (fold over the control samples). Our approach suggested that high rate of pre-PRM retention (score >5) could be associated with 2PN embryo formation. However, some cases of sperms with lower pre-PRM2 scores showed failure in sustaining 2PN embryo formation, indicating the high pre-PRM2 retention would not be the only factor associated with the inability of the male genome to sustain embryonic development.

It is noteworthy that although de Mateo and colleagues reported a positive correlation between Pre-Prm2/P2 proportion and the implantation rate for both of IVF and ICSI as well as pregnancy outcome (de Mateo *et al.*, 2009), they also reported that two samples with extremely elevated Pre-Prm2/P2 levels completely failed in fertilization. It is probable that in these two samples pre-PRM2 retention could be similar to our 6 high pre-PRM2 samples that are incapable of ensuring 2PN formation upon ICSI.

Incomplete DNA compaction visible in TEM images along with the defective histone-to-protamine exchange evidenced by CMA3 and aniline blue staining, may be the reasons behind the low embryo formation rate for the patients with high levels of pre-PRM2. This conclusion is in line with previous studies demonstrating that pre-PRM2 accumulation is associated with incomplete DNA compaction, predisposing the genome to chemical and physical damages, which could potentially result in infertility (Yu *et al.*, 2000; Torregrosa *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2011, 2014; Barral *et al.*, 2017).

Overall, the specific approach described here based on the production of specific antibodies against the cleaved parts of pre-PRM2 proved to shed light on the process of histone-to-

protamine replacement. Additionally, our studies including a cohort of infertile men showed that the antibody can be used to monitor sperm quality, by immunodetection encompassing immunofluorescence, FACS and immunoblotting to better characterize the sperm parameters of infertile men candidate for ICSI.

Legend to Figures

Figure 1: Design of anti-Pre-PRM2 antibodies and Pre-PRM2 accumulation in mouse models with defective histone-to-protamine replacement.

A) Synthetic peptides corresponding to the cleaved parts of mouse and human Pre-PRM2 were used to generate the anti-mouse and anti-human Pre-PRM2 respectively antibodies (Scheme). The antibodies were validated following the expression of GFP-mPre-PRM2 (left) and GFP-hPre-PRM2 (right) in COS7 cells and detection of the corresponding proteins by immunoblotting. Cells expressing GFP alone was used as control.

B) Stage 12-16 spermatids were isolated from the testes of the indicated mouse models and the corresponding extracts were probed with the anti-mPre-PRM2 antibody. The blot was then successively probed by anti-TP2 and anti-H3 antibodies.

C) Extracts were prepared from epididymal sperm preparations from wild-type mice or H2A.L.2 ko mice and probed by anti-mPre-PRM2 and anti-PRM2 as indicated.

Figure 2: Pre-Prm2 expression in post-meiotic cells.

A) Paraffin-embedded testes from wild type mouse testis were used to obtained histological preparations which were probed with the anti-mPre-PRM2 antibody. Scale bar = 10 μ m.

B) Cells from seminiferous tubules preparations from wild-type and H2A.L.2 ko mice were used to detect Pre-Prm2. Two different stages are shown. Scale bar = 10 μ m.

Figure 3: Stage-specific accumulation of pre-PRM2.

Cells from seminiferous tubules from wild-type and H2A.L.2 ko mice were used to detect Pre-Prm2 and lectin. Fields were ordered to visualize spermatogenic cells from early (top) to late stages (bottom). Scale bar = 1.25 μ m

Figure 4: Co-localization of Pre-PRM2 and transition proteins.

A) Cells from testis squash preparations from wild-type mice were used to co-detect TP1 and Pre-PRM2. Scale bar = 3 μ m.

B) Condensing/condensed spermatids (stage 12-16) extracts from wild-type and H2A.L.2 ko tests were immunoprecipitated with an anti-TP2 or an irrelevant antibody. Mass spectrometry was then used to identify all the associated proteins.

The identified histones specifically immunoprecipitated with the anti-TP2 and not with the irrelevant antibody are indicated.

C) The identified pre-PRM2 peptides specifically found in the anti-TP2 immunoprecipitates are highlighted in yellow.

Figure 5: Pre-Prm2 expression level in fertile and infertile patients.

A) Western blot analysis of the levels of Pre-Prm2 protein with anti Pre-Prm2 antibody on whole sperm protein extracts in 49 males were subjected to infertility and 3 fertile donors. The classification is according to WHO 2010 criteria. F: Fertile, N: normozoospermia, A: Asthenoteratozoospermia, T: Teratozoospermia, AT: Asthenotertozoospermia, OAT: Oligoasthenozoospermia and Quantification of WB bands by densitometry.

- B) Flow cytometry analysis of three semen samples shows the percentage of Pre-Prm2 positive sperms surrounded with a box.
- C) Three different localization of Pre-Prm2 at the post-acrosomal (the first row), equatorial (the second row) and peri-nuclear (the third row) status of human mature spermatozoa. Scale bar = 10 μ m.

Figure 6: Correlation between pre-PRM2 retention, DNA compaction, and motility in patients with high levels of pre-PRM2 and sperm quality for fertilization

- A) Co-staining of sperms from 3 patients with three different levels of Pre-Prm2 expression. Dime yellow represents normal DNA compaction and bright yellow represents incomplete DNA compaction. Red represents Pre-Prm2 and in co-staining with DAPI (blue) and CMA3 (yellow) exhibit the gray color in the last column. Scale bar = 20 μ m.
- B) Aniline blue staining, the dark blue implicate on histone retention and the light blue implicated on histone eviction. Scale bar = 20 μ m.
- C) Quantification of slides related to A and B, by counting at least 200 sperms per slide.
- D) Ultrastructure of sperm chromatin of patients with two different levels of Pre-Prm2. A sample with low levels of Pre-Prm2 displays a uniform texture but the one with a high levels of Pre-Prm2 displays a granular (showed with a star) texture. Scale bar = 1 μ m.
- E) Percentage of Progressive motility (PM) and non-progressive motility (NPM) in sperms with high levels of Pre-Prm2 (mean $\pm$ SEM)

Figure 7: Acrosome structure in low and high pre-Prm2 expressing human spermatozoa samples.

Acrosome structure can be seen using acrosin antibody in green color (Left) and with a higher magnification (Right). Scale bar= 20 μ m.

Figure 8: Correlation between the Pre-Prm2 levels and 2PN formation.

- A) The Pre-Prm2 expression levels/values (left vertical axes of chart) of 49 samples were arranged from less to more values and have been shown by a thick red line chart. 2PN fertilization rate was calculated through dividing the number of 2PN by the number of injected oocyte for each cycle of patient and values are shown in bars.
- B) Correlation curve between 2PN formation success rate and the level of pre-PRM2 accumulation

Acknowledgements

Funding

SK laboratory is also supported by ANR Episperm4 program and by the “Université Grenoble Alpes” ANR-15-IDEX-02 LIFE and SYMER programs. Additional supports were from: the French National Cancer Institute (INCa) and the French Institute for Public Health Research (IreSP) (INCa_13641). This research also benefited from Plan Cancer Pitcher and from MSD Avenir ERICAN programs. SK laboratory is also supported by Fondation ARC PGA program N° RF20190208471. AV is a recipient of the CNRS handicap PhD program fellowship.

A part of this study was supported by grants from Royan Institute in Tehran.

Conflict of interest

None declared.

References

- Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006a;27:890–898.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006b;86:1408–1415.
- Bao J, Bedford MT. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* 2016;151:R55-70.
- Barral S, Morozumi Y, Tanaka H, Montellier E, Govin J, Dieuleveult M de, Charbonnier G, Couté Y, Puthier D, Buchou T, *et al.* Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol Cell* 2017;66:89-101.e8.

- Boitrelle F, Ferfour F, Petit JM, Segretain D, Tourain C, Bergere M, Bailly M, Vialard F, Albert M, Selva J. Large human sperm vacuoles observed in motile spermatozoa under high magnification: nuclear thumbprints linked to failure of chromatin condensation. *Hum Reprod* 2011;**26**:1650–1658.
- Depa-Martynow M, Jedrzejczak P, Pawelczyk L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;**45 Suppl 1**:S85-89.
- Francis S, Yelumalai S, Jones C, Coward K. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camb)* 2014;**17**:80–89.
- García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Oliver-Bonet M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Jones C, Coward K, Gosálvez J, Benet J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil Steril* 2011;**95**:105–109.
- Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte A-L, *et al.* Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 2012;**31**:3809–3820.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 2010;**277**:599–604.
- Goudarzi A, Shiota H, Rousseaux S, Khochbin S. Genome-scale acetylation-dependent histone eviction during spermatogenesis. *J Mol Biol* 2014;**426**:3342–3349.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, *et al.* Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007;**176**:283–294.

- Hamad MF, Shelko N, Kartarius S, Montenarh M, Hammadeh ME. Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology* 2014;**2**:666–677.
- Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum Reprod* 2010;**25**:2708–2720.
- Hezavehei M, Mohseni Kouchesfahani H, Shahverdi AH, Sharafi M, Hosseini Salekdeh GH, Eftekhari-Yazdi P. Induction of Sublethal Oxidative Stress on Human Sperm before Cryopreservation: A Time-Dependent Response in Post-Thawed Sperm Parameters. *Cell J* 2019;**20**:537–543.
- Hoghoughi N, Barral S, Vargas A, Rousseaux S, Khochbin S. Histone variants: essential actors in male genome programming. *J Biochem* 2018;**163**:97–103.
- Jodar M, Oriola J, Mestre G, Castillo J, Giwercman A, Vidal-Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. Polymorphisms, haplotypes and mutations in the protamine 1 and 2 genes. *Int J Androl* 2011;**34**:470–485.
- Khara KK, Vlad M, Griffiths M, Kennedy CR. Human protamines and male infertility. *J Assist Reprod Genet* 1997;**14**:282–290.
- Khochbin S, Ward WS. Chromatin Structure: Composition and Function During Spermiogenesis. In Skinner MK, editor. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)* [Internet] 2018;, p. 347–351. Academic Press: Oxford Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383647219>.
- Kotaja N, Kimmins S, Brancorsini S, Hentsch D, Vonesch J-L, Davidson I, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Preparation, isolation and characterization of stage-specific spermatogenic cells for cellular and molecular analysis. *Nat Methods* 2004;**1**:249–254.

- Lewis JD, Song Y, Jong ME de, Bagha SM, Ausió J. A walk though vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma* 2003;**111**:473–482.
- Mateo S de, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2009;**91**:715–722.
- Mateo S de, Ramos L, Boer P de, Meistrich M, Oliva R. Protamine 2 precursors and processing. *Protein Pept Lett* 2011;**18**:778–785.
- Mengual L, Ballescà JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 2003;**24**:438–447.
- Miller TCR, Simon B, Rybin V, Grötsch H, Curtet S, Khochbin S, Carlomagno T, Müller CW. A bromodomain-DNA interaction facilitates acetylation-dependent bivalent nucleosome recognition by the BET protein BRDT. *Nat Commun* 2016;**7**:13855.
- Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Héry P, Curtet S, *et al.* Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev* 2013;**27**:1680–1692.
- Morinière J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-López M, Curtet S, Vitte A-L, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 2009;**461**:664–668.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F. Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2004;**9**:652–658.
- Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* 2014;**55**:24–37.
- Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006;**12**:417–435.

- Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1839**:155–168.
- Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Martínez-Heredia J, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Navarro J, Benet J. Nuclear degraded sperm subpopulation is affected by poor chromatin compaction and nuclease activity. *Andrologia* 2015;**47**:286–294.
- Salvetti A, Couté Y, Epstein A, Arata L, Kraut A, Navratil V, Bouvet P, Greco A. Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic Approaches. *J Proteome Res* 2016;**15**:1659–1669.
- Sasaki K, Ito T, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M. Real-time imaging of histone H4 hyperacetylation in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:16257–16262.
- Schneider S, Balbach M, Jan F Jikeli null, Fietz D, Nettersheim D, Jostes S, Schmidt R, Kressin M, Bergmann M, Wachten D, *et al.* Re-visiting the Protamine-2 locus: deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile. *Sci Rep* 2016;**6**:36764.
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011;**473**:337–342.
- Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 2007;**134**:3507–3515.
- Shiota H, Barral S, Buchou T, Tan M, Couté Y, Charbonnier G, Reynoird N, Boussouar F, Gérard M, Zhu M, *et al.* Nut Directs p300-Dependent, Genome-Wide H4 Hyperacetylation in Male Germ Cells. *Cell Rep* 2018;**24**:3477-3487.e6.

- Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* 2004;**71**:1220–1229.
- Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**:724–734.
- Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, Emery B, Carrell DT. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;**29**:904–917.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006;**21**:2084–2089.
- Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 2016;**11**:2301–2319.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241547789>.
- Yassine S, Escoffier J, Martinez G, Coutton C, Karaouzène T, Zouari R, Ravanat J-L, Metzler-Guillemain C, Lee HC, Fissore R, *et al.* Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development. *Mol Hum Reprod* 2015;**21**:169–185.
- Yebra L de, Ballescà JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998;**69**:755–759.

Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:4683–4688.

Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 2004;**38**:200–213.

Figure 1

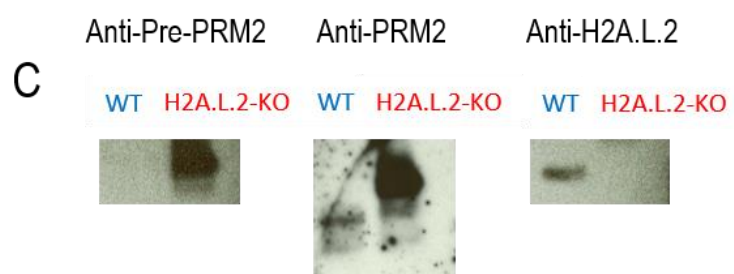
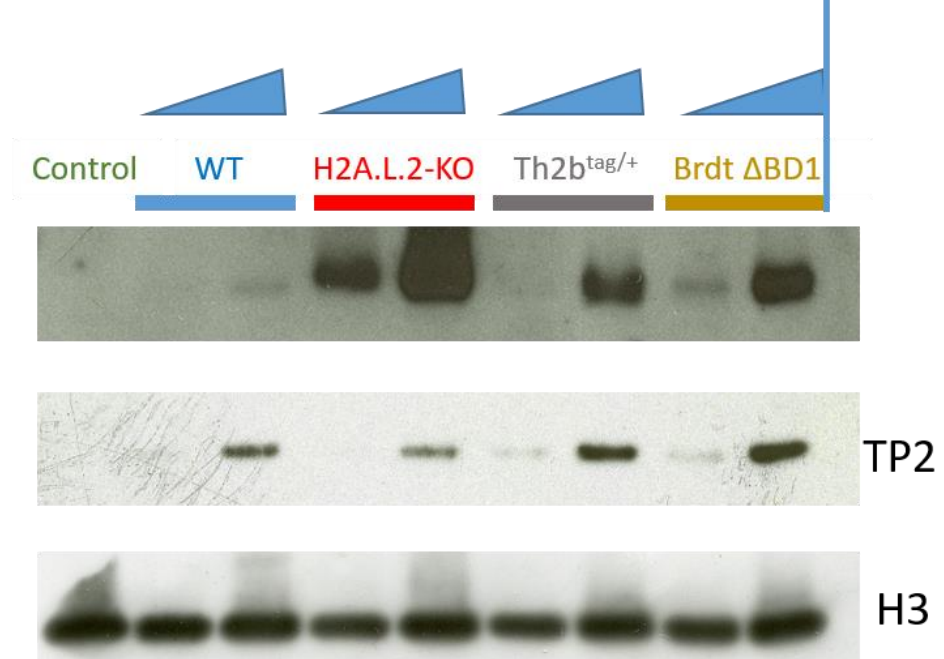
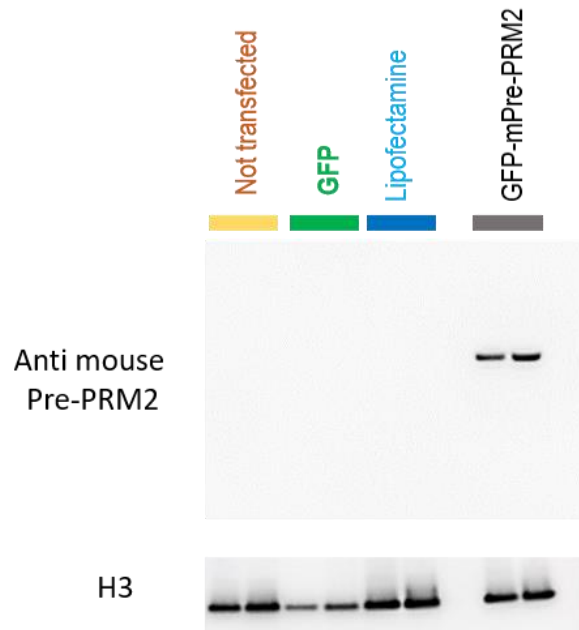
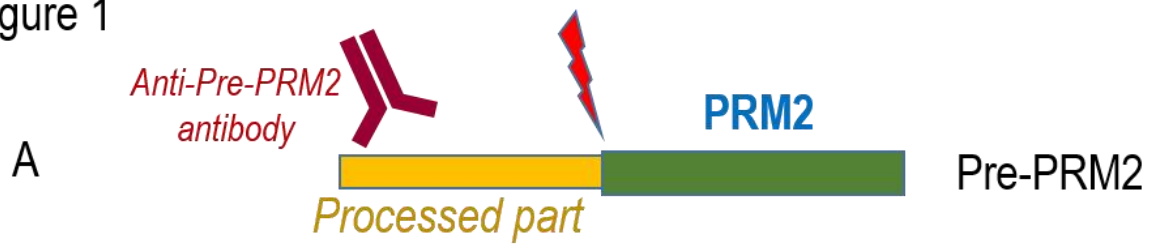


Figure 2

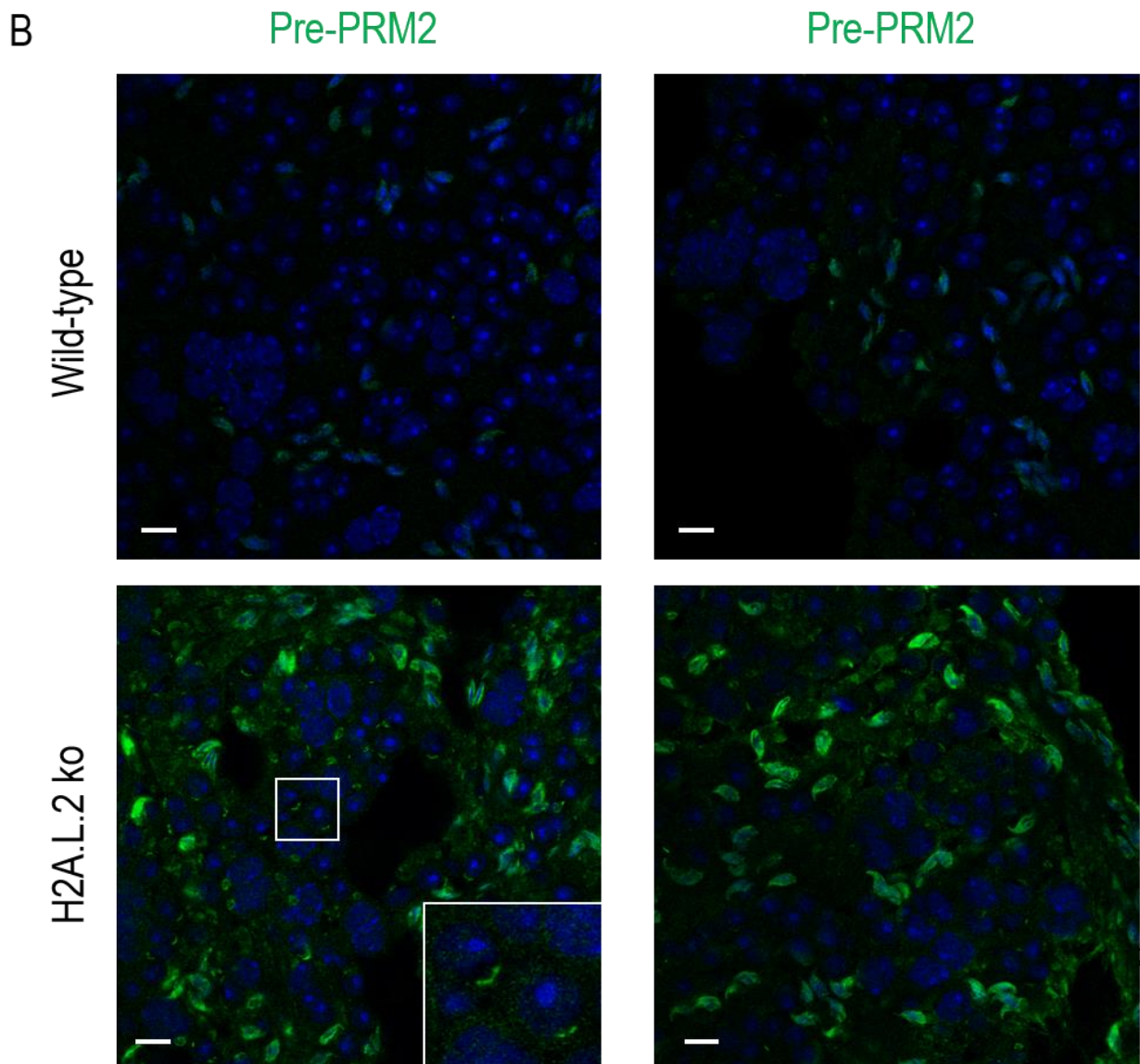
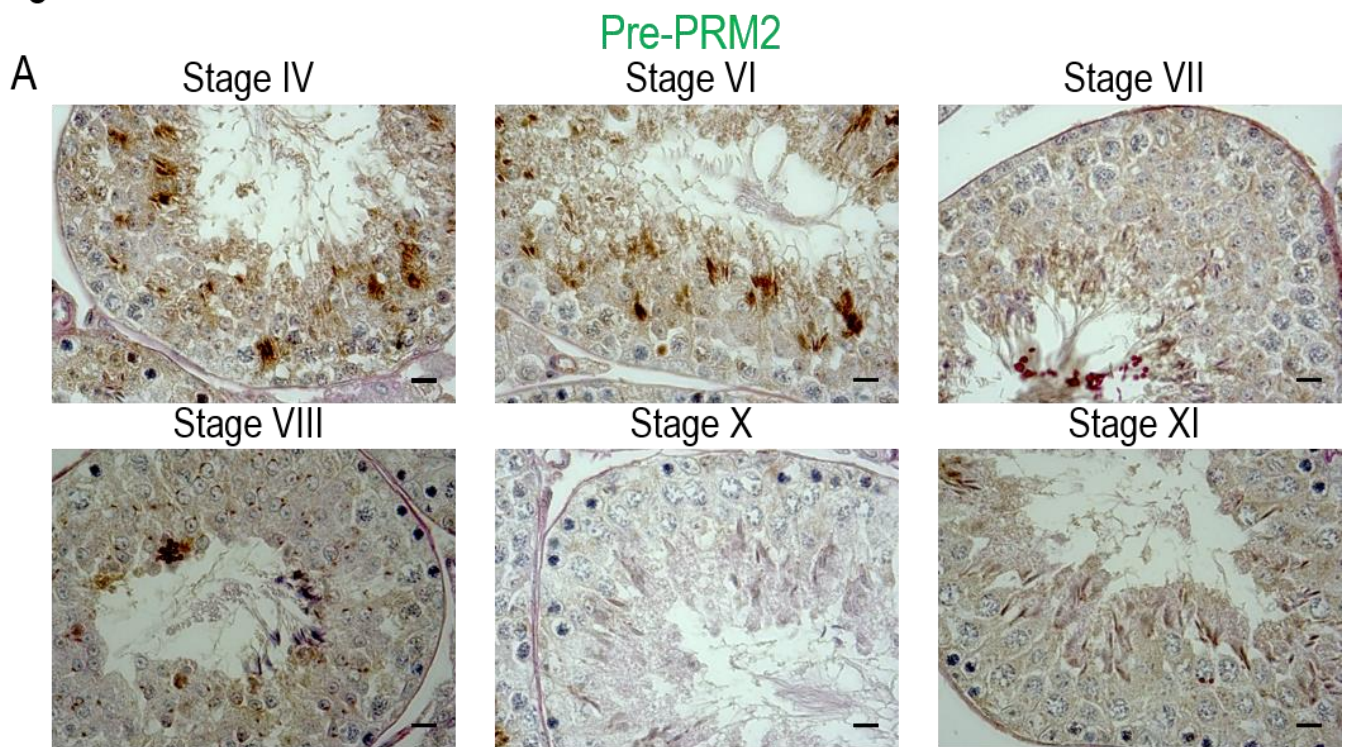


