



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie du développement - Oncogénèse

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Émeline FONTAINE

Thèse dirigée par **Stephan DIMITROV (EDCSV)**, cnrs
et codirigée par **Thierry GAUTIER (EDCSV)**, Chargé, UGA
préparée au sein du **Laboratoire CRI IAB - Centre de Recherche
Oncologie/Développement - Institute for Advanced
Biosciences**
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

**Le variant d'histone H3.3 dans la
spermatogenèse : inactivation des
chromosomes sexuels et régulation des
piARN**

**The histone variant H3.3 in
spermatogenesis : sexual chromosomes
inactivation and piRNA regulation**

Thèse soutenue publiquement le **23 octobre 2018**
devant le jury composé de:

Madame CATHERINE GHEZZI

PROFESSEUR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Présidente du jury

Madame JULIE COCQUET

CHARGE DE RECHERCHE, INSERM DELEGATION PARIS, Rapporteur

MONSIEUR CHRISTOPHE THIRIET

CHARGE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION BRETAGNE PAYS
DE LOIRE, Rapporteur

MADAME CATHERINE PATRAT

PROFESSEUR DES UNIV - PRATICIEN HOSP., UNIVERSITE PARIS 5,
Examinateur

MONSIEUR CHRISTOPHE ARNOULT

DIRECTEUR DE RECHERCHE, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES,
Examinateur

***A mon charpentier philosophe et
mes enfants Élisabeth et Esteban***

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame Julie Cocquet et Monsieur Christophe Thiriet pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Je remercie également Mesdames Catherine Ghezzi et Catherine Patrat pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je remercie Stefan Dimitrov pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour la confiance qu'il a su m'accorder tout au long de ces années de thèse. Je remercie également Thierry Gautier pour sa bonne humeur sans faille.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude particulièrement à Christophe Arnoult pour sa disponibilité (même depuis l'Espagne un vendredi soir à 21h !), pour ses conseils avisés tant humainement que scientifiquement ainsi que pour sa bonne humeur qui ont été d'un grand soutien dans les moments difficiles. Merci pour ton engagement dans ce projet et la relecture de ce manuscrit, tu n'étais pas obligé de le faire mais tu l'as fait! Merci.

Un grand merci va à l'INSERM et notamment à mes supérieurs Dominique Pella, Virginie Farré, Corinne Pareti ainsi qu'aux agents responsables de la formation Bénédicte Terrier, Maud Madrid, Véronique Chap, Marina Verges, Marlène Mazzorana pour m'avoir autorisé à réaliser cette formation diplômante et soutenu dans ce projet depuis le début.

Je remercie également mon comité de thèse composé de Dimitrios Skoufias et Thierry Buchou pour avoir pris le temps nécessaire à la relecture de mes manuscrits de comité de suivi de thèse et à l'évaluation de mon travail. Mention spécial pour Thierry Buchou alias « le grand chef », je te remercie pour ton soutien ainsi que ta bonne humeur, non altérée, après des heures passées à 4°C pour m'apprendre la sédimentation !

Je ne peux continuer ce chapitre sans parler du staff de l'IAB : ITA, étudiants, maitres de conférences, chercheurs, administratif qui par leurs conseils, leur confiance, leur aide, leur bonne humeur facilitent la vie au quotidien. Je parle de Aude (merci pour ton sourire malgré la pression des commandes et pour avoir débloqué tant de situations!), de Bertrand (... et mon Gewurz ???), de Sam (connecté même le 24 décembre pour rendre service...), de Sandra (pour nos discussions sur la qPCR), de Guillaume (pour ta bonne humeur et pour avoir refait ma culture musicale dans le domaine du HardRock...) et bien d'autres Corinne M, Sandrine, Sophie, Alexandra, Véronique F, Faycal, Christiane, Jp, Emeline, Jessica, Celine, Morgane, Max, Dalenda, Gregory, Corinne, Patrick, Natacha P, Anthony, Alexandre, Amélie.... Je

remercie également mon équipe Geneviève, Jan, Yohan, Marc, Lorrie, Defne, Daniel et Véronique ainsi que nos collaborateurs Christophe Papin et Ali. Hamiche. Notamment, un grand merci à Natacha Herlem et Hélène Medjkane pour leur professionnalisme, leur soutien dans les moments compliqués ainsi qu'à Michail pour ton sourire, tes dessins et ta bonne humeur communicative. Je remercie également Pierre Hainaut pour son écoute et son soutien dans l'aboutissement ce projet.