Figure 3

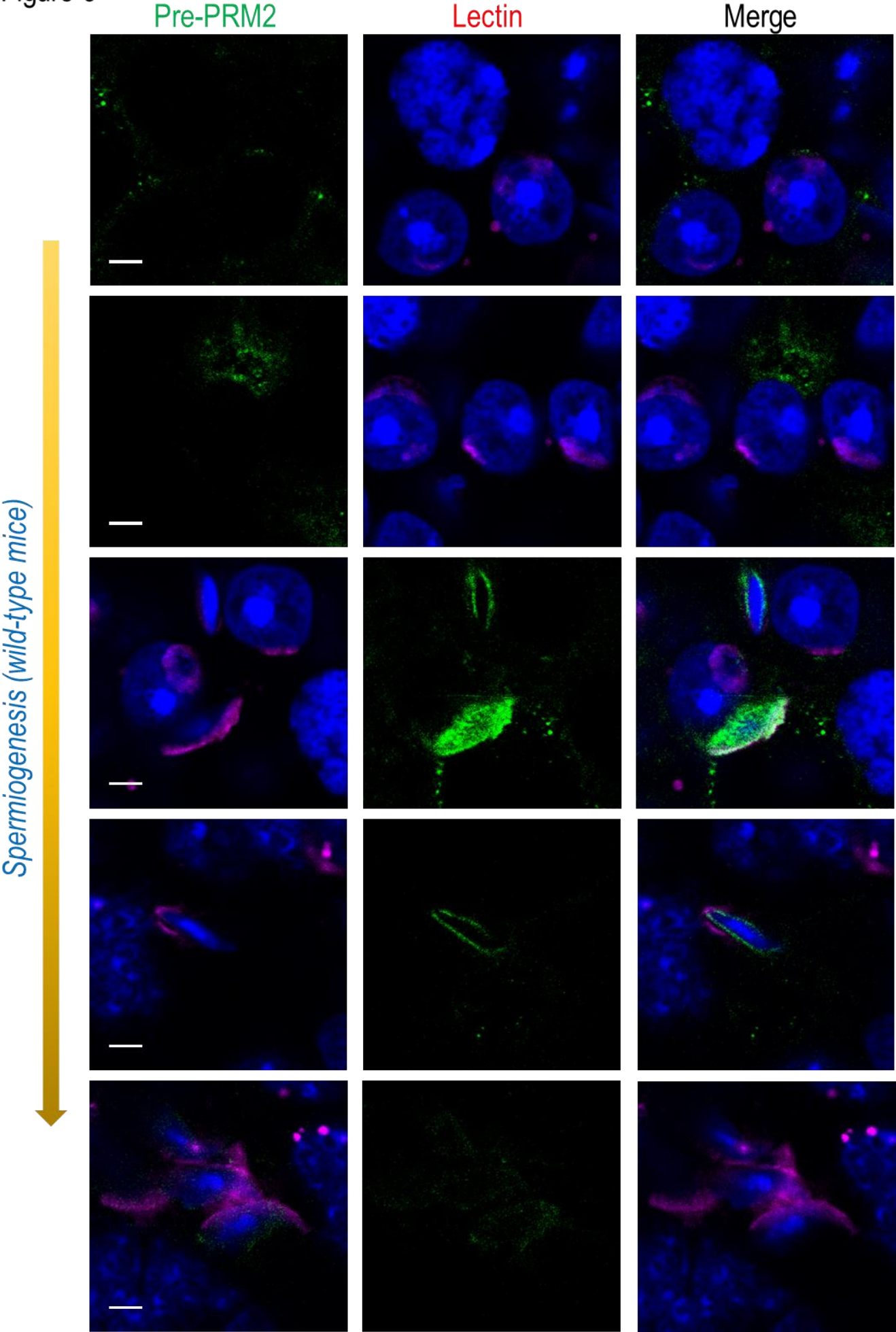
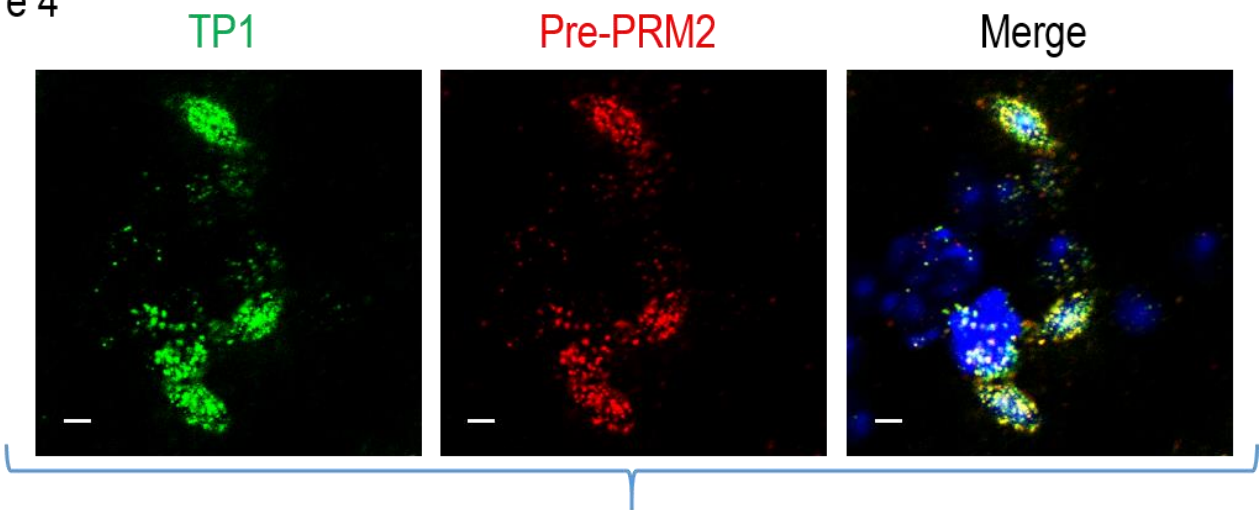
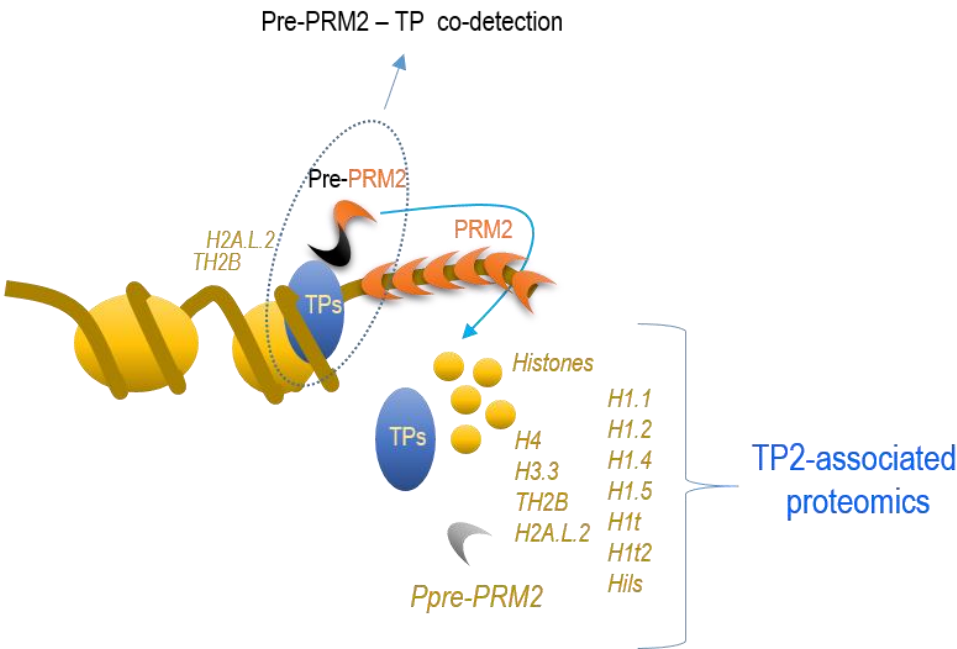


Figure 4

A



B



C

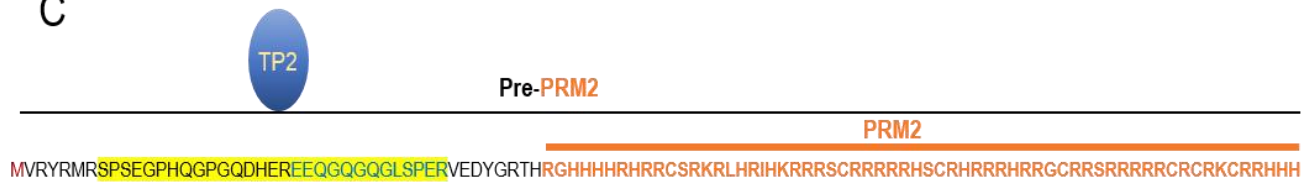
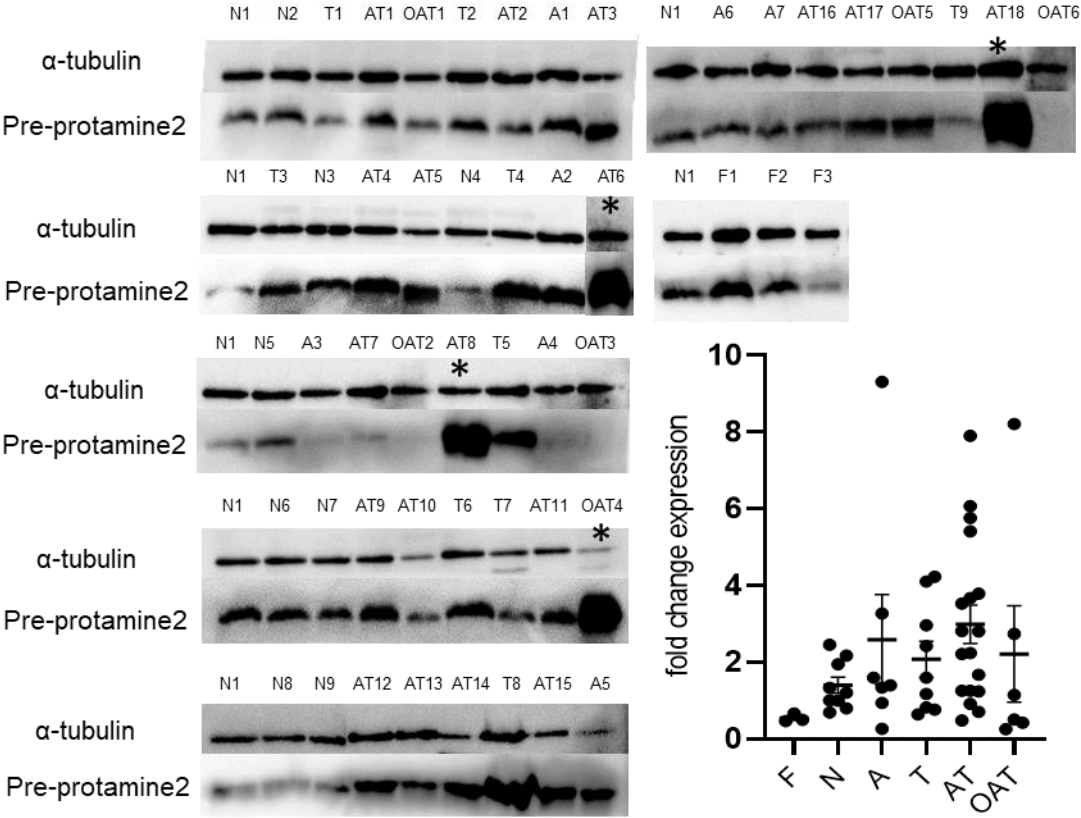


Table I The average of basic semen parameters of samples

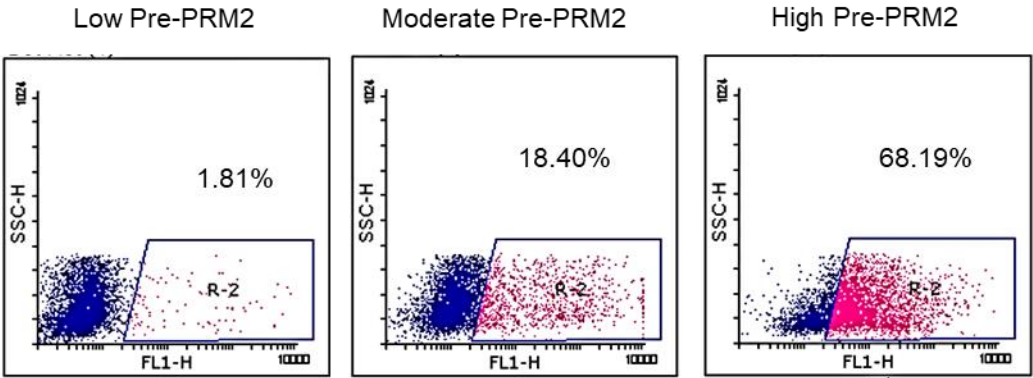
	Number of samples	Age (year)	Volume (ml)	pH	vitality (%)	Count (Mill/ml)	Normal morphology (%)	Progressive motility (% motile)	Total motility (% motile)
Fertile	3	41.33±11.59	4.33±2.77	7.83±0.05	91.66±6.11	32.24±2.19	2.00±1.00	29.83±3.10	51.5±0.26
Normozoospermia	9	35.90±6.68	4.32±1.34	7.80±0.06	97.23±3.17	65.30±30.35	4.25±1.26	44.70±11.15	78.40±14.85
Asthenozoospermia	7	36.33±3.67	3.85±1.50	7.77±0.05	86.05±15.28	89.83±35.02	4.14±0.14	18.16±12.92	44.50±23.82
Teratozoospermia	9	33.37±4.95	3.92±1.48	7.78±0.08	94.06±4.06	88.63±66.91	1.25±0.35	41.00±11.72	74.50±7.54
Asthenoteratozoospermia	18	35.25±6.25	3.93±0.34	7.77±0.06	87.04±11.47	35.31±23.23	0.50±0.73	14.31±6.51	34.69±14.70
Oligoasthenoteratozoospermia	6	38.85±6.96	3.75±2.10	7.53±0.68	88.03±7.03	4.43±4.51	0.71±0.75	6.00±4.58	13.71±12.01

Figure 5

A



B



C

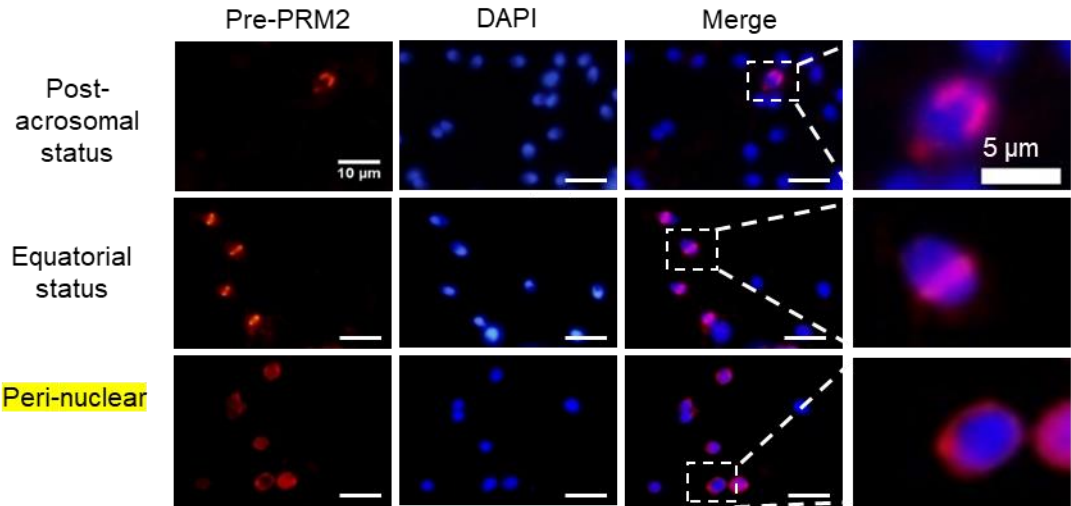


Figure 6

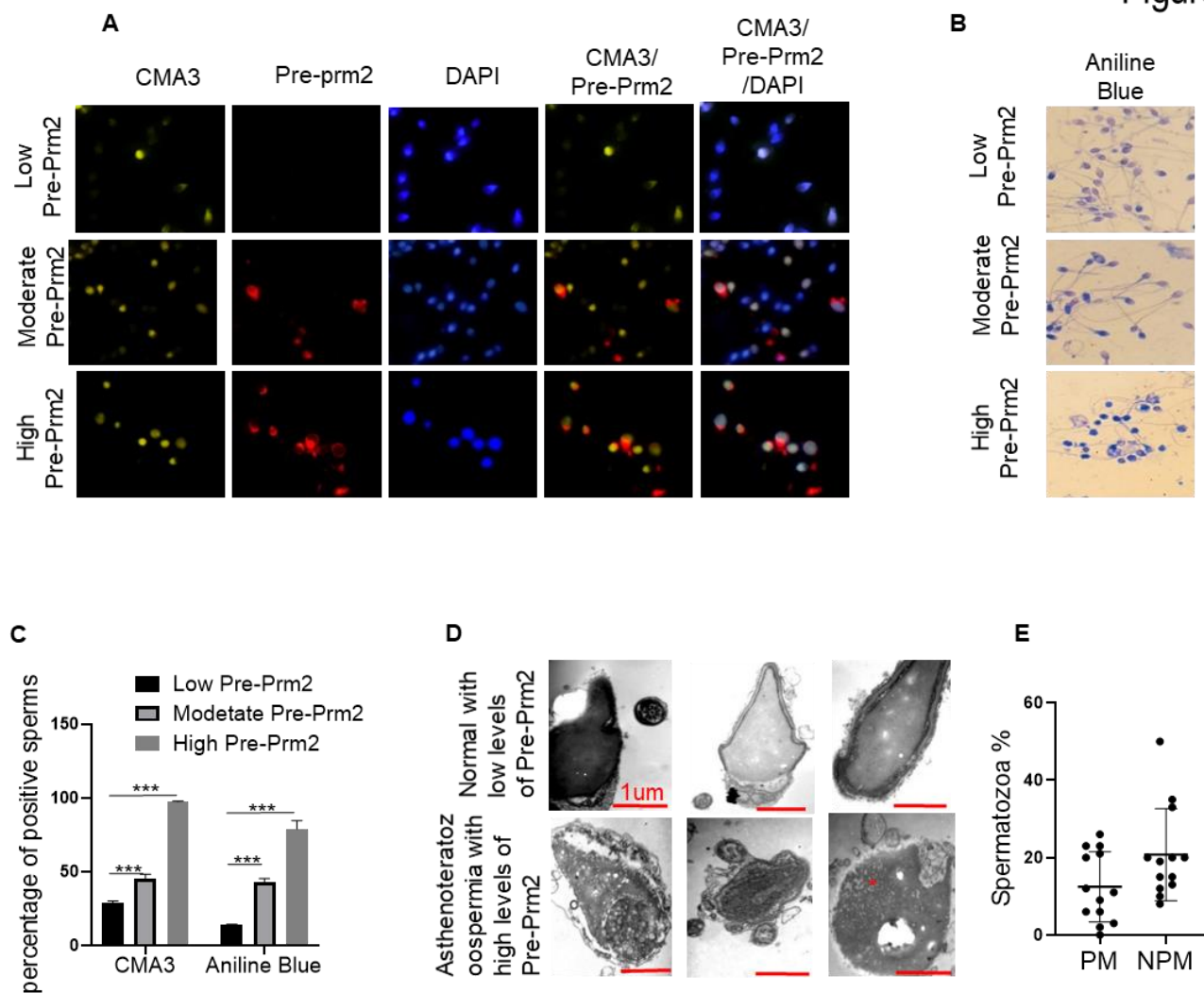


Figure 7

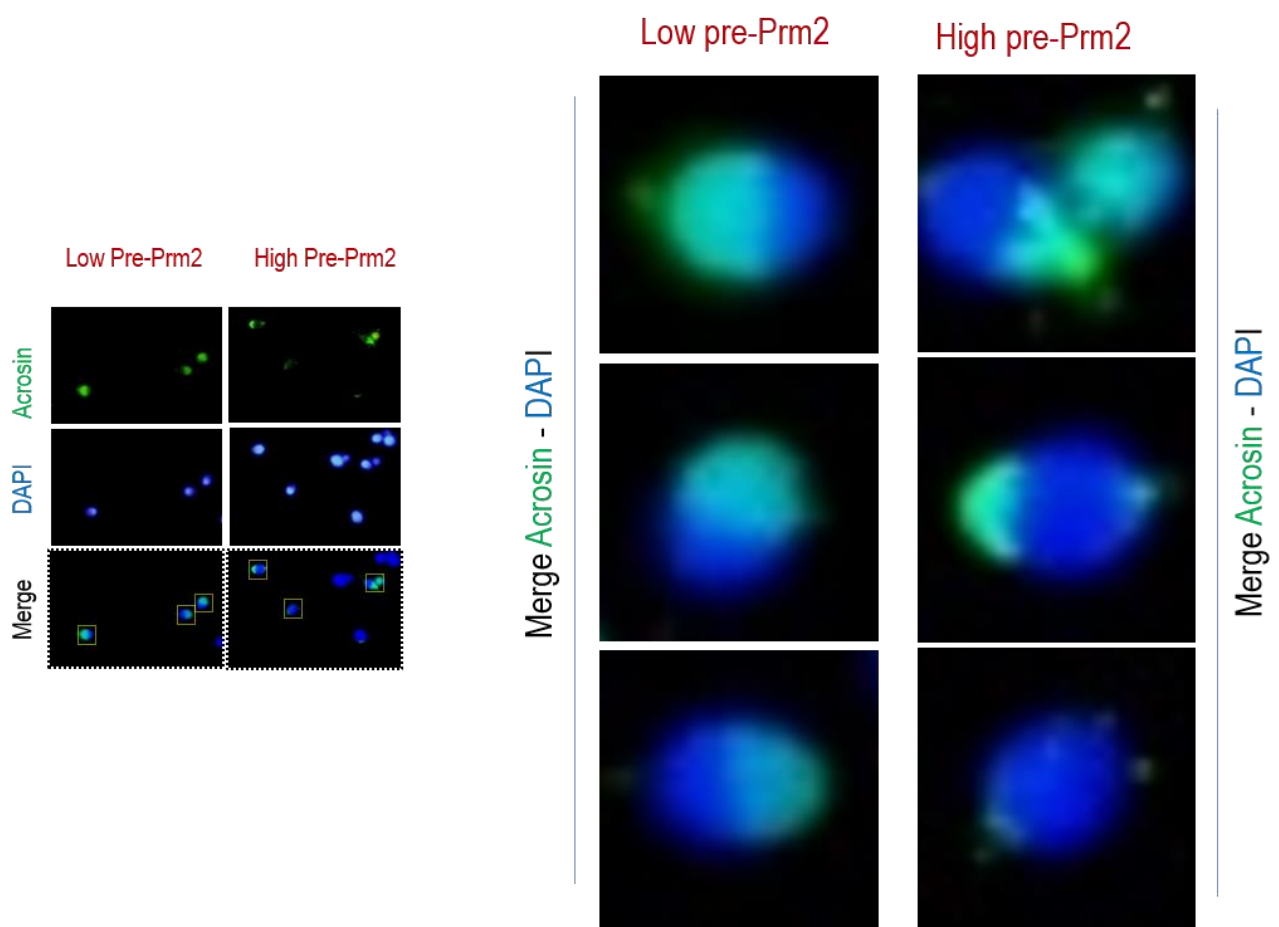
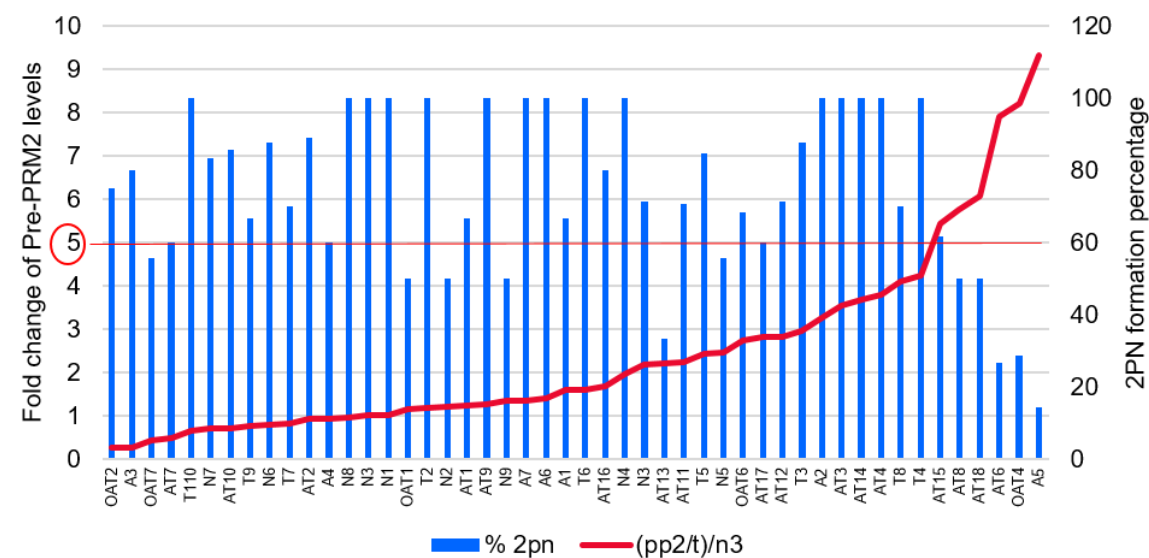


Figure 8

A



B

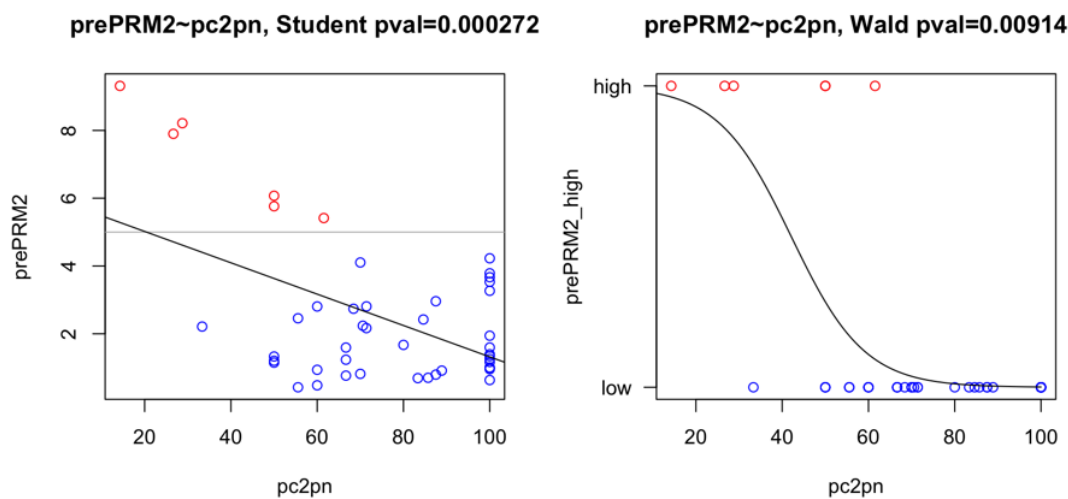


Table II Characteristics of women whose oocytes were retrieved for ICSI in groups with different levels of pre-PRM2.

	Pre-PRM2 fold change>5	Pre-prm2 fold change< 5	P value
No. of patients	5/6?	34/43?	
Age (years)	34.00±5.24	33.06±6.87	Ns
Body mass index (kg/m ²)	27.08±5.31	24.20±4.01	Ns
Basal FSH (UI/L)	6.580±3.13	7.064±3.03	Ns
Basal LH (UI/L)	6.604±5.49	6.338±5.07	Ns
PRL(ng/ml)	18.90±7.31	19.65±11.03	Ns
TSH (µg/ml)	2.080±2.16	2.484±1.12	Ns
AMH (ng/ml)	2.684±1.35	2.501±2.22	Ns

Data are reported as mean ± SD
NS/Ns: non sig..

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Aspect fondamental de la maturation de la protamine-2 et implication de ce processus dans l'infertilité masculine

Le clivage du précurseur de la Prm2 et l'existence de plusieurs formes intermédiaires clivées ont été mis en évidence par plusieurs équipes (Chauvière et al., 1992 ; Carre-Eusebe et al., 1991). La persistance de formes intermédiaires a été montrée non seulement chez la souris (Barral et al., 2017 ; Zhao et al., 2004 ; Shirley et al., 2004) mais aussi chez une cohorte de patients infertiles (Torregrosa et al., 2006). Cependant, jusque-là cette persistance n'avait été montrée que sur des extraits protéiques. Au cours de ce travail l'anticorps ciblant la partie clivée de la Prm2 a permis de visualiser le précurseur *in situ*, ce qui a permis pour la première fois d'observer l'accumulation de la pré-Prm2 et de décrire son lien avec l'expression des protéines de transition. Ainsi, nos résultats montrent que la pré-Prm2 et les TP sont co-exprimées, confirmant des données précédentes sur leurs traductions simultanées (Balhorn et al., 1984 ; Biggiogera et al., 1992). Le fait que les ARNm codant pour les TP et les Prms soient stockés sous forme de ribonucléoprotéines et qu'ils soient maintenus inactifs par le même mécanisme de polyadénylation (Kleene, 1989) va également dans le même sens. De plus, nous avons montré que les TP et les Prms sont colocalisées dans le noyau et une analyse protéomique après immunoprécipitation avec TP2 a montré qu'il y a une interaction entre TP2 et la partie clivée de la pré-Prm2, ce qui renforce l'idée qu'il y a une véritable synergie entre les TP et les Prms. Il est néanmoins nécessaire de souligner que les TP sont exprimées transitoirement et qu'elles disparaissent dans les spermatides condensées. Il donc est possible que ce soit les complexes protéiques en agrégats et entremêlés ensemble qui vont être dégradés, qui soient détectés via notre immunoprécipitation avec TP2. Une approche en microscopie par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) permet de suivre la formation de complexes protéiques dans les cellules et tissus. Dans cette technique un fluorophore donneur va transmettre son énergie à un autre fluorophore accepteur, ce qui implique que les deux protéines pour lesquelles on suspecte une interaction porte chacune un fluorophore. Celle-ci pourrait dans l'avenir confirmer directement cette interaction comme cela a notamment été le cas pour l'interaction de plusieurs protéines impliquées dans les sites de réparations de l'ADN (Kaufmann et al., 2020).

Grâce à l'anticorps dirigé contre la pré-Prm2 murine que nous avons développé, nous avons confirmé qu'il y avait une très forte accumulation de pré-Prm2 dans les spermatides issues de souris H2A.L.2-KO. Mon équipe d'accueil a montré dans le passé que dans ce modèle de souris, les TP ne pouvaient envahir les nucléosomes et que sans cette invasion elles ne pouvaient remplir leur rôle (Barral et al., 2017). Or, le fait que dans ce modèle qui exprime les TP, ainsi que dans le modèle de souris double KO *TP1* et *TP2* (Zhao et al., 2004 ; Shirley et al., 2004), qui n'exprime pas les TP, il y ait une très forte accumulation de pré-Prm2 suggère que l'absence de l'envahissement des nucléosomes par les TP est sur le plan fonctionnel identique

à l'absence des TP elles-mêmes. Autrement dit, la maturation de la Prm2 est dépendante du processus d'invasion des nucléosomes par les TP.

Afin de caractériser plus précisément le lien entre la maturation de la Prm2 et le processus de transformation des nucléosomes, nous avons tiré profit de deux autres modèles développés au laboratoire pour investiguer l'accumulation ou non de la pré-Prm2. Le premier modèle utilisé est un modèle où le premier bromodomaine de la protéine Brdt (BD1) a été délété, Brdt^{ΔBD1} (Shang et al., 2007). Des travaux précédents de l'équipe ont montré que ce domaine permet la reconnaissance de l'histone H4 lorsque ses deux lysines K5 et K8 sont toutes deux acétylées (Morinière et al., 2009). Or cette double acétylation est à son plus haut point au moment de l'éviction des histones, une fois que la protéine CBP/p300 acétyle l'histone H4 grâce à son interaction avec la protéine Nut (Shiota et al., 2018). Il a également été montré que le domaine BD1 de Brdt est essentiel à l'éviction des histones et leur remplacement par les TP et les Prms (Gaucher et al., 2012). Grâce à l'anticorps contre la pré-Prm2 que nous avons développé, nous avons pu montrer dans ce modèle Brdt^{ΔBD1} une accumulation de pré-Prm2 concomitante au défaut de remplacement des histones par les Prms. Le deuxième modèle utilisé est un modèle où la partie C-terminale du variant testiculaire de H2B, TH2B, est étiquetée avec une étiquette TAP-tag (TH2B-tag). Le variant TH2B, est exprimé durant la spermatogenèse et se dimérise avec H2A.L2 au moment de l'éviction des histones (Govin et al., 2007; Barral et al., 2017). Il a été montré dans ce modèle qu'il n'y avait pas d'éviction des histones contenant TH2B-tag au moment précis de l'invasion des nucléosomes par les TP et les Prms (Montellier et al., 2013). Là encore, nous avons observé une accumulation de la pré-Prm2 dans les spermatides allongées. Toutes ces données confirment que le remplacement des histones et l'invasion des nucléosomes par les TP sont des prérequis nécessaires à la maturation de la Prm2.

Ces résultats sont également en faveur du fait que les TP et les Prms agissent de concert sur les nucléosomes dans le processus de remplacement des histones par les protamines, renforçant cette idée déjà proposée récemment (Barral et al., 2017; Khochbin et Ward, 2018).

En effet, avant les travaux de l'équipe publiés en 2017, il était admis dans la littérature que le processus de transition entre histones et protamines était séquentiel : dans un premier temps les TP remplaceraient les histones et dans un deuxième temps les Prms déplaceraient les protéines de transition pour les remplacer.

La détection d'autres partenaires des protéines de ces structures transitionnelles, qui sont les structures présentes entre les nucléosomes et les nucléoprotamines, pourrait permettre de mieux disséquer les mécanismes moléculaires précis du processus de remplacement entre histones et protamines. À cette fin, de nouvelles analyses protéomiques au sein de l'équipe ont permis de dégager de nouveaux acteurs potentiels de ces structures et font l'objet d'investigations diverses.

Une approche protéomique après immunoprécipitation par la pré-Prm2 pourrait également, dans l'avenir, permettre de répondre en partie à la question de l'interactome précis de la pré-

Prm2 et à la chronologie des événements du processus de remplacement des histones par les protamines.

En outre, la présence de nombreux sites de clivage de la pré-Prm2 et le fait qu'il y ait présence simultanée de plusieurs intermédiaires dans le testicule est en faveur du clivage préférentielle de certains sites (Yu et al., 2000 ; Zhao et al., 2001). Ainsi, la question du rôle de ces sites se pose. D'autre part, la maturation au sein de l'épididyme (Debarle et al., 1995) et la persistance des produits intermédiaires dans le spermatozoïde mature (Gusse et al., 1986) ouvre la question de la chronologie des événements de la voie protéolytique engagée dans cette maturation et de la fonction précise de cette chronologie durant la maturation du spermatozoïde. Ainsi, une analyse protéomique après immunoprécipitation par la pré-Prm2 dans les spermatides mais aussi dans les spermatozoïdes épидидymaires permettrait de trouver les différents partenaires et acteurs de cette maturation. La caractérisation de l'enzyme (ou des enzymes) catalysant le clivage de la pré-Prm2 est véritablement nécessaire à la compréhension de ce processus.

Comme la maturation de la Prm2 est liée au processus de remplacement des histones chez la souris, nous avons émis l'hypothèse que chez l'homme, il pouvait y avoir également un défaut dans le processus de remplacement des histones par les protamines dans les spermatides allongées et condensées. Il nous semblait donc intéressant de tester cette hypothèse sur des hommes infertiles en clinique humaine avec un anticorps ciblant la partie clivée de la protéine humaine.

Par cette approche, nous avons confirmé *in situ* que les formes intermédiaires étaient présentes dans les spermatozoïdes matures comme l'ont également montré plusieurs études auparavant (Chevaillier et al., 1990 ; Gusse et al., 1986 ; De Mateo et al., 2011). Cependant, si des taux faibles de ces formes intermédiaires ont été rapportés dans la littérature chez des hommes fertiles, des taux très élevés sont plus souvent corrélés à une infertilité. De nombreuses études ont montré qu'un moyen d'évaluer la qualité spermatique était le ratio PRM1/PRM2 et que s'il déviait de 1, il était corrélé à une mauvaise qualité spermatique voire même à un échec en PMA (De Mateo et al., 2009 ; Aoki et al., 2005 ; Aoki et al., 2006 ; Nasr-Esfahani et al., 2004). Ce ratio a été notamment montré altéré à cause de la persistance de précurseurs de la protamine (Torregrosa et al., 2006) mais jusque-là aucun moyen de standardiser les données n'était réellement possible.

Les données obtenues par immunoblot grâce à cet anticorps permettent de normaliser le taux de rétention de la pré-PRM2 de façon standardisée à l'aide d'un contrôle comme un gène de ménage et, en conséquent, permettront dans l'avenir de quantifier plus précisément le taux de rétention de pré-PRM2. Ainsi ce taux de rétention a pu, dans cette étude, être corrélé au taux de fécondation après FIV-ICSI : lorsqu'il est 5 fois supérieur au taux moyen mesuré chez des sujets sains, le taux de fécondation se trouve diminué et lorsque le taux de rétention atteint 6 fois le taux moyen un y a échec systématique de fécondation. Il est important de

souligner qu'il ne peut constituer l'unique indicateur de réussite en PMA puisque dans certains cas où ce taux de rétention est faible, le taux de formation de zygotes au stade 2 cellules est également diminué. Cela indique qu'il y a d'autres facteurs associés à l'initiation d'un développement embryonnaire correct.

De façon intéressante, dans une étude précédente, un échec de fécondation en FIV-ICSI a été rapporté chez deux patients pour qui le ratio pré-PRM2/PRM2 était élevé (De Mateo et al., 2009). Il est donc tout à fait probable que chez ces patients le taux de rétention soit supérieur à 6 fois le taux contrôle, limite à partir de laquelle le taux de rétention est un signe d'échec systématique de fécondation.

Un défaut de compaction de l'ADN mis en évidence par microscopie électronique et le défaut de protamination mis en évidence par une coloration à la CMA3 constituent certainement les raisons pour lesquelles le taux de fécondation est bas chez les patients avec un taux de rétention de pré-PRM2 élevé. Ceci est en accord avec de nombreuses études précédentes montrant à la fois un lien entre un taux élevé de coloration à la CMA3 et une diminution des taux de réussite en PMA y compris en FIV-ICSI (Marchiani et al., 2017 ; Nasr-Esfahani et al., 2008 ; Nasr-Esfahani et al., 2005) mais aussi avec une étude montrant un lien entre le ratio Histones/PRMs et le taux de fragmentation de l'ADN (Fournier et al., 2018) . Il est à noter que ce taux de fragmentation a également été corrélé à un ratio PRM1/PRM2 altéré (Aoki et al., 2005 ; Amor et al., 2019).

L'index de fragmentation de l'ADN (DFI) est un bon outil prédictif des chances d'obtention de grossesse dans le cas d'infertilité masculine puisqu'un DFI supérieur à 45 % rend la probabilité d'implantation nulle (Guérin et al., 2005). Il serait donc intéressant dans une étude future de poursuivre jusqu'au stade blastocyste pour pouvoir également le corréler au taux de rétention de pré-PRM2.

En outre, une méta-analyse de 12 études a montré une corrélation entre une déficience en protamines et des dommages à l'ADN (Ni et al., 2016). De plus, des défauts de déméthylation sont retrouvés sur des loci soumis à empreinte chez des patients avec un ratio PRM1/PRM2 altéré et les maladies liées à l'empreinte parentale sont plus souvent présentes chez des enfants issus de techniques de PMA (Hattori et al., 2019). De meilleurs outils pour évaluer les risques pour la descendance d'être atteint de maladies liées à l'empreinte génomique sont donc aujourd'hui nécessaires. Ainsi un score de rétention de pré-PRM2 fiable permettra de mieux évaluer la qualité spermatique et d'estimer les chances de fécondation *in vitro* afin d'orienter les patients vers la technique la plus adaptée pour minimiser les risques pour la descendance. Cela paraît crucial dans la mesure où une étude récente a notamment montré que le taux de fécondation avec un ratio PRM1/PRM2 altéré est meilleur avec des spermatozoïdes testiculaires (Sarasa et al., 2020) et qu'il y a probablement des dommages à l'ADN à cause du stress oxydatif durant le transport épидидymaire (Schneider et al., 2020). En conclusion, les risques de maladie liée à l'empreinte génomique seraient peut-être inférieurs avec l'utilisation de spermatozoïdes testiculaires dans le cas de défaut de remplacement des

histones par les protamines et l'anticorps anti pré-PRM2 que nous avons développé pourrait donc être très utile en clinique pour évaluer facilement ce processus.

Enfin, il convient de souligner que nous avons montré que les spermatozoïdes avec un taux de rétention de pré-PRM2 élevé avaient une mobilité réduite et que d'autres études vont également dans ce sens (Zhao et al., 2004; Schneider et al., 2016). De plus, le lien entre le processus de remplacement des histones par les protamines et la formation de l'acrosome que nous avons montré a également été prouvé dans des études précédentes (Yassine et al., 2015 ; Hosseinifar et al., 2015 ; Shirley et al., 2004). Ces données renforcent l'hypothèse d'un réel lien entre la structure, l'intégrité de l'ADN et la mobilité finale des spermatozoïdes. Et de fait, il paraît logique qu'il y ait notamment un senseur de tension lors de l'élongation des spermatides et qu'il y ait des protéines qui fassent le lien entre les différents événements ayant lieu à ce moment-là avec des contrôles comme il existe des points de contrôles lors de la méiose. L'oligospermie observée chez certains patients pourrait par exemple être une conséquence d'un potentiel processus de contrôle menant à l'apoptose si la cellule n'est pas viable et la mobilité réduite pourrait être liée à un défaut d'interaction entre plusieurs protéines.

D'autre part, la lamine nucléaire qui borde l'enveloppe nucléaire interne en regard de l'acrosome est particulièrement dense malgré que sa composition moléculaire n'ait pas encore été caractérisée. Or l'attachement de l'enveloppe nucléaire à l'acrosome semble passer par l'interaction entre celle-ci et l'acroplaxome (Kierszenbaum et Tres, 2004). Grâce à notre anticorps, nous avons observé une accumulation subacrosomale de la pré-PRM2 chez l'homme et chez la souris, suggérant ainsi que la pré-PRM2 pourrait également jouer un rôle à cette interface.

Plusieurs pistes restent donc à explorer dans l'avenir, et notamment une analyse protéomique pour découvrir les protéines qui interagissent avec le précurseur de la PRM2 pour mieux comprendre un éventuel lien entre la pré-PRM2 et des composants du cytosquelette et du nucléosquelette. Il serait notamment intéressant de regarder s'il y a une quelconque interaction avec les protéines du complexe LINC, qui est un complexe protéique permettant au cytosquelette et au nucléosquelette d'interagir (Lombardi et Lammerding, 2011). Ce complexe est composé de deux familles de protéines qui sont la famille des protéines de type SUN et celles des protéines de type KASH. Les protéines de type SUN font partie de l'enveloppe nucléaire interne tandis que les protéines de type KASH de l'enveloppe nucléaire externe et interagissent ensemble dans l'espace périnucléaire. Les protéines de la famille KASH interagissent avec les composants du cytosquelette (Stewart-Hutchinson et al., 2008) tandis que celles de la famille SUN interagissent avec la lamina nucléaire et la chromatine (Haque et al., 2006 ; Rothballe et al., 2013 ; Rothballe et Kutay, 2013).

Enfin, au vu de l'importance de la régulation de l'expression des gènes du cluster des PRMs et du fait que des mutations ont notamment été trouvées dans les régions 5' flanquante et 3'UTR

des Prms chez des hommes infertiles (Ravel et al., 2007 ; Imken et al., 2009) il serait intéressant de caractériser plus finement l'impact de ces mutations sur l'expression des transcrits des PRMs. La caractérisation plus fine des ribonucléoprotéines qui permettent de stocker les ARNm des PRMs sous forme inactive permettrait d'affiner les connaissances sur la maturation de la PRM2 par un autre biais.

CONCLUSION GENERALE

Mes travaux de thèse ont montré que la maturation de la pré-Protamine 2 durant le processus de remplacement des histones par les protamines au cours de la spermiogénèse est une étape cruciale pour la compaction finale correcte du génome des spermatozoïdes.

Nous avons tout d'abord montré que la maturation de la protamine-2 dans les modèles de souris KO qui présentent un défaut de remplacement des histones ne peut avoir lieu. Ainsi, dès qu'il y a un défaut d'enlèvement des histones ou de maturation des états transitionnels, il y a une accumulation de pré-Prm2.

De plus, nous avons pu préciser que le précurseur pré-Prm2 était exprimé à partir du stade 10 des spermatides allongées et qu'il y avait une véritable co-expression de ce précurseur avec les protéines de transition (TPs) dans celles-ci, confirmant l'hypothèse d'une synergie fonctionnelle entre les TPs et les protamines et non d'une action séquentielle. De manière intéressante, la pré-Prm2 subsiste dans les régions sub-acrosomales dans les spermatides condensées, ouvrant la question d'un rôle spécifique à cette interface.

Enfin, du fait de l'importance de cette maturation dans les modèles murins étudiés, la question de son implication dans l'infertilité humaine s'est posée. Nos travaux portant sur une cohorte d'hommes infertiles ont confirmé que certains hommes avaient un taux de rétention de pré-PRM2 élevé et présentaient un défaut d'enlèvement des histones. Par microscopie électronique à transmission, nous avons observé un défaut de compaction de l'ADN dans les spermatozoïdes chez ces patients. De plus, un taux de rétention dépassant 5 fois le taux normal affecte le taux de fécondation en FIV-ICSI. Cette observation de défaut de compaction de l'ADN soulève donc la question des risques encourus pour la descendance et de l'orientation vers la technique de PMA la plus appropriée chez les hommes avec des spermatozoïdes ayant un taux de rétention de pré-PRM2 élevé.

En outre, nous avons aussi observé que les spermatozoïdes avec un taux de rétention élevé présentent également des défauts de formation de l'acrosome et de mobilité ce qui suggère un rôle direct ou indirect de la PRM2 dans ces processus.

En conclusion, l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la partie clivée de la PRM2 que nous avons développé pourrait dans l'avenir être utilisée en clinique humaine assez facilement pour évaluer la qualité du génome des spermatozoïdes. Il serait maintenant intéressant de comprendre le rôle de la Protamine-2 dans l'interaction entre le nucléosquelette et le cytosquelette mais aussi de mieux appréhender le clivage séquentiel des précurseurs afin de pouvoir affiner le modèle moléculaire de maturation post-méiotique de l'épigénome mâle. Ces découvertes devraient permettre de trouver de potentiels cibles thérapeutiques pour les hommes infertiles chez qui cette maturation est défectueuse.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Adham IM, Nayernia K, Burkhardt-Göttges E, Topaloglu O null, Dixkens C, Holstein AF, Engel W. Teratozoospermia in mice lacking the transition protein 2 (Tnp2). *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:513–520.
- Akama K, Kondo M, Sato H, Nakano M. Transition protein 4 from boar late spermatid nuclei is a topological factor that stimulates DNA-relaxing activity of topoisomerase I. *FEBS Lett* 1999;**442**:189–192.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 2014; Garland Science.
- Alfonso PJ, Kistler WS. Immunohistochemical localization of spermatid nuclear transition protein 2 in the testes of rats and mice. *Biol Reprod* 1993;**48**:522–529.
- Amor H, Shelko N, Hamad MF, Zeyad A, Hammadeh ME. An additional marker for sperm DNA quality evaluation in spermatozoa of male partners of couples undergoing assisted reproduction technique (IVF/ICSI): Protamine ratio. *Andrologia* 2019;**51**:e13400.
- Ankem MK, Mayer E, Ward WS, Cummings KB, Barone JG. Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implications for male factor infertility. *Urology* 2002;**59**:575–578.
- Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril* 2006a-11;**86**:1416–1422.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006b-11;**86**:1408–1415.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JBM, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;**26**:741–748.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:10148–10152.
- Arthold S, Kurowski A, Wutz A. Mechanistic insights into chromosome-wide silencing in X inactivation. *Hum Genet* 2011;**130**:295–305.
- Atshan M, Kakavand K, Hosseini SH, Sadighi Gilani MA, Mohseni Meybodi A, Sabbaghian M. Evaluation of sperm DNA fragmentation and chromatin structure in infertile men with immotile short-tail sperm defect. *Andrologia* 2020;**52**:e13445.
- Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med* 1944;**79**:137–158.
- Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol* 2007;**8**:227.
- Balhorn R, Weston S, Thomas C, Wyrobek AJ. DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins. *Exp Cell Res* 1984;**150**:298–308.
- Barnes CE, English DM, Cowley SM. Acetylation & Co: an expanding repertoire of histone acylations regulates chromatin and transcription. *Essays Biochem* 2019;**63**:97–107.
- Barone JG, Christiano AP, Ward WS. DNA organization in patients with a history of cryptorchidism. *Urology* 2000;**56**:1068–1070.