Je tiens aussi tout particulièrement à remercier les membres de la plateforme d'imagerie Mylène, Alexei et Jacques pour leur disponibilité, leurs enseignements et leur patience à toute épreuve. C'est une chance d'avoir une plateforme d'aussi haut niveau et tenue par des personnes avec autant de savoir faire, de pédagogie et de chaleur humaine.

A Laetitia Vanwonderghem Falcon, merci pour ton indéfectible amitié, ta clairvoyance, la bonne humeur qui te caractérise tant et tous tes bons conseils. Un grand merci à mes amis de toujours Océ, Fred, Brun's, Loic, Damien, Cathy, Lolo, Julien et Aurélie à nos soirées, nos galères et nos joies...

Désormais, je tiens à remercier ceux qui me portent depuis le début mes parents sans qui je ne serais pas là, merci de votre amour et de votre soutien dans tous les domaines. J'ai beaucoup de chance de vous avoir à mes côtés. Merci également à Dam, Oliv, Sarah dM, Alice, Isa, Thierry, Sarah C et Julio pour leur bonne humeur et leur soutien. Merci à tous mes neveux et nièces qui me font tant rigoler ! Merci à Alban pour ton soutien, tes BBQ et ton humour....si particulier ! Merci à Steph, il ne suffira peut être pas d'une vie pour te remercier de tout ce que tu as déjà fait ! Merci pour ta gentillesse, ta grandeur d'âme et pour la relecture de ce manuscrit.

Je terminerai ces quelques lignes en remerciant Manu, il est rare de rencontrer des personnes dotées d'une intégrité, d'une honnêteté et d'une grandeur d'âme pareille. Pour te remercier dignement, il me faudrait au moins autant de pages que ce manuscrit en contient ! Merci pour tout et bien plus encore.... Ces dernières lignes vont à nos deux loulous, Élisabeth et Esteban que j'aime tant.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	8
ABRÉVIATIONS DES GÉNOTYPES.....	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	11
CHAPITRE I. INTRODUCTION	12
I.1 LA CHROMATINE.....	12
I.1.1 <i>Dynamique de la chromatine</i>	12
I.1.1.1 Les niveaux de compaction chromatinienne.....	12
I.1.1.2 Le nucléosome unité de base de la chromatine	13
I.1.1.3 Territoires fonctionnels.....	15
I.1.1.4 La régulation épigénétique.....	16
I.1.1.5 Incorporation de variants d'histones	19
I.1.2 <i>Le variant d'histone H3.3</i>	27
I.1.2.1 H3.3 : Une histone ancestrale	28
I.1.2.2 H3.3 les généralités.....	29
I.1.2.3 Structure des gènes <i>H3f3a</i> et <i>H3f3b</i>	30
I.1.2.4 Les chaperonnes de H3.3.....	32
I.1.2.5 Le potentiel oncogénique de H3.3	37
I.1.2.6 Importance de H3.3 dans la fertilité.....	39
I.2 L'ORIGINE DE LA VIE, VUE À TRAVERS LA SPERMATOGENÈSE.....	41
I.2.1 <i>Le déroulement de la spermatogenèse</i>	41
I.2.1.1 Rappel sur l'appareil génital masculin.....	41
I.2.1.2 Les étapes de la spermatogenèse.....	44
I.2.1.3 La phase I : Les cellules souches germinales	49
I.2.1.4 La phase II : Méiose et brassage génétique.....	50
I.2.1.5 La phase III : La spermiogenèse	58
I.2.2 <i>Les chromosomes sexuels, un monde à part</i>	62
I.2.2.1 Les chromosomes sexuels en méiose.....	63
I.2.2.2 Les chromosomes sexuels en post-méiose	67
I.3 RÉTROTRANSPOSONS ET ARN INTERFÉRENTS	69
I.3.1 <i>Les rétrotransposons</i>	69
I.3.1.1 Importance des éléments transposables dans le génome	69
I.3.1.2 Les éléments transposables : transposons et rétrotransposons.	70
I.3.1.3 Les rétrotransposons	71
I.3.1.4 La structure des ERV	73
I.3.1.5 Régulation des éléments transposables : les ARN interférents	75
I.3.2 <i>Les ARN interférents</i>	76
I.3.2.1 Les différents types d'ARN interférents	77
I.3.2.2 L'organisation des piARN dans le génome	78
I.3.2.3 Organisation génomique des clusters de piARN.....	80
I.3.2.4 La régulation des clusters de piARN	81
I.3.2.5 Les partenaires des piARN	82
I.3.2.6 La voie des piARN et la fertilité masculine	83
I.3.2.7 La biogenèse des piARN	84