- Barral S, Morozumi Y, Tanaka H, Montellier E, Govin J, Dieuleveult M de, Charbonnier G, Couté Y, Puthier D, Buchou T, *et al.* Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol Cell* 2017;**66**:89-101.e8.
- Baskaran R, Rao MR. Interaction of spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1. *J Biol Chem* 1990;**265**:21039–21047.
- Bednar J, Garcia-Saez I, Boopathi R, Cutter AR, Papai G, Reymer A, Syed SH, Lone IN, Tonchev O, Crucifix C, *et al.* Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Mol Cell* 2017;**66**:384-397.e8.
- Bench G, Corzett MH, Kramer CE, Grant PG, Balhorn R. Zinc is sufficiently abundant within mammalian sperm nuclei to bind stoichiometrically with protamine 2. *Mol Reprod Dev* 2000;**56**:512–519.
- Berruti G. Towards defining an 'origin'-The case for the mammalian acrosome. *Semin Cell Dev Biol* 2016;**59**:46–53.
- Bianchi F, Rousseaux-Prevost R, Sautiere P, Rousseaux J. P2 protamines from human sperm are zinc -finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;**182**:540–547.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993;**49**:1083–1088.
- Biggiogera M, Muller S, Courtens JL, Fakan S, Romanini MG. Immunoelectron microscopical distribution of histones H2B and H3 and protamines in the course of mouse spermiogenesis. *Microsc Res Tech* 1992;**20**:259–267.
- Björndahl L, Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:23–29.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007;**22**:1506–1512.
- Boveri T. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh d phys- med Ges Würzburg NF* 1902;67–90.
- Branson RE, Grimes SR, Yonuschot G, Irvin JL. The histones of rat testis. *Arch Biochem Biophys* 1975;**168**:403–412.
- Brewer L, Corzett M, Balhorn R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 2002;**277**:38895–38900.
- Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* 2014;**7**:2.
- Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JMA. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:207–216.
- Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl* 1971;**13**:Suppl 13:65-75.
- Carone BR, Hung J-H, Hainer SJ, Chou M-T, Carone DM, Weng Z, Fazzio TG, Rando OJ. High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. *Dev Cell* 2014;**30**:11–22.
- Carré-Eusèbe D, Lederer F, Lê KH, Elsevier SM. Processing of the precursor of protamine P2 in mouse. Peptide mapping and N-terminal sequence analysis of intermediates. *Biochem J* 1991;**277** (Pt 1):39–45.

- Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007;**13**:313–327.
- Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001;**22**:604–610.
- Cebesoy FB, Aydos K, Unlu C. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl* 2006;**52**:397–402.
- Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 1950;**6**:201–209.
- Chauvière M, Martinage A, Debarle M, Sautière P, Chevaillier P. Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *Eur J Biochem* 1992;**204**:759–765.
- Chevaillier P, Martinage A, Arkhis A, Sautière P. [Protamine precursors in human spermatozoa]. *Reprod Nutr Dev* 1990;**30**:343–347.
- Chirat F, Arkhis A, Martinage A, Jaquinod M, Chevaillier P, Sautière P. Phosphorylation of human sperm protamines HP1 and HP2: identification of phosphorylation sites. *Biochim Biophys Acta* 1993;**1203**:109–114.
- Cho C, Jung-Ha H, Willis WD, Goulding EH, Stein P, Xu Z, Schultz RM, Hecht NB, Eddy EM. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* 2003;**69**:211–217.
- 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. *Nat Genet* 2001;**28**:82–86.
- Chodaparambil JV, Barbera AJ, Lu X, Kaye KM, Hansen JC, Luger K. A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat Struct Mol Biol* 2007;**14**:1105–1107.
- Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, Oliveira CS, Loos R, Radzisheuskaya A, Mowen KA, Bertone P, Silva JCR, Zernicka-Goetz M, *et al.* Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature* 2014;**507**:104–108.
- Clark RJ, Felsenfeld G. Structure of chromatin. *Nat New Biol* 1971;**229**:101–106.
- Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963;**112**:35–51.
- Coutton C, Escoffier J, Martinez G, Arnoult C, Ray PF. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:455–485.
- Craig JM, Bickmore WA. Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays* 1993;**15**:349–354.
- Dacheux J-L, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 2014;**147**:R27–42.
- Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995;**26**:323–345.
- Dadoune J-P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 2003;**61**:56–75.
- Debarle M, Martinage A, Sautiere P, Chevaillier P. Persistence of protamine precursors in mature sperm nuclei of the mouse. *Mol Reprod Dev* 1995;**40**:84–90.
- Deng C, Li T, Xie Y, Guo Y, Yang Q-Y, Liang X, Deng C-H, Liu G-H. Sperm DNA fragmentation index influences assisted reproductive technology outcome: A systematic review and meta-analysis combined with a retrospective cohort study. *Andrologia* 2019;**51**:e13263.
- Di Lorenzo A, Bedford MT. Histone arginine methylation. *FEBS Lett* 2011;**585**:2024–2031.
- Dillon N. Heterochromatin structure and function. *Biol Cell* 2004;**96**:631–637.

- Dolci S, Campolo F, De Felici M. Gonadal development and germ cell tumors in mouse and humans. *Semin Cell Dev Biol* 2015;**45**:114–123.
- Dorigo B, Schalch T, Kulangara A, Duda S, Schroeder RR, Richmond TJ. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* 2004;**306**:1571–1573.
- Eirín-López JM, Ausió J. Origin and evolution of chromosomal sperm proteins. *Bioessays* 2009;**31**:1062–1070.
- Erkek S, Hisano M, Liang C-Y, Gill M, Murr R, Dieker J, Schübeler D, Vlag J van der, Stadler MB, Peters AHFM. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 2013;**20**:868–875.
- Escalier D, Touré A. [Morphological defects of sperm flagellum implicated in human male infertility]. *Med Sci (Paris)* 2012;**28**:503–511.
- Fawcett DW. *The cell*. 1981;
- Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 2003;**421**:448–453.
- Flemming W. Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. 1882;
- Fournier C, Labrune E, Lornage J, Soignon G, Giscard d’Estaing S, Guérin J-F, Benchaib M. The impact of histones linked to sperm chromatin on embryo development and ART outcome. *Andrology* 2018;**6**:436–445.
- Garcia-Saez I, Menoni H, Boopathi R, Shukla MS, Soueidan L, Noirclerc-Savoye M, Le Roy A, Skoufias DA, Bednar J, Hamiche A, *et al*. Structure of an H1-Bound 6-Nucleosome Array Reveals an Untwisted Two-Start Chromatin Fiber Conformation. *Mol Cell* 2018;**72**:902-915.e7.
- Gaucher J, Boussouar F, Montellier E, Curtet S, Buchou T, Bertrand S, Hery P, Jounier S, Depaux A, Vitte A-L, *et al*. Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* 2012;**31**:3809–3820.
- Gaucher J, Reynoird N, Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. From meiosis to postmeiotic events: the secrets of histone disappearance. *FEBS J* 2010;**277**:599–604.
- Gázquez C, Oriola J, Mateo S de, Vidal-Taboada JM, Balleascà JL, Oliva R. A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C->A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *J Androl* 2008;**29**:540–548.
- Ghedir H, Mehri A, Mehdi M, Brahem S, Saad A, Ibala-Romdhane S. Meiotic segregation and sperm DNA fragmentation in Tunisian men with dysplasia of the fibrous sheath (DFS) associated with head abnormalities. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1167–1174.
- Giorgini F, Davies HG, Braun RE. MSY2 and MSY4 bind a conserved sequence in the 3’ untranslated region of protamine 1 mRNA in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:7010–7019.
- Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT. EDC-2: The Endocrine Society’s Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 2015;**36**:E1–E150.
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, Eddy EM, Garin J, Khochbin S. Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 2006;**281**:37888–37892.
- Govin J, Escoffier E, Rousseaux S, Kuhn L, Ferro M, Thévenon J, Catena R, Davidson I, Garin J, Khochbin S, *et al*. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* 2007;**176**:283–294.

- Green GR, Balhorn R, Poccia DL, Hecht NB. Synthesis and processing of mammalian protamines and transition proteins. *Mol Reprod Dev* 1994;**37**:255–263.
- Grigoryev SA, Arya G, Correll S, Woodcock CL, Schlick T. Evidence for heteromorphic chromatin fibers from analysis of nucleosome interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:13317–13322.
- Grimes SR, Meistrich ML, Platz RD, Hnilica LS. Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. *Exp Cell Res* 1977;**110**:31–39.
- Grzmil P, Boinska D, Kleene KC, Adham I, Schlüter G, Kämper M, Buyandelger B, Meinhardt A, Wolf S, Engel W. Prm3, the fourth gene in the mouse protamine gene cluster, encodes a conserved acidic protein that affects sperm motility. *Biol Reprod* 2008;**78**:958–967.
- Guérin P, Matillon C, Bleau G, Lévy R, Ménézo Y. [Impact of sperm DNA fragmentation on ART outcome]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;**33**:665–668.
- Gupta N, Madapura MP, Bhat UA, Rao MRS. Mapping of Post-translational Modifications of Transition Proteins, TP1 and TP2, and Identification of Protein Arginine Methyltransferase 4 and Lysine Methyltransferase 7 as Methyltransferase for TP2. *J Biol Chem* 2015;**290**:12101–12122.
- Gusse M, Sautière P, Bélaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevaillier P. Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta* 1986;**884**:124–134.
- Guthmann M, Burton A, Torres-Padilla M-E. Expression and phase separation potential of heterochromatin proteins during early mouse development. *EMBO Rep* 2019;**20**:e47952.
- Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;**460**:473–478.
- Hammoud SS, Purwar J, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 2010;**94**:1728–1733.
- Handyside AH. Molecular origin of female meiotic aneuploidies. *Biochim Biophys Acta* 2012;**1822**:1913–1920.
- Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, Trembath RC, Shackleton S. SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 2006;**26**:3738–3751.
- Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, *et al.* Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenetics* 2019;**11**:21.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure AK, Usson Y, Pelletier R, Sèle B, Khochbin S, Rousseaux S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. *Eur J Cell Biol* 2000;**79**:950–960.
- Hecht NB. Post-meiotic gene expression during spermatogenesis. *Prog Clin Biol Res* 1988;**267**:291–313.
- Hecht NB. Regulation of “haploid expressed genes” in male germ cells. *J Reprod Fertil* 1990;**88**:679–693.
- Heidaran MA, Kistler WS. Transcriptional and translational control of the message for transition protein 1, a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J Biol Chem* 1987;**262**:13309–13315.

- Heidaran MA, Showman RM, Kistler WS. A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *J Cell Biol* 1988;**106**:1427–1433.
- Heidari MM, Danafar A, Moezzi F, Khatami M, Talebi AR. The association between TNP2 gene polymorphisms and Iranian infertile men with varicocele: A case-control study. *Int J Reprod Biomed* 2019;**17**:557–566.
- Heidari MM, Khatami M, Talebi AR, Moezzi F. Mutation analysis of TNP1 gene in infertile men with varicocele. *Iran J Reprod Med* 2014;**12**:257–262.
- Heijden GW van der, Ramos L, Baart EB, Berg IM van den, Derijck AAHA, Vlag J van der, Martini E, Boer P de. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol* 2008;**8**:34.
- Hergeth SP, Schneider R. The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep* 2015;**16**:1439–1453.
- Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952;**36**:39–56.
- Hewish DR, Burgoyne LA. Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun* 1973;**52**:504–510.
- Hoghoughi N, Barral S, Curtet S, Chuffart F, Charbonnier G, Puthier D, Buchou T, Rousseaux S, Khochbin S. RNA-Guided Genomic Localization of H2A.L.2 Histone Variant. *Cells* 2020;**9**:.
- Hoghoughi N, Barral S, Vargas A, Rousseaux S, Khochbin S. Histone variants: essential actors in male genome programming. *J Biochem* 2018;**163**:97–103.
- Holmes VF, Cozzarelli NR. Closing the ring: links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:1322–1324.
- Hosseinfar H, Yazdanikhah S, Modarresi T, Totonchi M, Sadighi Gilani MA, Sabbaghian M. Correlation between sperm DNA fragmentation index and CMA3 positive spermatozoa in globozoospermic patients. *Andrology* 2015;**3**:526–531.
- Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology* 2014;**2**:339–350.
- Hwang K, Yatsenko AN, Jorgez CJ, Mukherjee S, Nalam RL, Matzuk MM, Lamb DJ. Mendelian genetics of male infertility. *Ann N Y Acad Sci* 2010;**1214**:E1–E17.
- Iguchi N, Yang S, Lamb DJ, Hecht NB. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet* 2006;**43**:382–384.
- Imken L, Rouba H, El Houate B, Louanjli N, Barakat A, Chafik A, McElreavey K. Mutations in the protamine locus: association with spermatogenic failure? *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:733–738.
- Inaba K, Mizuno K. Sperm dysfunction and ciliopathy. *Reprod Med Biol* 2016;**15**:77–94.
- Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* 2015;**21**:411–426.
- Isoun TT. The histopathology of experimental disease produced in mice infected with Trypanosoma vivax. *Acta Trop* 1975;**32**:267–272.
- Itoh K, Kondoh G, Miyachi H, Sugai M, Kaneko Y, Kitano S, Watanabe H, Maeda R, Imura A, Liu Y, et al. Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo. *Sci Signal* 2019;**12**:.

- Jarow JP, Espeland MA, Lipshultz LI. Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* 1989;**142**:62–65.
- Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. *Reproduction* 2011;**141**:21–36.
- Jost KL, Bertulat B, Cardoso MC. Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? *Chromosoma* 2012;**121**:555–563.
- Jung YH, Sauria MEG, Lyu X, Cheema MS, Ausio J, Taylor J, Corces VG. Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory Landscapes. *Cell Rep* 2017;**18**:1366–1382.
- Kaufmann T, Herbert S, Hackl B, Besold JM, Schramek C, Gotzmann J, Elsayad K, Slade D. Direct measurement of protein-protein interactions by FLIM-FRET at UV laser-induced DNA damage sites in living cells. *Nucleic Acids Res* 2020;**48**:e122.
- Khochbin S. Histone H1 diversity: bridging regulatory signals to linker histone function. *Gene* 2001;**271**:1–12.
- Khochbin S, Ward WS. Chromatin Structure: Composition and Function During Spermiogenesis. *Encyclopedia of reproduction* 2018;**3**, p. 347–351. Elsevier.
- Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 2004;**116**:259–272.
- Kierszenbaum AL, Gil M, Rivkin E, Tres LL. Ran, a GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport and microtubule nucleation, relocates from the manchette to the centrosome region during rat spermiogenesis. *Mol Reprod Dev* 2002;**63**:131–140.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Acroplaxome, an F-actin-keratin-containing plate, anchors the acrosome to the nucleus during shaping of the spermatid head. *Mol Biol Cell* 2003;**14**:4628–4640.
- Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Cytoskeletal track selection during cargo transport in spermatids is relevant to male fertility. *Spermatogenesis* 2011;**1**:221–230.
- Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 2004;**67**:271–284.
- Kleene KC. Poly(A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis in the mouse. *Development* 1989;**106**:367–373.
- Kleene KC. Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice. *Dev Biol* 1993;**159**:720–731.
- Kleene KC. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev* 1996;**43**:268–281.
- Kleene KC, Bagarova J. Comparative genomics reveals gene-specific and shared regulatory sequences in the spermatid-expressed mammalian Odf1, Prm1, Prm2, Tnp1, and Tnp2 genes. *Genomics* 2008;**92**:101–106.
- Kleene KC, Distel RJ, Hecht NB. Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Dev Biol* 1984;**105**:71–79.
- Kolthur-Seetharam U, Pradeepa MM, Gupta N, Narayanaswamy R, Rao MRS. Spatiotemporal organization of AT- and GC-rich DNA and their association with transition proteins TP1 and TP2 in rat condensing spermatids. *J Histochem Cytochem* 2009;**57**:951–962.
- Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974;**184**:868–871.

- Kossel A. Ueber die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. *Munchen Med Wochenschrift* 1911;65--69.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;**128**:693–705.
- Kramer JA, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem* 1996;**271**:11619–11622.
- Krause CD, Yang Z-H, Kim Y-S, Lee J-H, Cook JR, Pestka S. Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2007;**113**:50–87.
- Kremling H, Luerssen H, Adham IM, Klemm U, Tsaousidou S, Engel W. Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals. *Differentiation* 1989;**40**:184–190.
- Kundu TK, Rao MR. Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry* 1996;**35**:15626–15632.
- Kwon YK, Hecht NB. Binding of a phosphoprotein to the 3' untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. *Mol Cell Biol* 1993;**13**:6547–6557.
- Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet* 2016;**32**:42–56.
- Lee K, Haugen HS, Clegg CH, Braun RE. Premature translation of protamine 1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:12451–12455.
- Levene P. The structure of yeast nucleic acid. *The Journal of biological chemistry* 1919;**40**:415–424.
- Li A, Maffey AH, Abbott WD, Conde e Silva N, Prunell A, Siino J, Churikov D, Zalensky AO, Ausió J. Characterization of nucleosomes consisting of the human testis/sperm-specific histone H2B variant (hTSH2B). *Biochemistry* 2005;**44**:2529–2535.
- Li N, Mruk DD, Wong CKC, Han D, Lee WM, Cheng CY. Formin 1 Regulates Ectoplasmic Specialization in the Rat Testis Through Its Actin Nucleation and Bundling Activity. *Endocrinology* 2015;**156**:2969–2983.
- Lombardi ML, Lammerding J. Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem Soc Trans* 2011;**39**:1729–1734.
- Lu S, Xie YM, Li X, Luo J, Shi XQ, Hong X, Pan YH, Ma X. Mass spectrometry analysis of dynamic post-translational modifications of TH2B during spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2009;**15**:373–378.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997;**389**:251–260.
- Maeshima K, Hihara S, Eltsov M. Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? *Curr Opin Cell Biol* 2010;**22**:291–297.
- Mali P, Kaipia A, Kangasniemi M, Toppari J, Sandberg M, Hecht NB, Parvinen M. Stage-specific expression of nucleoprotein mRNAs during rat and mouse spermiogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1989;**1**:369–382.
- Mali P, Sandberg M, Vuorio E, Yelick PC, Hecht NB, Parvinen M. Localization of protamine 1 mRNA in different stages of the cycle of the rat seminiferous epithelium. *J Cell Biol* 1988;**107**:407–412.
- Manku G, Culty M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction* 2015;**149**:R139-157.

- Marchiani S, Tamburrino L, Benini F, Fanfani L, Dolce R, Rastrelli G, Maggi M, Pellegrini S, Baldi E. Chromatin Protamination and Catsper Expression in Spermatozoa Predict Clinical Outcomes after Assisted Reproduction Programs. *Sci Rep* 2017;**7**:15122.
- Marieb EN. *Essentials of Human Anatomy & Physiology*. 2006; Pearson; Benjamin Cummings.
- Martins RP, Krawetz SA. Nuclear organization of the protamine locus. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;**64**:1–12.
- Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem* 2004;**279**:51862–51868.
- Mateo S de, Gázquez C, Guimerà M, Balasch J, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors (Pre-P2), protamine 1 to protamine 2 ratio (P1/P2), and assisted reproduction outcome. *Fertil Steril* 2009;**91**:715–722.
- Mateo S de, Ramos L, Boer P de, Meistrich M, Oliva R. Protamine 2 precursors and processing. *Protein Pept Lett* 2011;**18**:778–785.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;**14**:1197–1213.
- Meetei AR, Ullas KS, Vasupradha V, Rao MRS. Involvement of protein kinase A in the phosphorylation of spermatidal protein TP2 and its effect on DNA condensation. *Biochemistry* 2002;**41**:185–195.
- Meistrich ML, Hess RA. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods Mol Biol* 2013;**927**:299–307.
- Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003;**111**:483–488.
- Mendel G. Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn Bd. IV für das Jahr *Abhandlungen* 1866;3–47.
- Mengual L, Ballescà JL, Ascaso C, Oliva R. Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J Androl* 2003;**24**:438–447.
- Miescher F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* 1871;**4**:441–460.
- Mika S, Rost B. NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**:D160–163.
- Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A, Matsuoka Y, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y, Tanaka H. Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl* 2005;**26**:779–786.
- Montellier E, Boussouar F, Rousseaux S, Zhang K, Buchou T, Fenaille F, Shiota H, Debernardi A, Héry P, Curtet S, *et al.* Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev* 2013;**27**:1680–1692.
- Morales CR, Kwon YK, Hecht NB. Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J Cell Sci* 1991;**100** (Pt 1):119–131.
- Morgan TH, Sturtevant AH, Muller HJ, Bridges CB. *The Mechanism of Mendelian heredity*. 1915;
- Morinière J, Rousseaux S, Steuerwald U, Soler-López M, Curtet S, Vitte A-L, Govin J, Gaucher J, Sadoul K, Hart DJ, *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 2009;**461**:664–668.

- Nasr-Esfahani MH, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, Shahvardi H. Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation? *Andrologia* 2006;**38**:92–98.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Shirazi R, Javanmardi S. Effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2007;**14**:422–429.
- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaei M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertil Steril* 2008;**89**:892–898.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online* 2005;**11**:198–205.
- Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F. Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online* 2004;**9**:652–658.
- Ni K, Spiess A-N, Schuppe H-C, Steger K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2016;**4**:789–799.
- Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1961;**47**:1588–1602.
- O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014;**30**:45–54.
- Olins AL, Olins DE. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science* 1974;**183**:330–332.
- Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments and gene structure. *J Mol Evol* 1990;**30**:333–346.
- Oudet P, Gross-Bellard M, Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* 1975;**4**:281–300.
- Padavattan S, Thiruselvam V, Shinagawa T, Hasegawa K, Kumasaka T, Ishii S, Kumarevel T. Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. *Biophys Chem* 2017;**221**:41–48.
- Papoutsopoulou S, Nikolakaki E, Chalepakis G, Kruft V, Chevaillier P, Giannakouros T. SR protein-specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1. *Nucleic Acids Res* 1999;**27**:2972–2980.
- Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol* 2004;**5**:R44.
- Patat O, Pagnin A, Siegfried A, Mitchell V, Chassaing N, Faguer S, Monteil L, Gaston V, Bujan L, Courtade-Saïdi M, *et al.* Truncating Mutations in the Adhesion G Protein-Coupled Receptor G2 Gene ADGRG2 Cause an X-Linked Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens. *Am J Hum Genet* 2016;**99**:437–442.
- Perrault I, Saunier S, Hanein S, Filhol E, Bizet AA, Collins F, Salih MAM, Gerber S, Delphin N, Bigot K, *et al.* Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations. *Am J Hum Genet* 2012;**90**:864–870.
- Phillips DM, Johns EW. A FRACTIONATION OF THE HISTONES OF GROUP F2A FROM CALF THYMUS. *Biochem J* 1965;**94**:127–130.
- Pierre V, Martinez G, Coutton C, Delaroche J, Yassine S, Novella C, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Ray PF, Arnoult C. Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development* 2012;**139**:2955–2965.

- Pirhonen A, Linnala-Kankkunen A, Mäenpää PH. Identification of phosphoserine residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. *Biol Reprod* 1994;**50**:981–986.
- Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:5354–5365.
- Pradeepa MM, Manjunatha S, Sathish V, Agrawal S, Rao MRS. Involvement of importin-4 in the transport of transition protein 2 into the spermatid nucleus. *Mol Cell Biol* 2008;**28**:4331–4341.
- Pradeepa MM, Rao MRS. Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;**63**:1–10.
- Puglisi R, Maccari I, Pipolo S, Mangia F, Boitani C. The nuclear form of glutathione peroxidase 4 colocalizes and directly interacts with protamines in the nuclear matrix during mouse sperm chromatin assembly. *Spermatogenesis* 2014;**4**:e28460.
- Qian C, Zhou M-M. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 2006;**63**:2755–2763.
- Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014;**1839**:155–168.
- Ravel C, Chantot-Bastaraud S, El Houate B, Berthaut I, Verstraete L, De Larouziere V, Lourenço D, Dumaine A, Antoine JM, Mandelbaum J, *et al.* Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. *Mol Hum Reprod* 2007;**13**:461–464.
- Reynold N, Schwartz BE, Delvecchio M, Sadoul K, Meyers D, Mukherjee C, Caron C, Kimura H, Rousseaux S, Cole PA, *et al.* Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. *EMBO J* 2010;**29**:2943–2952.
- Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 2003;**423**:145–150.
- Richmond TJ, Finch JT, Rushton B, Rhodes D, Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* 1984;**311**:532–537.
- Robinson PJJ, Fairall L, Huynh VAT, Rhodes D. EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:6506–6511.
- Robinson PJJ, Rhodes D. Structure of the “30 nm” chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* 2006;**16**:336–343.
- Rogenhofer N, Dansranjav T, Schorsch M, Spiess A, Wang H, Schönfeldt V von, Cappallo-Obermann H, Baukloh V, Yang H, Paradowska A, *et al.* The sperm protamine mRNA ratio as a clinical parameter to estimate the fertilizing potential of men taking part in an ART programme. *Hum Reprod* 2013;**28**:969–978.
- Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 2012;**7**:1098–1108.
- Rothballer A, Kutay U. The diverse functional LINC of the nuclear envelope to the cytoskeleton and chromatin. *Chromosoma* 2013;**122**:415–429.
- Rothballer A, Schwartz TU, Kutay U. LINCing complex functions at the nuclear envelope: what the molecular architecture of the LINC complex can reveal about its function. *Nucleus* 2013;**4**:29–36.

- Saha P, Mishra RK. Heterochromatic hues of transcription-the diverse roles of noncoding transcripts from constitutive heterochromatin. *FEBS J* 2019;**286**:4626–4641.
- Saitou M, Kurimoto K. Paternal nucleosomes: are they retained in developmental promoters or gene deserts? *Dev Cell* 2014;**30**:6–8.
- Samans B, Yang Y, Krebs S, Sarode GV, Blum H, Reichenbach M, Wolf E, Steger K, Dansranjav T, Schagdarsurengin U. Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell* 2014;**30**:23–35.
- Sarasa J, Enciso M, García L, Leza A, Steger K, Aizpurua J. Comparison of ART outcomes in men with altered mRNA protamine 1/protamine 2 ratio undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular spermatozoa. *Asian J Androl* 2020;**22**:623–628.
- Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008;**9**:129–140.
- Schneider S, Balbach M, Jan F Jikeli null, Fietz D, Nettersheim D, Jostes S, Schmidt R, Kressin M, Bergmann M, Wachten D, *et al.* Re-visiting the Protamine-2 locus: deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile. *Sci Rep* 2016;**6**:36764.
- Schneider S, Shakeri F, Trötschel C, Arévalo L, Kruse A, Buness A, Poetsch A, Steger K, Schorle H. Protamine-2 Deficiency Initiates a Reactive Oxygen Species (ROS)-Mediated Destruction Cascade during Epididymal Sperm Maturation in Mice. *Cells* 2020;**9**..
- Shang E, Nickerson HD, Wen D, Wang X, Wolgemuth DJ. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 2007;**134**:3507–3515.
- Shiota H, Barral S, Buchou T, Tan M, Couté Y, Charbonnier G, Reynoird N, Boussouar F, Gérard M, Zhu M, *et al.* Nut Directs p300-Dependent, Genome-Wide H4 Hyperacetylation in Male Germ Cells. *Cell Rep* 2018;**24**:3477-3487.e6.
- Shires A, Carpenter MP, Chalkley R. New histones found in mature mammalian testes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;**72**:2714–2718.
- Shirley CR, Hayashi S, Mounsey S, Yanagimachi R, Meistrich ML. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from Tnp1- and Tnp2-null double mutant mice. *Biol Reprod* 2004;**71**:1220–1229.
- Simpson RT. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 1978;**17**:5524–5531.
- Singh J, Rao MR. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids in vitro. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal denaturation studies. *J Biol Chem* 1987;**262**:734–740.
- Singh J, Rao MR. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle. *Biochem Int* 1988;**17**:701–710.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003;**423**:825–837.
- Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E, Ward WS. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* 2005;**26**:272–280.

- Steger K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol (Berl)* 1999;**199**:471–487.
- Steger K, Fink L, Failing K, Bohle RM, Kliesch S, Weidner W, Bergmann M. Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Mol Hum Reprod* 2003;**9**:331–336.
- Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998;**4**:939–945.
- Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000;**6**:219–225.
- Stern L, Kleene KC, Gold B, Hecht NB. Gene expression during mammalian spermatogenesis. III. Changes in populations of mRNA during spermiogenesis. *Exp Cell Res* 1983;**143**:247–255.
- Stewart-Hutchinson PJ, Hale CM, Wirtz D, Hodzic D. Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res* 2008;**314**:1892–1905.
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;**403**:41–45.
- Sullivan R, Miesusset R. The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update* 2016;**22**:574–587.
- Sun X, Kovacs T, Hu Y-J, Yang W-X. The role of actin and myosin during spermatogenesis. *Mol Biol Rep* 2011;**38**:3993–4001.
- Sutton W. On the morphology of the chromosome group in *Brachystola Magna*. *Biol Bull* 1902;24–39.
- 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**:4684–4695.
- Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Gasser SM. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu Rev Genet* 2004;**38**:305–345.
- Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1115–1137.
- Thibault C, Levasseur M-C. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses.
- Torregrosa N, Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Shirley CR, Meistrich ML, Ballescà JL, Oliva R. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum Reprod* 2006;**21**:2084–2089.
- Tseden K, Topaloglu O, Meinhardt A, Dev A, Adham I, Müller C, Wolf S, Böhm D, Schlüter G, Engel W, *et al*. Premature translation of transition protein 2 mRNA causes sperm abnormalities and male infertility. *Mol Reprod Dev* 2007;**74**:273–279.
- Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P, Röpke A. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. *PLoS One* 2011;**6**:e19426.
- Ullas KS, Rao MRS. Phosphorylation of rat spermatidal protein TP2 by sperm-specific protein kinase A and modulation of its transport into the haploid nucleus. *J Biol Chem* 2003;**278**:52673–52680.

- 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.
- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem* 2018;**62**:2–10.
- Venkatesh S, Kumar R, Deka D, Deecaraman M, Dada R. Analysis of sperm nuclear protein gene polymorphisms and DNA integrity in infertile men. *Syst Biol Reprod Med* 2011;**57**:124–132.
- Vilfan ID, Conwell CC, Hud NV. Formation of native-like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. *J Biol Chem* 2004;**279**:20088–20095.
- Walport LJ, Hopkinson RJ, Schofield CJ. Mechanisms of human histone and nucleic acid demethylases. *Curr Opin Chem Biol* 2012;**16**:525–534.
- Wang X, Sha Y-W, Wang W-T, Cui Y-Q, Chen J, Yan W, Hou X-T, Mei L-B, Yu C-C, Wang J. Novel IFT140 variants cause spermatogenic dysfunction in humans. *Mol Genet Genomic Med* 2019;**7**:e920.
- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod* 2010;**16**:30–36.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991;**44**:569–574.
- Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;**171**:737–738.
- Wei Y-L, Yang W-X. The acroframosome-acroplaxome-manchette axis may function in sperm head shaping and male fertility. *Gene* 2018;**660**:28–40.
- Wu JY, Ribar TJ, Cummings DE, Burton KA, McKnight GS, Means AR. Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat Genet* 2000;**25**:448–452.
- Yassine S, Escoffier J, Martinez G, Coutton C, Karaouzène T, Zouari R, Ravanat J-L, Metzler-Guillemain C, Lee HC, Fissore R, et al. Dpy19l2-deficient globozoospermic sperm display altered genome packaging and DNA damage that compromises the initiation of embryo development. *Mol Hum Reprod* 2015;**21**:169–185.
- Yebra L de, Ballescà JL, Vanrell JA, Bassas L, Oliva R. Complete selective absence of protamine P2 in humans. *J Biol Chem* 1993;**268**:10553–10557.
- Yebra L de, Ballescà JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril* 1998;**69**:755–759.
- 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**:2173–2179.
- Yu J, Chen Z, Ni Y, Li Z. CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2012;**27**:25–35.
- Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;**97**:4683–4688.
- Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Höög C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 2000;**5**:73–83.

- Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 2013;**20**:259–266.
- Zhao M, Shirley CR, Hayashi S, Marcon L, Mohapatra B, Suganuma R, Behringer RR, Boissonneault G, Yanagimachi R, Meistrich ML. Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis* 2004;**38**:200–213.
- Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, Deng JM, Arango NA, Terry NH, Weil MM, *et al*. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* 2001;**21**:7243–7255.
- Zhong J, Peters AH, Kafer K, Braun RE. A highly conserved sequence essential for translational repression of the protamine 1 messenger rna in murine spermatids. *Biol Reprod* 2001;**64**:1784–1789.
- Zhou J, Du Y-R, Qin W-H, Hu Y-G, Huang Y-N, Bao L, Han D, Mansouri A, Xu G-L. RIM-BP3 is a manchette-associated protein essential for spermiogenesis. *Development* 2009;**136**:373–382.
- Zwettler FU, Spindler M-C, Reinhard S, Klein T, Kurz A, Benavente R, Sauer M. Tracking down the molecular architecture of the synaptonemal complex by expansion microscopy. *Nat Commun* 2020;**11**:3222.

ANNEXES

Supplemental Table 1: list of proteins identified as associated with TP2.

Eluates of TP2 (Pos) and negative control (Ctrl) co-immunoprecipitations performed from stage 12-16 spermatids from wild-type (WT) and H2A.L.2 ko (KO) mice were submitted to mass spectrometry-based proteomic analysis. The list present proteins identified with a minimum of two peptides and quantified only in eluates from TP2 immunoprecipitations or found enriched at least five times in these eluates compared to the control eluates, based on extracted iBAQ values.

Protein names	Mol. weight [kDa]	Gene names	Unique peptides	iBAQ WT-Pos iBAQ WT-Ctrl	/ iBAQ KO-Pos iBAQ KO-Ctrl	Majority protein IDs	Unique sequence coverage [%]	iBAQ WT-Ctrl	iBAQ WT-Pos	iBAQ KO-Ctrl	iBAQ KO-Pos	
Nuclear transition protein 2	13,117	Tnp2	4	WT-Pos only	5622,8	Q91XK4;P11378	42,7	0	125550000	20303	114160000	
Protamine 2;PP2-A;PP2-C;PP2-D;PP2-B	13,638	Prm2	2	WT-Pos only		Q545M0;C3U150;C3U1	27,1	0	1555300	0	1902600	
histone H4	11,367	Hist2h4;Hist1h4a	5		1466,1	B2RTM0;P62806	27,2	193380	283520000	232010	221740000	
histone H1.1	21,785	Hist1h1a	12	WT-Pos only		P43275	38	0	151030000	0	132970000	
histone H3.3;histone H3.3C;histone H3;histone H3.3K;H3f3a;H3f3c;Hist1h3e5	15,328	H3f3a;H3f3c;Hist1h3e5	5		18873,9	P84244;P02301;E0CZ27	44,9	7488,1	141330000	11859	117830000	
Spermatid-specific linker histone H1-like protein	18,86	Hils1	12		838,5	I6UA94;I6TS03;Q5SWB	66,5	128400	107660000	69480	56353000	
Testis-specific H1 histone	44,399	H1fnt	9	WT-Pos only		Q8CJI4	21,4	0	57921000	0	40703000	
histone H1.4	21,977	Hist1h1e	5	WT-Pos only		P43274	15,5	0	49196000	0	39411000	
histone H1t (histone cluster 1, H1t)	21,669	Hist1h1t	3		7806,0	KO-Pos only	I7HFT9	6207,9	48459000	0	22522000	
histone H2B type 1-A;histone H2B (TH2B)	14,236	Hist1h2ba	4	WT-Pos only		P70696;A0JN59	29,9	0	21118000	0	20450000	
histone H1.5	22,445	Hist1h1b	8	WT-Pos only		Q1WWK3;P43276	26,1	0	20253000	0	10970000	
histone H1.2	21,266	Hist1h1c	3	WT-Pos only		Q5S2A3;P15864	9,9	0	6405100	0	20095000	
Core histone macro-H2A.1	39,735	H2afy	17	WT-Pos only		Q9QZQ8	46	0	21462000	0	20200000	
histone H1.0;histone H1.0, N-terminally processed	19,253	H1f0	5	WT-Pos only		Q8C1Q3;Q3U4Y0;P1091	28,5	0	4906100	0	5018700	
histone H2A;histone H2A.1;histone H2A.2	13,509	H2afv;H2afz	2	WT-Pos only		B2RVP5;Q3THW5;POCO	18,8	0	5234300	0	4204900	
histone H2A;histone H2A type 1-H;histone H2A.1	13,66	Hist1h2ah;Hist1h2aa;	2	WT-Pos only		ADA0N4SV66;A0AU1;	14,3	0	3005200	0	2374300	
histone H2A-Bbd type 1;histone H2A (H2A.L.2)	12,842	H2afb1;Gm6026	2	WT-Pos only		Q9CQ70;A9Z055	19,8	0	42273700	0	137190	
histone H2B type 3-A;histone H2B type 3-B;histone H2B type 3-C	13,994	Hist3h2ba;Hist3h2bb;	2	WT-Pos only		Q9D2U9;Q8CGP0;Q645	7,9	0	1647400	0	1244500	
Core histone macro-H2A.2;Core histone macro-H2A.1	40,092	H2afy2	8	WT-Pos only		Q8CCQ0;Q8BPF1	32,5	0	762770	0	618870	
histone H2B type 1-P;histone H2B;histone H2B type 1-K	13,992	Hist1h2bp;Hist1h2bj;	3	WT-Pos only		Q8CGP2;A0JLV3;B2RVD	19,8	0	416360	0	114840	
histone-binding protein RBBP4	47,655	Rbbp4	3	WT-Pos only		Q60972	12,9	0	241430	0	236220	
histone H2B subacrosomal variant	14,197	Sub2bv	2	WT-Pos only		Q9D9Z7	23,6	0	162380	0	133310	
ATPase family AAA domain-containing protein 2	155,28	Atad2	6	WT-Pos only		G3X963;Q8CDM1	7,7	0	21104	0	35175	
Centromere protein V	27,541	Cenpv	8		14672,1	Q9CX54	49,6	843,98	12383000	13384	15025000	
histone acetyltransferase;histone acetyltransferase	53,554	Kat7	3	WT-Pos only		Q3UGU8;Q3TD41;Q3U1	10,5	0	104430	0	159060	
histone-lysine N-methyltransferase SUV39H2	42,801	Suv39h2	2	WT-Pos only		Q3TNH3;F6WB49;A0AC	6,1	0	88423	0	57448	
40S ribosomal protein SA	32,85	Rpsa	19	WT-Pos only		B2CY77;P14206	64,4	0	204560000	0	192220000	
60S ribosomal protein L4	47,153	Rpl4	29		880,9	Q564E8;Q9D8E6;Q9CS	54,2	164000	144460000	264200	128910000	
40S ribosomal protein S8	24,205	Rps8	10		11093,6	Q497E9;P62242;Q5M9J	54,3	12884	142930000	0	122680000	
60S ribosomal protein L6	33,509	Rpl6;Gm5428	16	WT-Pos only		Q3UCH0;P47911;E9PUJ	47,3	0	122510000	0	131820000	
60S ribosomal protein L14	26,316	Rpl14;Rpl14-ps1	5		64357,9	Q9CWK0;Q9CR57;Q565	24,7	1530,8	98519000	0	106870000	
Ribosomal protein;60S ribosomal protein L10a	24,831	Rpl10a	10		22016,2	Q5XIF6;Q3USE1;P5302	39,6	4903,2	107959000	5664,2	90841000	
60S ribosomal protein L3	46,079	Rpl3	16		10483,8	Q3UB90;Q3UB67;Q3UE	37,7	5472,9	57377000	0	66873000	
60S ribosomal protein L13	24,305	Rpl13	8	WT-Pos only		P47963;Q5RKP3	35,1	0	55325000	0	59067000	
Ribosomal protein L19;60S ribosomal protein L12	23,247	Rpl19	5	WT-Pos only		A2A547;Q5OTI8;P8409	22,2	0	54260000	2467,3	47486000	
60S ribosomal protein L13a	23,464	Rpl13a	7	WT-Pos only		Q5M9M0;P19253;Q3TI	30,5	0	61029000	0	34242000	
Glutathione peroxidase;Phospholipid hydroperoxide	19,522	Gpx4;PHGPx	10		465,4	Q3TI34;Q5XIZ8;Q76LVC	53,5	92071	42853000	91674	39373000	
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a;Ubiquitin	17,951	Rps27a;Ubc;Gm8797;	6		169,4	Q642L7;P62983;A5UJZ	151,3	269800	45704000	850610	36945000	
Polyadenylate-binding protein;Polyadenylate-binding	70,64	Pabpc1	18		1573,4	Q3UBU8;P29341;Q8BN	30	24811	39037000	0	35631000	
Ribosomal protein L15;60S ribosomal protein L12	24,146	Rpl15;Gm10020	8	WT-Pos only		Q5M8Q0;Q3U7D2;E9Q	36,3	0	32332000	217280	29970000	
60S ribosomal protein L7	31,419	Rpl7	15		7,2	Q5M9N8;Q3UBI6;P141	41,9	4404500	31658000	84248	29901000	
60S ribosomal protein L7a	30,024	Rpl7a;Gm4978	14	WT-Pos only		Q6P1A9;Q5EBG5;Q58E	38,3	0	29746000	0	26621000	
60S ribosomal protein L18	21,643	Rpl18	7	WT-Pos only		Q642K1;Q58EW0;P359	29,3	0	29118000	0	25220000	
60S ribosomal protein L8	28,066	Rpl8	6	WT-Pos only		Q3UI50;P62918;Q9Z23	33,5	0	28577000	0	23942000	
Eukaryotic initiation factor 4A-III;Eukaryotic initiation	46,839	Eif4a3;Gm8994	18	WT-Pos only		Q91VC3;ADA0N4SV8;	43,8	0	22850000	40765	29421000	
60S ribosomal protein L5	34,4	Rpl5	14		2711,0	Q58EUG;Q3UB80;P479	40,1	10158	27538000	0	23169000	
40S ribosomal protein S3	26,674	Rps3	17		5361,9	Q5YLW3;P62908;Q9D0	66,3	4582,7	24572000	0	23669000	
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta	35,076	Gnb2l1	19		7836,5	KO-Pos only	P68040	3145,4	24649000	0	20977000	
40S ribosomal protein S6	28,667	Rps6	9		4571,7	Q8B709;Q5BLK1;P6275	26,1	5113,9	23379000	4338,2	21611000	
40S ribosomal protein S2	25,104	Rps2;Gm18025;Gm57	9	WT-Pos only		Q9DC49;Q58EU3;Q3TX	45,1	0	23971000	0	20659000	
40S ribosomal protein S3a	29,885	Rps3a1;Rps3a	12		210,0	Q564F3;Q3UAU2;Q3U5	51,9	105160	22085000	78087	21835000	
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	36,905	Hnnpcc	12	WT-Pos only		Q3UB67;Q9Z204	28,1	0	18256000	0	19999000	
40S ribosomal protein S14	16,301	rps14;Rps14	9		9207,9	Q70569;P62264;D3YVF	41,1	2292,5	21109000	14685	16289000	
60S ribosomal protein L22	14,759	Rpl22	4		1355,0	Q4VAG4;P67984	50,8	13858	18777000	0	16762000	
Protein FAM718	68,312	Fam71b	22		696,9	B9EKM7;B7XG48;Q5ST	43,9	25743	17941000	0	13500000	
40S ribosomal protein S18	17,718	Rps18;Gm10260	8		2764,4	Q561N5;P67VP7;P6227	43,4	5479,4	15147000	4147,8	11642000	
40S ribosomal protein S20	13,373	Rps20	4		1129,7	Q5BLK2;P60867	23,5	12459	14075000	0	12173000	
UAP56-interacting factor	35,887	Fyttd1	9	WT-Pos only		Q91249	40,7	0	11234000	0	12503000	
Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	49,83	Tubb4b;Tubb4a	3		664,9	P68372;Q9D6F9;Q9DC	9,9	19329	12852000	15582	9500000	
60S ribosomal protein L20	12,656	Rpl30	5	WT-Pos only		Q497D7;Q58DZ3;P628	51,8	0	10622000	0	10390000	
Testis-expressed sequence 101 protein	26,998	Test101	5		110,1	Q9JMI7;Q076U5	26,8	115480	12717000	42158	8081000	
Eukaryotic translation initiation factor 6	26,511	Eif6	8	WT-Pos only		Q545K4;Q3UBI6;Q3UA	50,6	0	9728800	0	9840000	
60S ribosomal protein L27	15,798	Rpl27	4	WT-Pos only		Q5BLU9;P61358;Q9C5M	36	0	10518000	0	8273400	
60S ribosomal protein L12	17,804	Rpl12	6		235,6	Q5BLK0;Q3TIQ2;P3597	54,5	42737	10070000	0	8359500	
40S ribosomal protein S9	22,591	Rps9	9		9928,3	Q6ZWN5;F7CIS8;D3YW	30,9	993,25	9861300	0	8378400	
60S ribosomal protein L36	12,254	Rpl36	5	WT-Pos only		Q6ZW24;Q5M9L1	30,5	0	10846000	0	7370300	
60S ribosomal protein L27a	16,605	Rpl27a	4	WT-Pos only		P14115	29,1	0	10248000	0	7811000	
60S ribosomal protein L18a	20,633	Rpl18a	7	WT-Pos only		5787,8	Q3THJ0;P62717	32,4	0	8878000	1430	8276600
60S ribosomal protein L24	18,252	Rpl24	6	WT-Pos only		Q3UW40;Q8BPE7;Q8B	31,2	0	10462000	0	6204200	
Deleted in azoospermia-like	33,34	Dazl	9	WT-Pos only		Q499F1;Q64368;Q3TU	37,9	0	9140300	0	7320800	
RNA-binding protein Raly	31,198	Raly	9	WT-Pos only		Q3U3F6;A2AU62;Q640	31,8	0	7810200	0	7918000	
40S ribosomal protein S25	13,742	Rps25	4	WT-Pos only		Q58EA6;P62852	24	0	9404200	0	6108300	
40S ribosomal protein S26	13,015	Rps26	3	WT-Pos only		Q497N1;P62855	31,3	0	8287900	0	7001600	
40S ribosomal protein S16	16,445	Rps16	8	WT-Pos only		A4FUS1;Q641N3;Q5C2	45,2	0	7233900	0	7069600	
Y-box-binding protein 2	38,08	Ybx2	3	WT-Pos only		B2RUF0;Q9Z2C8;Q3TTC	17	0	6774800	0	6136800	
60S ribosomal protein L23a	16,94	Rpl23a	5	WT-Pos only		Q91YK6;Q4V9X9;Q5M	38,9	0	7158300	0	5654300	
60S ribosomal protein L29	16,966	Gm17669;Gm3550;Rp	2	WT-Pos only		F6QL70;Q4V9X7;Q5M	12,3	0	8258900	0	4311300	
60S ribosomal protein L31	14,411	Rpl31	4	WT-Pos only		Q9CY93;Q5M9K9;P629	36	0	7139100	0	5362700	
Regulator of nonsense transcripts 1	123,97	Upf1	44	WT-Pos only		Q9EPU0	47,9	0	5869900	0	6041700	
US small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	39,275	Snmp40	13	WT-Pos only		Q6PE01;Q3UFK4	53,9	0	5696800	0	6013600	
Dipeptidase 3	54,246	Dpep3	17		57,7	182,0	Q9DA79	96473	5570400	34140	6212400	
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	73,74	Hnnpmm	21	WT-Pos only		Q3THB3;Q9D0E1;B8IK	41,7	0	5205500	0	6171800	
60S ribosomal protein L21	18,579	Rpl21	4	WT-Pos only		Q9CQM8;Q4VAZ8;O09	27,5	0	5941100	0	5415200	
Outer dense fiber protein 2	75,522	Odf2	20		5168,5	KO-Pos only	A3KGV9;V9GX20;A3KG	30,3	1390,7	7187800	0	4128200
40S ribosomal protein S13	16,142	Rps13	4	WT-Pos only		Q921R2;Q5BLU7;P6230	21,4	0	6116100	4235,3	4845100	
60S acidic ribosomal protein P2	11,651	Rplp2	7	WT-Pos only		P99027	86,1	0	4810300	0	5975100	
Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent	34,371	Prkr	8	WT-Pos only		P9WXT2	32,9	0	6233600	0	4169000	
Outer dense fiber protein 1	27,622	Odf1	9	WT-Pos only		A6H656;Q61999	38,3	0	6127700	0	4115000	
40S ribosomal protein S15a	14,839	Rps15a	5	WT-Pos only		Q5M9M4;P62245;F8W	46,2	0	5481700	0	4756900	
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	33,546	Ybx1	8	WT-Pos only		Q71V06;Q810K5;Q609	35,1	0	5703600	0	4206800	
60S ribosomal protein L10-like	24,558	Rpl10l	2	WT-Pos only		P86048	6,1	0	6401400	0	3473800	
40S ribosomal protein S17	15,524	Rps17	6	WT-Pos only		Q5M9L7;Q8B709;P632	49,6	0	5513200	0	3959400	
Pwi-like protein 1	98,573	Pwi1l	40		398,6	KO-Pos only	Q9JMB7;A0A0G2IEK6	56,4	11648	4642700	0	4814700
40S ribosomal protein S19	14,896	Rps19	6	WT-Pos only		D3YUT3;D3YUG3;Q5M	33,1	0	5363600	0	3849600	
Tubulin alpha-3 chain	49,959	Tuba3a	2									

Biglycan	41,639	Bgn	14	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TNY9;P28653;Q3UXI 46,1	0	4675400	0	4117900
40S ribosomal protein S11	17,497	Rps11	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D0P6;Q3UCQ2;Q9DE 37,7	0	4713500	0	3881700
Pre-mRNA-processing factor 19	55,238	Prpf19	12		KO-Pos only	Q99KP6	39,5	10770	3533500	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F;Het45,729	55,238	Hnrmf	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q922X1;J3QMT0;J3QM 29,9	0	5928800	0	2624000
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 96,001	55,238	Hnrmpl1	25	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8VDM6	32,4	0	4095500	0
Elongation factor 1-gamma	50,06	Eef1g	9			Q4FZK2;Q8D8N0;Q8R1 23,6	21890	3773400	5853,1	4554100
60S ribosomal protein L11	20,266	Gm10036;Rpl11;Gm54		WT-Pos only	KO-Pos only	E9PYL9;Q9CXW4;Q8VC 27	0	4022000	0	4052200
Heat shock-related 70 kDa protein 2	69,641	Hspa2	13			P17156;B7U582	29,4	159890	4003300	29085
60S ribosomal protein L28	15,709	Rpl28	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5M9N5;Q5M9J8;P411 21,2	0	4405300	0	3323300
60S ribosomal protein L9	21,881	Rpl9	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5EBQ6;P51410;A0A0C 48,4	0	3659000	0	3635400
60S ribosomal protein L26	17,258	Rpl26	4			Q4FZH2;P61255;B1ARA 24,1	8847,8	3887700	0	3281800
40S ribosomal protein S4	29,184	Rps4l	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3V1Z5	16,8	0	3432800	0
60S ribosomal protein L17	21,397	Rpl17	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6ZWZ7;Q6PHZ1;Q505 18,5	0	4366500	0	2351200
60S ribosomal protein L32	15,874	Rpl32	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5PR09;P62911	28,9	0	3524200	0
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein com	109,36	Eftud2	36	WT-Pos only		Q543F1;Q3UC5Q3;Q3TM 51	0	2541700	1262,8	4015100
40S ribosomal protein S12	14,515	Rps12	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6ZWZ6;P63323	63,6	0	2935300	0
Splicing factor 3B subunit 3	135,55	Sf3b3	36	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RSV4;Q21M13	42	0	2363300	0
Nucleolar protein 58	60,342	Nop58	14	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6DFW4;A0A0AQM071 38,6	0	3071000	0	3065200
Vimentin	53,687	Vim	21			Q5FWJ3;Q3U6A2;P201 47,6	985,95	3086200	0	2844100
Protein boule-like	31,009	Boll	5	WT-Pos only	KO-Pos only	G3UYE8;E9QPQ9;Q924 17,4	0	3325800	0	2524500
60S ribosomal protein L23	14,865	Rpl23	5	WT-Pos only	KO-Pos only	P62830	39,3	0	3173200	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H;Het49,199	14,865	Hnrmph1	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Q811L7;Q8C2Q7;Q357 36,3	0	2868300	0	2842600
40S ribosomal protein S28	6,3442	Rps28;Gm10263	2	WT-Pos only	KO-Pos only	G3UYV7;Q205F1;P6285 37,5	0	2980500	0	2694200
Heterochromatin protein 1-binding protein 3	56,824	Hp1bp3	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Z4YKA3;Z4YKB8;Q3TEA 25,2	0	3170800	0	2325000
RNA-binding protein 14	69,448	Rbm14;p16	10			Q8C2Q3;Q205F1;EQQL 27,2	0	2045900	0	3220600
40S ribosomal protein S23	15,835	Rps23	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CW19;Q497E1;Q9C2 34,3	0	2722500	0	2453800
40S ribosomal protein S24	15,325	Rps24	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D7P1;Q9CV61;Q5M5 29,5	0	2795100	0	2302700
Serine beta-lactamase-like protein LACTB, mitoc	60,634	Lactb	12	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80UJ8;B2RW12;Q9EP 23,8	0	2383800	0	2612300
40S ribosomal protein S21	8,88	mCG_6739;Rps21	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8C1L7;Q9CQR2	49,4	0	2927700	0
Matrin-3	94,629	Mtr3	15	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5L818;Q4F7T0;Q3TTX 28,1	0	1728300	0	2806700
RISC-loading complex subunit TARBP2	26,108	Tarbp2	8	WT-Pos only	KO-Pos only	D3YZ55;P97473;D3Z28 38,3	0	2233700	0	2222400
Nucleolar protein 56	64,586	Dcn	19	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UIZ7;Q9D6Z1;Q3US 47,2	0	2158100	0	2267700
Decorin	39,809	Dcn	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UKR1;Q3T5V1;P2865 29,9	0	1986000	0	2416900
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	273,61	Prpf8	77			Q99PV0	39,6	13740	1588900	11930
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa heli	244,54	Snmp200	70			Q6P4T2	42,7	405,62	1508400	0
mRNA turnover protein 4 homolog	27,545	Mtr4;mg684	10	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AMU9;Q9D0I8;A2AK 43,9	0	2185600	0	1992300
MCG55287 (Protein Cyp12)	13,156	Cyp12	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DA06	10,9	0	2504400	0
SURP and G-patch domain-containing protein 2	118,1	Sugp2	34	WT-Pos only		Q8CH09	45,1	0	1737800	1804,6
WD40 repeat-containing protein 5MU1;WD40 re	57,543	Smu1	13	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UKJ7	29,2	0	1623900	0
40S ribosomal protein S10	18,916	Rps10	4			Q5M9K7;Q3U9P0;P633 23,6	11703	1455700	0	2581200
60S ribosomal protein L37a	8,9946	Rpl37a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5M9N6;Q4VAF2;Q3U 36,6	0	2331900	0	1672900
SNW domain-containing protein 1	61,461	Snw1	13			A0A084J1E2;Q9CSN1;C 34,7	2754,4	1889500	0	2077100
60S acidic ribosomal protein P1	11,475	Rplp1;Gm10073	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q58E35;P47955;E9Q3T 66,7	0	1592800	0	2314900
MICOS complex subunit Mic19	22,342	Chchd3	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91VG6;Q9CR89;S4R2 20,4	0	2332800	0	1475400
Splicing factor 3A subunit 1	88,544	Sf3a1	19			Q8K4Z5;Q3TVM1	33	3335,2	1597600	0
Nucleolar GTP-binding protein 1	52,107	Gtbbp4	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TPP4;Q3UR29;Q99M 24,7	0	1789500	0	1975000
Sorting and assembly machinery component 50	151,863	Samm50	12			Q8BGH2	35,2	7271,8	2462100	9786,8
Splicing factor 3A subunit 3	58,841	Sf3a3	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8E59;Q9D554	22	0	1449000	0
MCG123871 (Protein Tekt5)	62,734	Tekt5	19			G5E8A8;D5HP88;Q1481 46,5	3657,3	1847800	21676	1643000
Ecto-ADP-ribosyltransferase 3	40,775	Art3	8			B7ZNM3;E9QNU1;E9Q 28,3	7731,3	1742300	0	1659700
Elongation factor 1-alpha;Elongation factor 1- α	50,113	Eef1a1	7			Q58E64;Q3UA81;P101 22,1	240780	1536400	50665	2109400
Splicing factor 3B subunit 1	145,83	Sf3b1	33			G5E866;Q99N89;Q3US 34	23283	1241700	0	2122900
U2 small nuclear ribonucleoprotein A	28,357	Snrpa1	8	WT-Pos only	KO-Pos only	P57784;G5E883;Q8BSH 31,4	0	1347000	0	1921700
40S ribosomal protein S7	21,882	Gm9493;Rps7	7	WT-Pos only		F6SVV1;Q4FZ6E;P6208 46,4	0	1173300	16448	2066400
Ras-related protein Rab-2A;Ras-related protein F	23,547	Rab2a;Rab2b	9			Q0PD65;P53994;Q8BX 45,8	11488	1718700	4737,4	1332000
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding pr	22,702	Serbp1	4	WT-Pos only		A0A0N45WH2;A0A0N4 29,9	0	1529000	5827,5	1509000
60S ribosomal protein L10	23,072	Rpl10	2	WT-Pos only	KO-Pos only	I7HLV2;Q3THU6;Q6ZW 7	0	1973200	0	829540
Voltage-dependent anion-selective channel prot	30,446	Vdca2	7			G3UX26;Q60930;D3YZ 32,9	30562	1979400	2957,4	853780
Poly(rC)-binding protein 1	37,497	Pcbp1	7	WT-Pos only	KO-Pos only	P60335	30,1	0	1125500	0
40S ribosomal protein S29	6,6767	Rps29	2	WT-Pos only	KO-Pos only	P62274	32,1	0	1424200	0
mRNA export factor	37,636	Rae1	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CBU3;Q8C570;A2AS 34,9	0	1312000	0	1376400
Serine protease 46	35,185	Prss46	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5M852;F6U6W2	15,6	0	1500300	0
Nuclear cap-binding protein subunit 1	91,926	Ncbp1	17	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UYV9;Q3TUK3	27,5	0	1102500	0
Heat shock cognate 71 kDa protein	60,801	Hspa8	9			Q3UDS0;Q3UBA6;Q3T2 23,1	35933	1283500	0	1363000
U2 snRNP-associated SURP motif-containing prot	118,26	U2surp	5			Q6NV83	5,7	3345,9	1421000	941,84
Transformer-2 protein homolog beta	21,935	Tra2b	4			F8WJG3;Q5PR75;P6295 30,9	6346,3	969950	0	1568600
Nucleoporin 153	152,07	Nup153	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80WR0;E9QJG8;Q8BI 5,4	0	37581	0	2416400
Protein Gm14569	181,03	Gm14569	29	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q0C6	26,5	0	1281500	0
Splicing factor 3b, subunit 2	98,183	Sf3b2	12	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80W39;Q3UIB0;Q3UE 18,1	0	981670	0	1254300
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	13,985	Snrpd3	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91VM2;P62320	53,2	0	1011900	0
Serine/arginine-rich splicing factor 5;Serine/argi	30,978	Srsf5;Srsf4;Srsf6	10			Q9D855;Q35326;Q5U4 8,9	66975	944790	4096,4	1275400
Lupus La protein homolog	47,657	Ssb	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BTU4;Q564E6;Q3TG 28,9	0	925750	0	1188400
Tubulin beta-3 chain;Tubulin beta-6 chain	50,418	Tubb3;Tubb6	3			Q9ERD7;Q9CR70;Q3U9 9,3	3251,8	1509300	0	606870
Myelin expression factor 2	63,294	Myef2	12			Q8C854;G8JL68;A7UQY 32,3	580,42	939390	0	1115300
Tudor domain-containing protein 6	238,01	Tdrd6	39			F2Z429;E9P250;B7ZNI 25,6	10312	1097200	17666	980500
A-kinase anchor protein 4	93,795	Akap4	20			A1L3T6;Q60662;Q9Z26 31,6	660,93	1245600	0	751100
Proteasome subunit alpha type;Proteasome sub	28,49	Psm3a3	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DCD8;Q58E4V;Q704 25,1	0	1138700	0	839100
Calicin	66,749	Ccin	13	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RV51;Q8CDE2	29,3	0	1013000	0
Piwi-like protein 2	109,49	Piwi2	27	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CDG1	33,3	0	967610	0
U2 small nuclear ribonucleoprotein B	16,009	Snrpb2	2	WT-Pos only		A2CES4;Q9CQI7	18,9	0	959570	65018
Ribosome biogenesis regulatory protein homolo	42,318	Rrs1	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80U76;Q9CYH6	12,1	0	979320	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	50,564	Hnrmpl	8	WT-Pos only	KO-Pos only	G3UY38;G5E924;Q8R0 28,5	0	820860	0	1070700
Bystin	49,783	Bystn	10	WT-Pos only	KO-Pos only	O54825;Q543N4	29,1	0	902140	0
rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	34,375	Fbl	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UIJ52;P35550	23,5	0	1011500	0
Protein FAM166A	36,612	Fam166a	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D4K5	26	0	1090100	0
MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosph	36,265	Nifk	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91VE6	34,1	0	937510	0
Nicotinamide-nucleotide adenyllyltransferase;Nic	32,197	Nmnat1	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3V455;Q3V449;Q9EP 21,4	0	937430	0	890340
Proteasome inhibitor Pi31 subunit	26,073	Psmf1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	A2VCP7;A2AU35;Q8BH 21,8	0	867600	0	946650
Erlin-2	37,872	Erlin2	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BFZ9	23,5	0	874780	0
Actin, alpha cardiac muscle 1;Actin, aortic smoo	41,946	Actc1;Acta2;Actg2;Act	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CXK3;Q497E4;Q3UIJ 20,2	0	813830	0	990180
Nucleoporin NUP53	34,785	Nup35	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8R466;A2ATJ2	33,5	0	847970	0
Ly6/PLAUR domain-containing protein 4	26,996	Lypd4	4			Q8BVP6	20,3	7516	952500	0
KRR1 small subunit processome component hom	36,66	Krr1	5	WT-Pos only	KO-Pos only	G3UAZ0;Q8BGA5	18,6	0	772690	0
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	80,11	Thrap3	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BZN7;Q56926;Q8BV 17,3	0	722790	0	1003900
Putative helicase MOV-10	113,55	Mov10	19	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UD86;Q3TFC0;D3Z3 27,1	0	905590	0	812750
60S ribosomal protein L38	8,2038	Rpl38	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q52KP0;Q9JH18	48,6	0	866740	0
Calcium-binding tyrosine phosphorylation-regul	41,306	Cabyr	6			Q3KNNH;Q9D424	23,4	1239,2	1059700	0
28S ribosomal protein S35, mitochondrial	35,917	Mtprs35	4	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J0L6;Q8BIZ4	16,2	0	934450	0
Testis-specific serine/proline-rich protein	31,115	St6galnac2	6	WT-Pos only	KO-Pos only	C0I8I2	36	0	969560	0
Enhancer of rudimentary homolog	12,259	Erh	3			Q4FZH7;P84089;G3UW 37,5	10041	899520	28922	764470

Poly(rC)-binding protein 2	38,15	Pcbp2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	B2M1R7;Q61990;Q3TFI6,6	0	814360
Proteasome subunit alpha type;Proteasome sub	26,411	Psma5;Gm8394	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UPK6;Q3TUX3;Q3TU28,2	0	968430
La-related protein 1	121,15	Larp1	19			24Y1J3;Q6ZQ58;Q3BU324,6	5341,3	737070
U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 ho	61,217	Utp18	8			Q3U3Q3;Q5SSI6;Q8BH19,7	5228,1	735380
Polyadenylate-binding protein	66,472	Pabpc2	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q792Y0;Q62029	22,7	924370
Ribosomal RNA-processing protein 7 homolog A	32,356	Rrp7a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U5H9;D3U0D6;Q9D11,1	0	687850
Spermatid-associated protein	48,692	Spert	9	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q4B1;Q32MG2	27,9	805640
TATA-box-binding protein;TATA box-binding pro	23,456	Tbp;Tbp2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	F6XYI9;F8WJ67;Q6RI65,10,1	0	849900
RNA-binding motif protein, Y chromosome, fami	43,241	Gm21693;Rbmy1a1;G	9			21,1		46344
78 kDa glucose-regulated protein	72,422	Hspa5	10			Q9DC41;Q3U9G2;Q3TV20		74379
Cell division cycle 5-like protein	92,188	Cdc5l	16			Q3UCF2;Q6A068	29,1	22793
Family with sequence similarity 71, member D (G	44,866	Fam71d	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80W24;D3YV92	21,1	0
Pleiotropic regulator 1	56,937	Plrg1	12	WT-Pos only	KO-Pos only	Q922V4;D3Z4V1;F8WJ341,3	0	575110
39S ribosomal protein L38, mitochondrial	45,029	Mrpl38	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K2M0	26,3	0
Fibrinogen gamma chain	49,391	Fgg	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UEM7;Q3UER8;Q8V14,7	0	554750
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA h	79,97	Dhx15	12			Q497W9;Q3UKI6;Q3TF21,2	3670,3	547920
Pre-mRNA-splicing factor ISY1 homolog	10,956	Isy1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0N4SV90;A0A0N4S1	24,2	0
Protein Glipr11	27,074	Glipr11	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DAG6	8,5	723910
Casein kinase II subunit alpha	45,179	Csnk2a1	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q61177;Q60737;Q9D020,5	0	781910
MCG142036 (Protein Acad12)	61,389	Acad12	4	WT-Pos only	KO-Pos only	D3Z7X0;D3Z2B3	8,5	0
Voltage-dependent anion-selective channel prot	30,752	Vdac3	7			Q3TX38;Q3TTN3;Q60930,4	20327	886180
Tudor domain-containing protein 1	129,69	Tdrd1	18	WT-Pos only		Q99MV1	23,5	0
La-related protein 4	79,762	Larp4	9	WT-Pos only	KO-Pos only	G3X9Q6;Q8BWW4;Q3L16,6	0	657810
Proteasome subunit alpha type-6	27,372	Psma6	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9QUM9;E0CX81	38,2	0
Small nuclear ribonucleoprotein E	10,803	Snrpe	2	WT-Pos only	KO-Pos only	P62305;E9Q0W8;E9Q4I25	0	560070
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	13,281	Snrpd1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	P62315	10,9	0
RNA 3'-terminal phosphate cyclase-like protein	40,806	Rcl1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3THS8;Q9JJT0	11,5	0
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	294,84	Srrm2	19	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BTI8	11,5	0
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	41,192	Mrps22	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CXW2	12	0
Guanine nucleotide-binding protein (i) subunit	40,489	Gnai2	4	WT-Pos only		P08752;A0A0A6YWA9	15,5	0
Tektin-3	56,672	Tekt3	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5XS55;Q6XG27	25,9	0
Small nuclear ribonucleoprotein-associated prot	24,614	Snrpn;Snrpb	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UN87;P27048;P631621,7	0	541600
Galactocerebrosidase	77,256	Galc	4	WT-Pos only	KO-Pos only	P54818;Q3TT11	6,7	0
Rbm31x protein (Fragment)	38,487	Gm4916	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A9Z056	14,7	0
Elongation factor 1-delta	72,93	Eef1d	6	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J1E2;E9QN08;Q	13,9	0
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	46,895	Rbm22	6			Q8BH53	18,3	39002
Fibrinogen beta chain;Fibrinopeptide B;Fibrinog	54,752	Fgb	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TGR2;Q8K0E8	16,6	0
28S ribosomal protein S30, mitochondrial	49,939	Mrps30	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D0G0	25,8	0
La-related protein 7	64,705	Larp7	8			I3PQW3;Q05CL8	18,8	15328
Lamin-B1	66,785	Lmnb1	12			P14733;Q8C553	26,5	17162
Ribosome production factor 2 homolog	29,66	Rpf2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	S4R1Y5;G3X926;Q9JJ80	16	0
FLYWCH-type zinc finger-containing protein 1	77,095	Flywch1	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CI03	23,2	0
Nuclear pore complex protein Nup93	93,28	Nup93	16	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BJ71;Q3TFC8	26,9	0
Disintegrin and metalloproteinase domain-conta	84,534	Adam5	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TTE0;F6S1B5	14,2	0
Bcl-2-associated transcription factor 1	67,703	Bclaf1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A087WRN1;Q3TS20;	5,7	0
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E	33,448	Ppie	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9QZH3	15,9	0
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2	13,527	Snrpd2;Gm5449	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q14AF6;P62317;D3Z5N39,8	0	481550
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	57,992	Hnrnp9;Gm28062	5			360,1		6368,1
G kinase-anchoring protein 1	41,762	Gkap1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9JMB0	18,9	0
Probable 28S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransf	86,906	Nop2	9	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QN31;Q922K7	14,7	0
Large subunit GTPase 1 homolog	73,156	Lsg1	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UM18	15,5	0
Casein kinase II subunit beta	18,926	Csnk2b;Csnk2b-Ly6G5	2	WT-Pos only	KO-Pos only	G3UXG7;G3UXU2;G3UZ20,7	0	611120
Prelamin-A/C;Lamin-A/C	74,237	Lmna	11			P48678	21,5	3299,7
Synaptonemal complex protein 2	172,12	Sycp2	20	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CUU3	17	0
Tubulin beta-5 chain	49,67	Tubb5	3	WT-Pos only	KO-Pos only	P99024	9,9	0
Guanine nucleotide-binding protein G(i1)/G(s)/G	30,3	Gnb1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	H3BKR2;Q3U1B1;Q3TQ16,4	0	478810
28S ribosomal protein S27, mitochondrial	47,778	Mrps27	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BK72;Q80Z14	20,5	0
Fibrinogen alpha chain;Fibrinopeptide A;Fibrinog	87,428	Fga	10	WT-Pos only	KO-Pos only	E9PV24;Q08284	20,3	0
Nuclear receptor coactivator 5	39,263	Ncoa5	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q69ZE0;Q8BX12;Q91W19	0	344940
40S ribosomal protein S27	9,2327	Rps27	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JDW7;Q6ZWU5	14,6	0
Protein FAM205CP homolog	28,657	GK049635	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3V0J3;Q80YD3	16,9	0
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;Gly	47,442	Gapdhs	7			25,2		2959,4
F-actin-capping protein subunit beta	30,628	Capzb	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q923G3;Q3TVK4;Q3TRI23,9	0	474240
RNA-binding protein 8A	19,76	RBM8;Rbm8a	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A067XG47;A0A023T132,4	0	370830
28S ribosomal protein S29, mitochondrial	45,287	Dap3	4	WT-Pos only	KO-Pos only	G3X9M0;Q9ER88;G3UV12,4	0	465210
Protein Adam3	91,443	Adam3	11	WT-Pos only	KO-Pos only	F8VQ03;Q62287;Q6P9018,2	0	374260
28S ribosomal protein S9, mitochondrial	44,929	Mrps9	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D7N3;Q3UMV5;Q5X27,4	0	456390
Transformer-2 protein homolog alpha	24,67	Tra2a	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TAP5;A0A0N45VC2;E20,8	0	202400
WD repeat-containing protein 43	66,323	Wdr43	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q68FC6;Q6ZQL4	27	0
Tektin-4	52,045	Tekt4	9	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J051;Q14951	25,7	0
Collagen alpha-1(XVIII) chain;Endostatin	182,29	Col18a1	7	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QPX1;P39061	5,5	0
Transcriptional activator protein Pur-alpha	34,868	Pura	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8C6E9;P42669	18,1	0
Pre-mRNA-splicing factor SYF1	99,903	Xab2	17	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UKP5;Q9DCD2	25	0
Protein Red	35,093	Ik	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TJY5;Q8CDT0;Q8C7F16,3	0	271150
Pescadillo homolog	68,23	Pes1	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5SQ20;Q9EQ61	8,8	0
MCGS3108 (Protein Rbm31y)	62,564	Rbm31y	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D3U4	28,8	0
Valine--tRNA ligase	140,23	Vars	13			184,3		1575,6
Golgi-associated Rab2B interactor-like 4 (MCG10	64,23	Fam71a	5	WT-Pos only	KO-Pos only	B7XG49	13,2	0
Probable rRNA-processing protein EBP2	21,682	Ebna1bp2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A2ACZ1;Q9D903	28,9	0
40S ribosomal protein S5;40S ribosomal protein	20,413	Rps5	3	WT-Pos only	KO-Pos only	D3YYM6;Q91V55;P974I19,8	0	358650
Unconventional myosin-VIIa	249,76	Myo7a	31	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J113;Q5MJ56;P19,6	0	350900
Elongation factor 2	95,326	Eef2	12	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UMI7;Q3UDC8;Q3TV20,9	0	172460
Pinin	82,504	Pnn	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TQU5;Q35691;Q9CV9,6	0	204970
T-complex protein 1 subunit alpha	60,448	Tcp1	14			P11983	33,6	26606
Splicing factor 3B subunit 4	44,355	Sf3b4	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8QZY9	5,4	0
Centrosomal protein of 55 kDa	53,93	Cep55	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BT07	26,2	0
28S ribosomal protein S5, mitochondrial	48,216	Mrps5	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U2U4;Q99N87	5,1	0
Transmembrane protease serine 12	16,929	Trmps12	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8C1J4;Q3VOQ7	16,6	0
MICOS complex subunit Mic25	26,388	Chchd6	6			87,1		5654,6
Serine/arginine-rich splicing factor 1	28,329	Srsf1	6	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q4M4;Q91VN4;Q9D131,4	0	492500
Putative uncharacterized protein	29,955	Tcf5	5	WT-Pos only	KO-Pos only	H7BX95;Q6PDM2	25,3	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	48,562	Hnrnpk;Gm7964	10			77,0		4027
Intron-binding protein aquarius	161,85	Aqr	21	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AAQ7;Q8CF03	20,6	0
Protein mago nashi homolog 2;Protein mago nas	17,31	Magohb;Magoh	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A023T778;G3UZW7;	20,3	0
Barrier-to-autointegration factor;Barrier-to-auto	10,102	Banf1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	O54962	42,7	0
Hematopoietic cell transcript 1, isoform CRA_a (f	19,9	Hemt1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	G5E8L7;A0A087W5T8;C15,3	0	367540
Protein Wdr36 (WD repeat domain 36, isoform C	97,783	Wdr36	13	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TA68;Q50SQ0;Q3TA19,1	0	277590
RING finger protein 151	27,175	Rnf151	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CQ29	31,4	0
Spermatogenesis-associated protein 6	54,277	Spta6	5			14,8		24457
Prohibitin-2	33,296	Phb2	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3V325;Q35129;F6QPF28,8	0	359970

Tektin-1	48,64	Tekt1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5NBU4;Q9Z285;Q9DA11,5	0	320930	0	290310
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	50,497	Rsl1d1	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3T564;Q3TH37;Q3UL1,21,9	0	291150	0	306500
Surfeit locus protein 4	30,381	Surf4	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q545Q2;Q64310;Q3U716,4	0	313300	0	283170
U3 small nucleolar RNA-associated protein 15	59,417	Utp15	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TN42;Q8C7V325,4	0	255570	0	337450
Nucleoside diphosphate kinase 7	44,434	Nme7	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UMG6;Q9QXL8;Q8B20,8	0	276320	0	311790
Transducin beta-like protein 3	88,265	Tbl3	14	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CA17;Q8CE8628,1	0	233230	0	348870
T-complex protein 1 subunit delta	58,066	Cct4	9	89,4	KO-Pos only	Q564F4;Q3UIZ8;Q3TII023,4	3352,7	299590	0	285430
Crooked neck-like protein 1	83,415	Crnk1	9	WT-Pos only	KO-Pos only	P6315415,9	0	219970	0	356330
WD repeat-containing protein 62	167,38	Wdr62	4	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QK36;E9PU17;Q3U3T3,9	0	274170	0	300330
U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	52,106	Rrp9	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91WM313,1	0	257590	0	315860
28S ribosomal protein S34, mitochondrial	25,826	Mrps34	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9JIK911,9	0	348790	0	214620
Nucleolar GTP-binding protein 2	72,1	Gnl2	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3V3N5;Q3UJL0;Q99LF26,6	0	243020	0	315560
Intracellular hyaluronan-binding protein 4	45,965	Habp4	4	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QKB2;Q9JK5514,8	0	274040	0	279710
SWI/SNF-related matrix-associated actin-depend	121,63	Smarca5	14	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91ZW313,8	0	290540	0	260620
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	37,881	Eif3f	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6IRT4;Q8BTW2;Q3U814,2	0	280890	0	267280
Pre-mRNA-processing factor 17	65,46	Cdc40	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DC4822,3	0	191030	0	356840
40S ribosomal protein S4;40S ribosomal protein	27,504	Rps4x;Gm15013	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q545F8;Q545X8;Q3UX16,3	0	283740	0	254920
Coiled-coil domain-containing protein 54	37,517	Ccdc54	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DAL319,1	0	309150	0	229230
Zinc finger CCHC domain-containing protein 14	82,408	Zc3h14	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BJ0514,6	0	256130	0	281960
Erythrocyte band 7 integral membrane protein	31,375	Stom	4	WT-Pos only	KO-Pos only	P54116;Q99L68;Q8BPA21,1	0	339600	0	193600
Nuclear pore complex protein Nup54	55,731	Nup54	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BTS423,1	0	256600	0	272610
Splicing factor 3A subunit 2	51,306	Sf3a2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q7TN25;G3UVU2;Q62210,7	0	205330	0	321250
N-acetyltransferase 10	115,42	Nat10	12	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K22417,3	0	208640	0	305870
Polyadenylate-binding protein	67,852	Pabpc4;Gm10110	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91Y28;D3ZM52;A3KFL5,5	0	285340	0	228660
RIB43A-like with coiled-coils protein 1	44,962	Ribc1	4	63,9	KO-Pos only	Q9D08812,9	4520,8	289000	0	219990
Proteasome assembly chaperone 2	29,524	Psmg2	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9EST416,3	0	180210	0	316060
Protein SON	268,82	Son	15	WT-Pos only	KO-Pos only	H9KV00;Q9QX47;H9KV10,7	0	152180	0	334590
BCO51142 protein (Protein BCO51142) (Testis spe	31,541	BCO51142	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80XD0;Q3V0M8;A6X812,6	0	296640	0	187470
Ribosome biogenesis protein WDR12	47,346	Wdr12	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q4V9X1;Q9JUA49,2	0	217600	0	265830
Metaxin-2	29,833	Mtx2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8C454;Q3T140;Q3T1114,8	0	293450	0	185840
A-kinase anchor protein 3	95,555	Akap3	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8898713,5	0	293770	0	175850
Casein kinase II subunit alpha	41,215	Cskn2a2	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q545V8;Q54833;Q8CEL17,1	0	260530	0	204780
T-complex protein 1 subunit gamma	56,526	Cct3	8	74,2	80,6	E9Q133;Q3UJPA;Q3UJA19,1	2934,9	217690	3061,9	246890
Polyadenylate-binding protein	71,001	Pabpc6	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DAE616,6	0	296960	0	158910
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	34,499	Mrpl39	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CCX9;Q9JKF720,9	0	276360	0	178010
Spermatid-specific manchette-related protein 1	29,939	Smrp1;1110017D15R1	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q2MH31;7FCUE22,8	0	298710	0	150730
ELAV-like protein;ELAV-like protein 2;ELAV-like pr	38,001	Elavl2;Elavl4	4	WT-Pos only	KO-Pos only	B1AX20;Q91X18;Q80UJ14,5	0	241320	0	208040
RRP12-like protein	143,13	Rrp12	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UIJA1;Q6P5B09,5	0	163960	0	281840
Testisin	36,175	Prss21	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q54AE4;Q8PYD8;Q9JHI8,6	0	237820	0	204980
Nucleoporin p58/p45	55,262	Nup11	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6ZQC2;Q3UZQ6;Q8R39,4	0	168040	0	272960
40S ribosomal protein S15	13,742	Rps15	2	WT-Pos only	KO-Pos only	D3YTD9;Q3UXV5;Q3UK27,1	0	242580	0	187400
Interleukin enhancer-binding factor 2	43,01	Ilf2	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UXI9;Q9CYC615,9	0	171730	0	258150
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	133,03	Dhx30;mKIAA0890	15	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JGL8;Q99PU8;C15,3	0	244400	0	181520
ADAM6b (Protein Adam6b)	85,35	Adam6b	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6IMH7;Q14DT8;Q8C09	0	209160	0	214300
Zinc finger protein RFP	67,736	Trim27	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6N553;Q6215810,4	0	185410	0	235910
MKIAA0187 protein (Fragment)	145,73	Bms1	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6ZQH0;Q3V0N4;Q6PC9,9	0	188470	0	227310
T-complex protein 1 subunit theta	49,886	Cct8;Cctq	6	26,4	KO-Pos only	Q9CS06;Q9VW55;Q3UL15,7	9726,5	256660	0	167800
Actin-related protein T2	41,615	Actr2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D9L58,5	0	276200	0	132320
Pre-mRNA-splicing factor 38A	37,436	Prpf38a	4	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RTE3;Q4FKF614,7	0	83621	0	322860
RNA-binding protein FUS	13,897	Fus;Taf15	2	14,8	5,4	G3UXT7;Q8CFQ9;Q56429,2	12856	190710	51218	276900
Disintegrin and metalloproteinase domain-contain	83,984	Adam32	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K41010,6	0	185200	0	218070
Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog	41,241	Brix1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DCA58,2	0	207970	0	195030
Pentatricopeptide repeat domain-containing pro	77,795	Ptcd3	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q14C51;Q3UKU1;Q8BS19,7	0	198970	0	202910
Serine/arginine-rich splicing factor 7	27,377	Srsf7	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3THA6;Q8BL978,8	0	214060	0	184300
Radial spoke head protein 6 homolog A	80,201	Rsp6a	7	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RQM5;Q8CDR2;Q9917,9	0	199960	0	198290
Guanine nucleotide-binding protein G(i)/G(s)/G	25,025	Gnb2;Gnb4	3	WT-Pos only	KO-Pos only	D3Z1M1;Q3U9V4;P62819,8	0	214890	0	181230
Prohibitin	22,999	Phb	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5SQG5;Q3TV00;P67721,7	0	235480	0	159920
NHP2-like protein 1;NHP2-like protein 1, N-termi	14,173	Nhp2l1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D0T1;E9PZ5418,8	0	215270	0	179870
Ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper do	15,962	Asr1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	D6RFV1;Q8VD4612,8	0	214330	0	214170
DBIRD complex subunit ZNF326	65,166	Znf326;Zfp326	4	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J098;O88291;D8,8	0	173450	0	191600
Something about silencing protein 10	53,398	Utp3	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9J113;Q05DV3;Q05DC12,4	0	25774	0	361700
Tektin-2	50,311	Tekt2	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q922G725,1	0	248110	0	133510
Putative uncharacterized protein (Fragment)	90,099	Wdr75	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CRF5;Q3TQZ0;Q3T1315,6	0	144100	0	234430
Inactive serine protease 39	40,765	Prss39	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q7016910,9	0	203220	0	173330
DDB1- and CUL4-associated factor 13	51,456	Dcaf13	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6PAC319,1	0	175220	0	200910
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14	32,08	Utp14a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UYV5;Q640M1;Q3U10,2	0	162440	0	210820
39S ribosomal protein L37, mitochondrial	48,34	Mrpl37	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9215716,5	0	121250	0	160090
Actin-like protein 6A	47,447	Actl6a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q505L1;Q3TF62;Q9Z2N5,4	0	188090	0	182760
Proteasome subunit alpha type;Proteasome sub	27,888	PsmA4	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TL95;Q3UCF0;Q9R1F17,3	0	194850	0	175720
HEAT repeat containing 1 (Protein Heatr1)	242,07	Heatr1	24	WT-Pos only	KO-Pos only	G3X9B1;Q9JXUW715,6	0	130790	0	239770
Betaïne-homocysteine S-methyltransferase 1	45,02	Bhmt	4	12,1	KO-Pos only	Q35490;Q3UEP015	9481,4	115150	0	259060
ATP-dependent RNA helicase DDX54	100,79	Ddx54	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CD14;Q8K4L0;Q8CD18,3	0	151410	0	212790
Unconventional myosin-1c	121,94	Myo1c	16	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9WTI719,7	0	173870	0	190120
Phosphoglycerate kinase 2	44,852	Pgk2	4	WT-Pos only	KO-Pos only	P0904113,4	0	230650	0	128030
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	50,21	Sqr1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UD54;Q9R112;F6ZK212	0	173650	0	184950
Heat shock protein HSP 90-alpha	64,737	Hsp90aa1	5	38,1	16,4	Q3TKB9;Q3TKG0;A0PJ910,6	3807,6	145210	13993	229020
La-related protein 4B	81,626	Larp4b	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6A0A27,3	0	182620	0	170860
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 32	47,799	Ppp1r32	6	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J0F3;Q148A419,2	0	215730	9621,5	146320
Coiled-coil domain-containing protein 105	57,304	Ccdc105	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q904K715,4	0	228620	0	123710
T-complex protein 1 subunit eta	52,904	Cct7	8	18,6	KO-Pos only	Q3UDB1;Q8C5Q5;Q3TJ25,8	10217	190210	0	168830
Ribosome production factor 1	23,779	Rpf1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JFR7;Q7TND526,4	0	157350	0	190460
Y-box-binding protein 3	29,313	Igf2bp3;Ybx3	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q64369;Q68G78;Q61416,4	0	196160	0	149810
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase;Peptidyl-proly	18,223	Ppil1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U0J1;B9EJX8;Q9D0M26,5	0	215140	0	126480
Sperm-associated antigen 6	55,269	Spag6	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q497N2;Q9JUB76,9	0	190820	0	142240
Proteasome subunit beta type-6	25,378	Psmb6	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6Q6928,8	0	193170	0	132280
Nucleolar protein 6	129,23	Nol6	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8R5K4;Q3U5C6;Q3TB12,7	0	113550	0	211180
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	52,22	Eif3e	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UIG0;P60229;Q9CT29	0	146340	0	178270
Radial spoke head protein 3 homolog B;Radial sp	45,049	Rsp3a;Rsp3b	4	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RWWQ9;Q9DA80;Q3U12,6	0	195290	0	126060
28S ribosomal protein S21, mitochondrial	5,1089	Mrps21	2	WT-Pos only	KO-Pos only	D3YV29;Q059G7;P580561,4	0	209440	0	111830
Nucleolar protein 16	21,508	Nop16	3	WT-Pos only	KO-Pos only	D3Z7M5;Q9CPT521,5	0	288380	0	32334
Postacrosomal sheath WW domain-binding prot	37,485	Wbp2nl	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D5295,8	0	166710	0	146950
Nup205 protein (Fragment)	226,93	Nup205	21	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6PDG0;B9EJ54;A0A0J14,7	0	104720	0	201400
Protein CASC3	75,769	Casc3	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K3W35,9	0	143180	0	162580
E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1	47,306	Mktn1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QAG7;Q8C5V4;Q9DB9,6	0	115930	0	187100
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6	70,429	Utp6	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8VCY6;Q3TE8414,2	0	146250	0	153340
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	69,265	Ddx5	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BT50;A11333;Q5U2211,7	0	141950	0	153360
WD repeat-containing protein 18	47,211	Wdr18	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q4VBE8;Q8K2656,7	0	147590	0	139030
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MF68	735	Mphosph10	4	WT-Pos only	KO-Pos only	A0PJ89;Q81V00;Q9D7V8,6	0	129220	0	157320
T-complex protein 1 subunit zeta	58,076	Ctcf6	7	14,3	KO-Pos only	Q52KG9;Q3TIX8;Q3TIG122,2	10515	150110	0	146840
Glutathione S-transferase Mu 5	26,635	Gstm5	5	461,7	KO-Pos only	P48774;E9PVM7;E9PV624,1	553,15	255370	0	27558

Protein Btaf1	207,05	Btaf1	18	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QAE3;A0ZVB6;Q52KH 12,3	0	151630	0	130310	
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	72,584	Ddx17	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U741;Q501J6;Q3TU2 9,7	0	137260	0	143370	
DNA topoisomerase 1	90,875	Top1	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q04750	11,6	0	131940	0	145300
Heat shock 70 kDa protein 1-like	70,606	Hspa11;Hsc70t	7	113,9	345,9	B2CSK2;A1L347;P16627 14,2	1305,4	148690	376,47	130210	
Splicing factor 3B subunit 6	14,585	Sf3b6	3	WT-Pos only	KO-Pos only	P59708	32	0	115360	0	158730
Actin-like protein 7A	49,45	Actl7a	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9QY84	14,5	0	197580	0	75928
Myosin light polypeptide 6	16,961	Myf6	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q642K0;Q60605;Q3TIG 39,1	0	155840	0	116590	
Cirhin	76,885	Cirh1a	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UIY3;Q8R2N2	10,9	0	103080	0	169320
A disintegrin and metallopeptidase domain 4 (AC84,406	ADAM4	Adam4	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CGQ2;Q6IMH8	8	0	149070	0	119190
Bromodomain adjacent to zinc finger domain pr	209,4	Baz2a	9	WT-Pos only	KO-Pos only	F8VPM0;E9Q374;Q91Y15,9	0	122230	0	141150	
Protein Gm43337	58,87	Gm2483	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JGA3	4,5	0	148030	0	112740
Ubiquitin-associated protein 2-like	103,95	Ubap2;Ilig-2a	7	18,2	17,6	Q8B153;Q812D4;A0A0H 13,5	6991,2	127380	7978	140360	
Protein Col6a3	288,69	Col6a3	29	WT-Pos only	KO-Pos only	J3Q1Q16;A0A087WS16;116	0	130540	0	119810	
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	79,66	Eif3a	9	66,7	0	Q3UEK3;Q3TKF9;Q3UM 19,1	1527,8	101940	0	141650	
Glutamate receptor-interacting protein 1	68,833	Grip1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6X4T6;Q6WE29;D3Z0 11,7	0	168470	0	72993	
ADAM6	85,089	Adam6a	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CGQ1;B2RSY5;Q3Z2N 7,2	0	105250	0	134710	
Methyl-CpG-binding domain protein 2	43,5	Mbd2	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9Z2E1	12,1	0	117920	0	121380
Collagen alpha-1(VI) chain	108,49	Col6a1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q04857;Q99LW4	4,8	0	124620	0	111860
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	77,06	Tgm2	6	90,6	0	P21981	11,5	1272,5	115250	0	122310
Nucleoporin Nup43	41,32	Nup43	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q7TT04;Q3UIY4;P5923 6,4	0	94052	0	141960	
Protein BUD31 homolog	17	Bud31	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E0CX20;Q6PGH1	14,6	0	126220	0	108810
T-complex protein 1 subunit beta	57,477	Cct2	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q542X7;P80314;Q9JUD 19,3	0	128730	0	106230	
Parkin coregulated gene protein homolog	27,768	Pacrg	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UXK4;Q0VB91;Q9DA1 11,2	0	160720	0	74156	
5-nucleotidase	50,633	Nt5e	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8C8G9;Q0VE0Q;Q615I 10,8	0	120150	0	112250	
Acrosin-binding protein	61,14	Acrbp	4	41,2	0	Q3V140	9,3	2908,8	119940	0	113220
Predicted gene, EG210155 (Protein Gm4763)	20,969	Gm4763	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CFJ5	16,8	0	144580	0	84790
Kinesin-like protein;Kinesin-like protein KIF3B;Kin	54,037	Kif3c;Kif3b	3	WT-Pos only	6,7	Q3UZU0;Q8BNH4;Q3UI 6,3	0	156310	11818	78790	
Eukaryotic initiation factor 4A-1;Eukaryotic initiat	41,29	Eif4a2;Eif4a1	3	8,8	99,5	Q8BTR6;Q3TLL6;Q4FZL 10,2	7268,9	64132	1687,6	167950	
Polypyrimidine tract-binding protein 2	37,868	Ptbp2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JGW0;Q91Z31; 15,7	0	95372	0	127420	
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89,321	Vcp	11	49,8	0	Q01853;Q8BNF8	19,2	1400,3	69772	0	154060
Nucleolar complex protein 4 homolog	58,694	Noc4l	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UKH4;Q3T9T2;Q8BH 4,3	0	108440	0	113120	
WD repeat-containing protein 74	42,636	Wdr74	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8VCG3;Q8R3V4;Q3UL 13,8	0	104580	0	116920	
Putative uncharacterized protein	19,602	Fam209	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D9T2;A2APAS	27,1	0	129980	0	88315
EF-hand domain-containing protein 1	75,081	Efhc1	7	WT-Pos only	KO-Pos only	B2CKC6;Q9D9T8	15,1	0	134620	0	82965
Proteasome subunit beta type;Proteasome subu	26,372	Psmb1	3	152,7	79,1	Q6RI64;Q09061	17,9	811,31	123860	1164	92039
ADP/ATP translocase 2;ADP/ATP translocase 2, N32,931	N32,931	Slc25a5	4	52,0	20,7	Q545A2;P51881	14,4	2390,3	124390	4395,3	91153
Proteasome subunit beta type-5	28,532	Psmb5	5	WT-Pos only	KO-Pos only	O55234	22,3	0	115610	0	92571
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	60,786	Gni3	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TK27;Q8C111	21,2	0	97252	0	110770
60S ribosomal export protein NMD3	57,611	Nmd3	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q99L48	6,8	0	107400	0	99956
Small subunit processome component 20 homol	317,87	Utp20	21	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QK83;Q5XG71	9,7	0	83643	0	116510
Cytosolic 5-nucleotidase 1B	53,853	Nt5c1b	6	WT-Pos only	KO-Pos only	D6REF4;Q6P906;Q91YE 17,1	0	75023	0	120130	
DNA helicase;DNA replication licensing factor MC	81,196	Mcm7	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UD18;Q3U4T8;Q3V1 5,8	0	132270	0	61529	
Erlin-1	39,182	Erlin1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R41JG5;Q91X78	11,2	0	124550	0	68539
DNA topoisomerase 2-alpha	172,79	Top2a	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q01320;Q8CCE5	8,8	0	96079	0	94959
39S ribosomal protein L12, mitochondrial	21,708	Mrp112	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DB15	17,9	0	124160	0	65885
Calcium-transporting ATPase;Sarcoplasmic/end	114,86	Atpa2a	9	184,5	0	J3KMM5;Q5DT12;O551 12,9	487,41	89935	0	97687	
Zinc finger protein 800	74,812	Zfp800;Znf800	4	WT-Pos only	KO-Pos only	B7ZMR9;Q9VEE6;D3YV 11,6	0	81551	0	105390	
Adenylate kinase 8	55,072	Ak8	6	109,7	8,4	Q3ZM07	15,4	1026,5	112610	9905	82990
Nuclear pore complex protein Nup155	150,19	Nup155	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UL43;Q80X48;Q6ZQ 6	0	72159	0	112450	
Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial	66,113	Aifm1;Pdcd8	2	WT-Pos only	KO-Pos only	B1AU25;Q9Z0X1;Q2QK 5,1	0	108550	0	74521	
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM41	71,817	Trim41	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5NCC3;Q5NCC4;Q5NK 7,8	0	87129	0	93917	
Inactive serine/threonine-protein kinase TEX14	162,54	Tex14	11	65,0	0	Q7M6U3	11,4	1518,1	98610	0	83503
Nucleoporin NDC1	60,299	Ndc1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	J3QPB5;Q8VCB1	12,8	0	62617	0	115790
DnaJ homolog subfamily C member 9	30,059	Dnajc9	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91WN1;Q8BRQ6	16,6	0	81449	0	94140
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX56	61,179	Ddx56	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BK66;Q5SVX3;Q9D0I 6,4	0	106610	0	67814	
ADP/ATP translocase 4;ADP/ATP translocase 4, N35,257	N35,257	Slc25a31	5	WT-Pos only	39,7	B2RTC8;Q3V132	17,2	0	84577	2302,9	91489
Fibronectin;Anastellin	211,1	Fn1	12	10,7	21,4	Q3UHR1;B7ZNI1;Q3UH 9,8	7501,6	80093	4920,9	105410	
Aladin	59,402	Aaas	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TEP0;P58742;Q8R3F 9,3	0	66135	0	106760	
Outer dense fiber protein 3	30,574	Odf3	5	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QNR9;Q9Z0N1	22,9	0	133250	0	38308
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB2	133,91	Polr2b	11	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CF17	12,1	0	59716	0	111450
RuvB-like 2	51,143	Ruvbl2	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UXP2;Q3TXT7;Q9W1 17,3	0	96287	0	73981	
Poly(rC)-binding protein 3	24,117	Pcbp3	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q7D8;Q8FC06;P577 12,8	0	86215	0	83032	
WD repeat-containing protein 46	55,581	Wdr46	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8R0T3;A0A068BUU7;Q 10	0	58218	0	110580	
Proteasome subunit alpha type-7-like;Proteasom	27,866	Psm8a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CWH6;B7ZM53;B7ZF 7,6	0	88404	0	76132	
U1 small nuclear ribonucleoprotein A	27,372	Snrpa	3	WT-Pos only	KO-Pos only	D3Z056;Q62189;Q9CXX 17	0	68483	0	94352	
Armadiello repeat-containing protein 12	38,502	Armc12	2	WT-Pos only	KO-Pos only	C0IQAS;Q80X86	6,8	0	94513	0	67969
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	13,295	Mps23	4	WT-Pos only	KO-Pos only	F7AR21;Q3T114;Q99LZ 44,2	0	91054	0	69095	
Disintegrin and metalloproteinase domain-conta	82,329	Adam2	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TTP6;Q60718	7,8	0	80166	0	79635
Nucleolar transcription factor 1	85,009	Ubf1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AWT6;Q9DBH1;A2A1 3,4	0	79455	0	76899	
DDB1- and CUL4-associated factor 7	38,813	Dcaf7	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80ZU1;Q3U3H9;P619 8,2	0	70979	0	85167	
Myb-binding protein 1A	152,04	Mybbp1a	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UZW2;Q7TPV4;A0IL 5,3	0	78991	0	73032	
L-lactate dehydrogenase;L-lactate dehydrogenas	36,265	Ldha	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UDU4;Q564E2;Q3TI 5,8	0	78080	0	72718	
Collagen alpha-1(XV) chain;Restin	138,29	Col15a1	5	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AJY2;Q35206;A2AJY 5,3	0	79635	0	69138	
Nuclear pore complex protein Nup88	51,007	Nup88	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CAD9;Q8BQ07;Q5QJ 15,6	0	44450	0	103280	
ATP-dependent RNA helicase DHX8	134,51	Dhx8	6	WT-Pos only	KO-Pos only	A2A4N9;Q3UQQ4;Q5D 7,8	0	52880	0	93960	
T-complex protein 1 subunit epsilon	59,623	Cct5	4	73,1	0	P80316;E0CZA1	10,9	1104,8	80768	0	66744
Protein Spata31d1d	136,96	Spata31d1d	7	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q5W2;Q8CSW2	9,6	0	74805	0	70656
ATP-dependent RNA helicase DDX18	74,18	Ddx18	4	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RUM8;Q8K363	7	0	65196	0	78945
Periodic tryptophan protein 2 homolog	98,57	Pwp2	4	WT-Pos only	KO-Pos only	A1A596;Q8R538;Q2M1 4,9	0	69980	0	73612	
Serine/threonine-protein kinase haspin	84,208	Gsg2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q2KHL1;A0A0R410P2;Q 4,8	0	72134	0	71185	
39S ribosomal protein L46, mitochondrial	18,767	Mrp146	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D9V9;Q9EQI8	14,7	0	93846	0	68406
Coiled-coil domain-containing protein 136	120,2	Ccdc136	7	WT-Pos only	KO-Pos only	F6VCV9;E9Q9P4;Q3TV 9,7	0	74148	0	68448	
Nuclear pore complex protein Nup160	158,23	Nup160	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9Z0W3					

Kinesin-like protein KIF27	158,95	Kif27	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q7M6Z4	7,6	0	59187	0	65441
Zinc finger protein 638	214,46	Zfm1;Znf638	10	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0N45V80;EQM15,18	5,8	0	48134	0	74076
DnaJ homolog subfamily A member 1	44,868	Dnaja1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5NTY0;Q3TK61;P63036	11,9	0	56223	0	65778
Nuclear pore complex protein Nup133	128,6	Nup133	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CDZ5;Q8R0G9	12	0	41849	0	80091
F-actin-capping protein subunit alpha-3	34,952	Capza3	4	WT-Pos only	KO-Pos only	P70190	10	0	58172	0	63185
Ribosome biogenesis protein BOP1	83,124	Bop1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TIJ5;Q3TIJ25;P97452	4,3	0	43066	0	77997
Tyrosine-protein kinase BAZ1B	170,65	Baz1b	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9Z277	8,7	0	55752	0	65299
EF-hand domain-containing family member C2	87,645	Efhc2	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q05K92;Q9D485	7,6	0	68447	0	52095
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus	143,54	Acin1	6	WT-Pos only	KO-Pos only	F6R139;Q9JIX8;Q80TU6	5	0	44667	0	74535
ATP-dependent RNA helicase DHX36	113,84	Dhx36	6	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RQ56;Q8VHH9	20,6	0	54126	0	63226
Proteasome subunit alpha type;Proteasome subunit	29,466	Psm1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q88TU5;Q3TS44;Q9R11	12,6	0	68569	0	48330
Putative uncharacterized protein	98,907	Brd1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UE68;E9Q412;Q5711	2	0	43869	0	71225
Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96;Nucleoporin	197,24	Nup98	9	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6PFD9;B7ZN81;B2RQ1	9,3	0	36721	0	77082
Leucine-rich repeat-containing protein 23	39,292	Lrrc23	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q35125	13,2	0	70155	0	43299
Pumilio domain-containing protein KIAA0020	72,93	Kiaa0020;D19Bwg135	5	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0N45UH4;Q8BK59	9,7	0	42526	0	70840
Nuclear pore membrane glycoprotein 210-like	208,7	Nup210l	7	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JF28;Q9D2F7	5,1	0	57062	0	53009
Nuclear pore complex protein Nup214	153,07	Nup214	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CH59;Q8OU93	4,7	0	32581	0	75655
Borealin	32,214	Cdca8	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BHX3;E9Q2C7	13,1	0	56431	0	50581
Phosphate carrier protein, mitochondrial	39,613	Slc25a3	2	11,9	KO-Pos only	Q3THU8;G5E902;Q8VE	6,2	5355,6	63527	0	48722
Nucleolar complex protein 2 homolog	68,267	Noc2l	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BHX6;Q3UIJ6;Q3QK5	11,1	0	44950	0	61839
SUN domain-containing protein 2	81,604	Sun2;mKIAA0668	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BJS4;Q4QQM3;Q6AF	5,6	0	50408	0	55995
SUN domain-containing protein 1	84,67	Sun1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	D3Z0V9;Q9D666;F6RM	7,1	0	59202	0	47009
Dynein heavy chain 8, axonemal	541,23	Dnah8	29	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91XQ0	7,9	0	56535	0	49168
28S ribosomal protein S31, mitochondrial	43,88	Mrps31	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q61733	6	0	73401	0	31658
RIB43A-like with coiled-coils protein 2	45,243	Ribc2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	G3X8W0;Q9D4Q1	6,1	0	62326	0	42381
Zona pellucida-binding protein 1	39,137	Zpbp	2	WT-Pos only	KO-Pos only	B7ZP49;Q5NC84;Q6252	5,4	0	78743	0	25329
Nuclear cap-binding protein subunit 2	18,017	Ncbp2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CQ49;D3ZD2	15,4	0	59391	0	44569
Hyaluronidase	57,714	Hyal5	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9CUAS;Q812F3	11	0	48529	0	55168
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	192,82	Eif4g3	7	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0N45VL0;Z4YKC4;A	4,2	0	51956	0	51724
Proteasome subunit beta type;Proteasome subunit	22,965	Psmb3;Gm4950	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q545G0;Q9R1P1;Q8VH	14,6	0	55358	0	46996
Vinexin	76,711	Sorbs3	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K0M3;Q9R1Z8	4,1	0	43666	0	56072
Nuclear pore complex protein Nup107	106,56	Nup107	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TT06;E9Q4V9;Q569	5	0	40042	0	59395
Metastasis-associated protein MTA1	71,082	Mta1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	M1VB37;M1VH3;F8W8	9	0	37038	0	59725
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	85,938	Ddx27	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q921N6	6,2	0	43001	0	52819
Caprin-1	37,582	Caprin1	3	10,2	KO-Pos only	Q3UFZ6;Q60865	10,1	6709,4	68408	0	32476
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	66,301	Rpn2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q61833;A2ACG7;Q3UI	8,6	0	36170	0	57754
Myosin-11	223,35	Myh11	11	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QPE7;Q8R384;Q69Z	8,2	0	32488	0	61190
Cullin-3	81,11	Cul3;mKIAA0617	4	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QAT8;Q6ZQ84;Q9IL	17,1	0	44631	0	48589
Superkiller viralicidic activity 2-like 2	112,62	Sktiv2l2;mKIAA0052	8	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BTX6;Q3CZU3;Q91Y	11,6	0	24587	0	68454
Charged multivesicular body protein 4b	24,936	Chmp4b	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D8B3	11,2	0	28317	0	64190
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX4	79,282	Ddx4	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3V086;Q61496	4,9	0	43301	0	48755
DNA damage-binding protein 1	126,85	Ddb1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UIJ4;Q3ULS8;Q91YC	4,7	0	42146	0	48665
WD repeat-containing protein 3	105,77	Wdr3	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BH84	5,5	0	27705	0	61655
Proliferating cell nuclear antigen	28,845	Pcna	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91ZH2;Q54J29;Q9CZ	16,5	0	45798	0	41681
Zinc finger protein 593	15,147	Znf593;Zfp593	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DB42;Q3U0F2	23,9	0	51816	0	33906
Agrin;Agrin N-terminal 110 kDa subunit;Agrin C-terminal	204,95	Agrn	7	WT-Pos only	60,1	Z4YK85;MOQWP1;A2AS	5,7	0	40324	752,67	45268
Putative methyltransferase C9orf114 homolog	42,957	D2Wsu81e	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UHX9;Q6GL45	6,5	0	71191	0	12973
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	216,37	Chd4;Chd5	4	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QAS4;E9QAS5;Q5D7	2,4	0	41755	0	42094
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	57,387	Dkc1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q499D4;Q3TM67;Q3TI	4,3	0	36526	0	46486
Nucleolar protein 11	80,817	Nol11	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BJW5	4,1	0	23833	0	58983
Proteasome subunit beta type-4	29,116	Psmb4	3	WT-Pos only	KO-Pos only	P99026	21,6	0	39968	0	41778
Clusterin;Clusterin beta chain;Clusterin	43,109	Clu	2	13,7	KO-Pos only	Q9IK98;Q549A5;Q0689	7,5	3698,7	50651	0	34127
Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	106,41	Cherp	2	WT-Pos only	KO-Pos only	G5E818;Q8CGZ0	2,7	0	31627	0	48001
Nuclear pore complex protein Nup85	74,775	Nup85	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8R480	8,2	0	29843	0	48584
Ran GTPase-activating protein 1	63,516	Rangap1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91Y52;Q8C2E3;Q7TM	4,1	0	44631	0	33519
Plectin	499,1	Plec	20	44,9	KO-Pos only	E9Q3W4;Q6S390;Q6S3	6,7	675,12	30319	0	47306
Unconventional myosin-Id	116,08	Myo1d	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5SYD0;B2RWZ2;Q8K0	6,6	0	29213	0	46735
Protein Dnajc21	61,734	Dnajc21	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q8D0;Q3UYP3;F6QV	15,3	0	39654	0	36106
Transcriptional repressor p66 alpha	67,461	Gatad2a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QMN5;Q8CHV6	3,8	0	43769	0	31846
Zinc finger RNA-binding protein	114,45	Zfr	5	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RUG7;Q88532	8,3	0	25829	0	44879
Ataxin-2	136,46	Atxn2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QMM7;Q7O305;F7B6	2,6	0	40957	0	28632
Acrosin;Acrosin;Acrosin light chain;Acrosin heavy chain	29,52	Acr	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3ZB04;Q3ZB05;Q3ZB	9,8	0	21262	0	47559
39S ribosomal protein L1, mitochondrial	37,596	Mrpl1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q99N96;Q9D3F3	9,8	0	50093	0	18698
Actin-like protein 9	45,771	Actl9	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CG27	6,7	0	19711	0	48844
Dynein heavy chain 17, axonemal	509,03	Dnah17	21	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q7P0;K3W4R0;Q69Z	6,5	0	38885	0	29631
Glypican-4;Secreted glypican-4;Glypican-6;Secreted glypican-6	62,586	Gpc4;Gpc6	2	WT-Pos only	KO-Pos only	P51655;Q3VIC9;Q3TP	6,4	0	38981	0	29329
Heat shock 70 kDa protein 4L	63,555	Hspa4l	4	10,5	KO-Pos only	E0CY23;P48722	8,9	3258,5	34358	0	36578
Alpha-N-acetylgalactosaminidase	47,25	Naga	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U6T2;Q9QWR8	6,7	0	29105	0	38267
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp4	58,353	Prpf4	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BTJ0;Q059T9;Q9DA	5,8	0	26830	0	40340
Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	33,931	Slc25a1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8JZU2;F6VVY4	10,3	0	41259	0	25737
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	341,12	Ranbp2	10	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9ERU9	4,3	0	26984	0	38845
Polypyrimidine tract-binding protein 1	52,63	Ptbp1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CB58;Q3TQW3;Q8R1	12,5	0	23832	0	40855
Serine/threonine-protein phosphatase;Serine/threonine phosphatase	31,367	Ppp1cc	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JGC1;Q6ZWM8	15,4	0	34306	0	29867
39S ribosomal protein L2, mitochondrial	33,099	Mrpl2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	B1B1D8;Q9D773;B1B1	8,6	0	37701	0	25712
28S ribosomal protein S26, mitochondrial	23,443	Mrps26	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8OZS3	11,5	0	38734	0	23853
Myosin regulatory light chain 12B;Myosin regulatory light chain 12B	118,057	Myl12a;Myl12b;Myl9	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6ZWQ9;Q3THE2;Q9D	28,5	0	32497	0	29166
Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	118,07	Pelp1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DBD5;Q9D4T3	3,9	0	28783	0	32419
Spermatogenesis-associated protein 19, mitochondria	18,057	Spata19	2	WT-Pos only	KO-Pos only	I6ZYN5;Q9DAQ9	20,1	0	46748	0	14099
Nitric oxide synthase-interacting protein	33,209	Nosip	2	5,6	12,9	Q9D6T0	11	3395,2	19002	3761	48600
39S ribosomal protein L19, mitochondrial	33,864	Mrpl19	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3URF5;Q9D338;Q6P8	19,7	0	36324	0	23585
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	69,765	Ddx41	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UAC4;Q3TI21;Q91V	3,5	0	25844	0	32007
39S ribosomal protein L4, mitochondrial	33,073	Mrpl4	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DCU6	13,3	0	35528	0	21639
Protein SDA1 homolog	79,458	Sdad1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0J9YV20;A0A0R4J0	3,5	0	40820	0	16223
Cilia- and flagella-associated protein 57	144,93	Cfap57	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D180	5,6	0	36747	0	20186
Predicted gene, OTTMUSG0000001767 (Protein)	77,008	OTTMUSG0000001767	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q52KH6;A3KG49;A2BG	3,9	0	28153	0	28422
Probable global transcription activator SNF2L2;Trithorax	57,972	Smarca2;Smarca4	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8R1W7;Q3UX55;Q8R1	4	0	15143	0	41109
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	108,98	Eif3b	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CIJ3;Q8IJQ9	2,3	0	26764	0	29309
28S ribosomal protein S2, mitochondrial	32,34	Mrps2	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BQ99;Q924T2	13,4	0	34475	0	21529
Uncharacterized protein C11orf98 homolog	14,098	1810009A15Rik;Ints5	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D937;A0A087WQJ5	22,8	0	30748	0	24782
Coiled-coil domain-containing protein 63	66,518	Ccdc63	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A7YTZ6;A0A0R4JOM8	3,3	0	29807	0	25591
Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein	75,656	Nufip2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5F2E7	6,1	0	26389	0	28167
Interleukin enhancer-binding factor 3	76,347	Ilf3	3	8,1	15,0	Q45VK5;Q45VK6;Q9Z1	6,3	3471,8	28007	2118,9	31686
Kinesin-associated protein 3	91,29	Kifap3	2	WT-Pos only	KO-Pos only	P70188;Q3UZA5	3,8	0	32153	0	21901
Adenosine deaminase domain-containing protein	60,276	Adad1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	FW8I80;Q5SUE7	6,8	0	25685	0	28156
Spermatogenesis-associated protein 20	88,471	Spata20	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8OY15	2,3	0	25056	0	28314
Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	161,09	Ythdc2	5	WT-Pos only	KO-Pos only	B2R883;A0A0I9YV44	4,6	0	27587	0	25395
Putative helicase Mov10l1	132,79	Mov10l1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	G3X8T0;F2YVM1;D3YV	4,6	0	25166	0	27322
39S ribosomal protein L44, mitochondrial	33,053	Mrpl44	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U9C4;Q3UKG1;Q9CV	9,9	0	32126	0	19652
MKIAA1517 protein (Fragment)	104,96	Dhx37	5	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5DTX1;Q6NZL1	8,5	0	14982	0	36729
Kinesin-like protein KIF23;Kinesin-like protein	108,77	Kif23	3	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q5G3;Q05DU6	3,8	0	35070	0	14673

Importin-5	123,59	Ipo5	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BKCS;Q9CYG6;Q7TN5,5	0	23743	0	24275
MCG6859, isoform CRA_b (TSC22 domain family	24,506	Tsc2d4	2	WT-Pos only	KO-Pos only	D3Z6V5;Q3U1U6;Q3TC16,7	0	27611	0	20384
Kelch-like protein 10	30,876	Klhl10	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q6P3C9;B2RTD7;Q9D5'8,9	0	23721	0	23056
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	107,91	Parp1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U868;Q921K2;Q3TX'5,9	0	15782	0	30421
Tudor domain-containing protein 7	125,84	Tldr7	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0A0MQD1;Q8K1H13,8	0	24464	0	21670
Kinesin-like protein;Kinesin-like protein KIF3A	79,444	Kif3a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TET1;Q3UI47;B1AQz3,2	0	26187	0	19884
Laminin subunit gamma-1	177,19	Lamc1	4	WT-Pos only	KO-Pos only	F8VQJ3;Q3UNG0;P024€3,6	0	25215	0	19637
39S ribosomal protein L23, mitochondrial	12,737	MrpL53	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D1H819,5	0	28657	0	15820
Inactive serine protease 45	35,723	Prss45	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K4I78,5	0	27919	0	15880
Nucleolar RNA helicase 2	75,855	Ddx21	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8K2L4;Q3CWZ5;Q6PC6,4	0	15941	0	27425
Fibrous sheath-interacting protein 2	784,85	Fsp2	16	WT-Pos only	KO-Pos only	A2ARZ32,9	0	26799	0	15682
Nuclear mitotic apparatus protein 1	235,66	Numa1	5	59,5	KO-Pos only	Q80Y35;E9Q7G03,1	317,8	18911	0	23871
YLP motif-containing protein 1	241,05	Ylpm1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	D3YWV2;Q8C8U8;E9Q€2,2	0	20255	0	21421
CCAAT/enhancer-binding protein zeta	120,37	Cebpz	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J046;P535693	0	17309	0	23841
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitocho	89,149	Gpat2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q14DK43,9	0	23146	0	17710
Kielin/chordin-like protein	166,63	Kcp	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U492;E9QNB32	0	27716	0	13068
39S ribosomal protein L22, mitochondrial	23,805	MrpL22	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BU8812,1	0	26847	0	13594
Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock 70 kDa	70,078	Hspa1b;Hspa1a	3	7,1	20,9	Q3TU85;Q3TAI8;Q616€6,2	789,54	5571	1685,5	35219
Nucleolar complex protein 3 homolog	93,21	Noc3l	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8VI842,9	0	14834	0	23376
Lamin-B receptor	71,439	Lbr	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U9G9;A0A0A6YY125,4	0	10147	0	27657
Nucleoprotein TPR	266,92	Tpr	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q7M739;F6ZD54;Q3V1'5,1	0	6869,9	0	30522
E3 ubiquitin-protein ligase HERC2	517,32	Herc2	11	WT-Pos only	KO-Pos only	C6EQH2;Q4U2R13,5	0	17344	0	19286
Centromere protein C	102,15	Cenpc;Cenpc1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	P49452;Q9CRZ7;Q3UPF2,3	0	14229	0	21574
Clathrin heavy chain;Clathrin heavy chain 1	191,98	Cltc;MKIAA0034	6	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5SXK6;Q8OU89;Q68F'5,2	0	6506,5	0	29230
Cell division cycle and apoptosis regulator protei	132,06	Ccar1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8CH182,7	0	16693	0	19030
Moesin;Radixin;Ezrin	39,601	Rdx;Err;Msn	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8C2N4;Q7T5G6;Q05C'5,7	0	13786	0	21848
Myosin-10	212,48	Myh10	7	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80T68;Q5SV64;Q3UH'6,4	0	10522	0	24874
Ropporin-1-like protein	24,515	Ropn1l	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0R4J1E7;Q9EQ0012,4	0	22539	0	12699
Pre-mRNA-processing factor 6	106,72	Prpf6	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q91YR74,7	0	9647,7	0	25588
Rac GTPase-activating protein 1	70,158	Racgap1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9WVM15,1	0	19466	0	14968
MCG1697, isoform CRA_a (Protein Saxo1)	54,783	Saxo1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	B1AXP39	0	28777	0	4917,4
SWI/SNF complex subunit SMARCC1;SWI/SNF co	122,78	Smarrcc1;Smarrcc2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3UNN4;Q3UPK0;Q3UI'1,5	0	13765	0	19343
CCR4-NOT transcription complex subunit 1	260,95	Cnot1	6	11,4	KO-Pos only	B7ZWL1;B2RXK3;Q6ZQ'2,9	1820,8	20760	0	13631
Sideroflexin-3	30,951	Sfxn3	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U4F0;Q91V6110	0	17689	0	14447
Beta/gamma crystallin domain-containing protei	114,26	Crybg3	4	WT-Pos only	KO-Pos only	P80W496	0	17116	0	14984
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	54,191	Ddx6	2	WT-Pos only	KO-Pos only	B548234,3	0	12753	0	19296
Heat shock 70 kDa protein 4	94,08	Hspa4	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q99L75;Q3UZG2;Q571'13,2	0	11302	0	20534
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	66,612	Eif3l	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8QZY14,1	0	14454	0	17234
Axonemal dynein light intermediate polypeptide	29,68	Dnal1l	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q0IIN3;Q8BVN8;Q147V'9,3	0	17126	0	14427
Putative ATP-dependent RNA helicase TDRD9	155,98	Tdrd9	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q14BI7;A0A0A6VWV8'2,5	0	13608	0	14964
Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone k	59,69	Dak	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8VC30;Q3UTZ49,2	0	9885,1	0	17834
Collagen alpha-2(IV) chain;Canstatin	167,32	Col4a2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	B2RQ08;P081221,7	0	15481	0	11846
60S ribosomal protein L7-like 1	28,543	Rpl7l1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9D8M4;Q3U8B99,8	0	14099	0	12535
Spermatogenesis-associated protein 5;Katanin p	91,287	Spat5;Katnal2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0G2JFY0;A0A0A0M'3	0	13265	0	12515
Enkurin	29,527	Enkur	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q4KL11;Q6SP9710,6	0	18687	0	6923,9
CD109 antigen	161,66	Cd109	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A6MDD3;Q8RA223,9	0	11265	0	11283
ATP-dependent RNA helicase DDX3Y;Putative AT	73,384	Ddx3y;D1Pas1;Ddx3x	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3U484;B9E1K4;B9EKE'3,2	0	11234	0	11035
Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1	274,22	Sptbn1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q62261;Q8BQ35;Q5DT'1	0	14928	0	6975,3
Proteasome subunit beta type;Proteasome subu	22,866	Psmb2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BJX0;Q9R1P312,4	0	10422	0	11056
Nucleolar protein 10	54,007	Nol10	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q3TPG4;Q3UFZ4;Q3TU'6,6	0	7422	0	13283
Myosin-9	226,37	Myh9	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8VDD51,8	0	5980,4	0	14346
MCG147815 (Protein H2bfm) (Uncharacterized p	26,094	H2bfm	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q9DAB58,5	0	10768	0	9501,1
RNA polymerase-associated protein CTR9 homol	107,68	Ctr9	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q05CJ7;Q05DK2;Q620'13,6	0	6995,5	0	13229
Collagen alpha-4(VI) chain	250,8	Col6a4	4	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AX522,6	0	6124,5	0	13523
Leucine-rich repeat-containing protein 34	46,246	Lrrcc34	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0AUN5;Q14B04;Q9DA'5,3	0	8403,5	0	10695
Protein FAM208B	264,28	Fam208b	4	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5DTT32,9	0	7702,1	0	11059
Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	228,61	Dync1h1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80U36;Q9JHU42,3	0	5285,1	0	11278
Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	92,104	Tsr1	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q5SWD95,2	0	10602	0	5631,9
Bromodomain adjacent to zinc finger domain pr	178,17	Baz1a	2	WT-Pos only	KO-Pos only	G3UWZ0;Q883791,4	0	7605,7	0	8178,8
Probable helicase with zinc finger domain	182,04	Helz	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AAU3;A0A0R4J0Y3;C'1,8	0	7444,3	0	8217,5
Coiled-coil domain-containing protein 40	136,77	Ccdc40	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q8BI792,3	0	10849	0	4755,1
Unconventional myosin-Ib	125,03	Myo1b	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E9QNH6;E9Q580;Q7TQ'2,1	0	8669,1	0	6764,3
Probable helicase senataxin	297,59	Setx	3	WT-Pos only	KO-Pos only	A2AKX32	0	8847,8	0	6416,3
Tight junction protein ZO-1	127,25	Tjp1	2	WT-Pos only	KO-Pos only	A0A0U1RPW2;B9EHJ3;2,8	0	6997,2	0	7104,5
Laminin subunit beta-2	196,58	Lamb2	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q612921,4	0	5838,4	0	6840,9
Unconventional myosin-Vb	210,54	Myo5b	2	WT-Pos only	KO-Pos only	G5E8G6;G3X9Y9;P2127'1,5	0	7980,3	0	4655,9
Serine/threonine-protein kinase 31	112,35	Stk31	2	WT-Pos only	KO-Pos only	E9Q260;Q99MW1;E9P'2,7	0	6328,2	0	4061,5
Granulins;Acrogranin;Granulin-1;Granulin-2;Gra	63,458	Grn	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q544Y8;Q3UC19;Q3TX'4,4	0	4268,5	0	2132,1
Cytoskeleton-associated protein 5	189,49	Ckap5	3	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80U79;A0A0R4J0K2;K'1,9	0	1359,5	0	1895,8
Hydrocephalus-inducing protein	581,52	Hydin	2	WT-Pos only	KO-Pos only	Q80W930,5	0	1190,2	0	463,09

Abstract

The process of sperm maturation, spermiogenesis, is unique in many ways and involves major reorganizations of the different cellular compartments. During the elongated and condensed spermatid stages, this process includes a drastic compaction of the paternal genome that will be transmitted to the future offspring. During this process almost all histones are removed and replaced by specific proteins, the protamines, which associate with the paternal genome and compact it in the mature spermatozoa. This reorganization process is essential to avoid DNA damage before and during fertilization and to ensure that a specific paternal epigenome is correctly transmitted to the offspring. The mechanisms of chromatin reorganization first involve a wave of histone hyperacetylation, which then induces their removal. The incorporation of H2A.L.2, a testis-specific histone H2A variant, allows the nucleosome to adopt a more open structure and allows the invasion of the nucleosome by transition proteins that control in turn the recruitment of protamines and their incorporation into the paternal genome. Protamine-2 is synthesized as an immature precursor that requires multiple cleavages to be properly assembled on DNA. However, the functional role of protamine-2 maturation in normal spermatogenesis and its implication in infertility have not been explored. My thesis work aims to characterize this maturation process using a specific antibody against Pre-Prm2. We demonstrated that there was an accumulation of Pre-Prm2 in several mouse models, with defects in the histone-to-protamine transition process and that the maturation process was therefore related to histone removal. We were also able to demonstrate that the transition proteins and the protamines act simultaneously and that the two proteins interact with each other. Furthermore, the use of the antibody specific to human Pre-PRM2 shows that there is retention of Pre-PRM2 in some infertile patients and that this retention correlates with defects in DNA compaction, acrosome formation and sperm motility. Finally, from a certain threshold of aberrant accumulation of Pre-PRM2, the fertilization rate is decreased. In conclusion, this study has shown that poor maturation of PRM2 has consequences on the male genome organization, and that this tool could provide essential information in the human clinic in the future.

Chromatin reorganization, Spermatogenesis, Protamine-2, Maturation, Infertility