CHAPITRE II. OBJECTIFS.....	87
CHAPITRE III. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	90
III.1 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE	90
III.1.1 Construction de lignées transgéniques.....	90
III.1.2 Extraction d'ADN génomique	91
III.1.3 Le géotypage	91
III.1.4 Extraction d'ARN	92
III.1.5 Réverse transcription et PCR quantitative	92
III.1.6 Séquençage de l'ARN (RNA-Seq).....	94
III.2 TECHNIQUES IN SITU.....	94
III.2.1 Isolation de cellules germinales du tubule séminifère.....	94
III.2.2 Isolation des spermatozoïdes.....	95
III.2.3 Inclusion en paraffine, coupe histologiques et coloration à l'hémaroxylène éosine.....	95
III.2.4 Immunofluorescence et comptage cellulaire	96
III.2.5 Identification des cellules mitotiques, méiotiques et post-méiotiques	98
III.2.6 Détermination des stades des tubules séminifères	98
III.2.7 Test apoptotique	99
III.2.8 Gradient de BSA : Isolations de cellules en méiose et post-méiose	100
III.2.9 Coloration à la chromomycine A ₃	102
III.2.10 Coloration au bleu d'aniline	103
III.2.11 Analyse de la morphologie des spermatozoïdes	103
III.2.12 Analyse automatique de la motilité des spermatozoïdes.....	103
III.2.13 Fécondation In Vitro	104
III.3 TECHNIQUES DE BIOCHIMIE.....	104
III.3.1 Extraction de protéines	104
III.3.2 Western blot	105
CHAPITRE IV. RÉSULTATS	106
IV.1 PUBICATION N°1: DUAL ROLE OF HISTONE VARIANT H3.3 IN SPERMATOGENESIS: POSITIVE REGULATION OF piRNA TRANSCRIPTION AND INACTIVATION OF X-CHROMOSOME.....	106
CHAPITRE V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	153
V.1 LES CHROMOSOMES SEXUELS : QUEL RÔLE POUR H3.3 ?	157
V.1.1 Rôle de H3.3 dans l'établissement de l'inactivation des chromosomes sexuels en méiose.....	157
V.1.2 Dépôt de H3.3 sur les chromosomes sexuels en pachytène.....	158
V.1.3 H3.3, marque épigénétique mémoire durant la spermatogenèse ?	159
V.2 ÉTAT DE LA CHROMATINE SUR LES CHROMOSOMES SEXUELS.....	161
V.2.1 Structure de la chromatine par H3.3 sur les chromosomes sexuels.....	161
V.2.2 Composition de la chromatine en l'absence de H3.3B sur les chromosomes sexuels ?.....	162
V.3 LA RÉGULATION DES piARN PAR H3.3.	165
V.4 RÉGULATION DES RÉTROTRANSPOSONS DURANT LA SPERMATOGENÈSE ET IMPACT DE H3.3.....	167
V.5 LE PARADOXE H3.3.....	169
V.6 H3.3 ACTEUR ESSENTIEL DE LA SPERMATOGENÈSE ET DE LA MÉIOSE.....	169

V.7	INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE	170
V.8	CONCLUSION GÉNÉRALE	171
CHAPITRE VI. RÉFÉRENCES		173
CHAPITRE VII. ANNEXES.....		196
VII.1	PUBLICATION N°2: THE FLEXIBLE ENDS OF CENP-A NUCLEOSOME ARE REQUIRED FOR MITOTIC FIDELITY.	196

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	: ångström	K27M	: Mutation de la lysine 27 en méthionine
A-MYB	: MYB proto-oncogene like 1	K36M	: Mutation de la lysine 36 en méthionine
ARNi	: ARN interférent	KAP1	: KRAB [Kruppel-Associated Box Domain]-Associated Protein 1
ARNm	: ARN messagé	MDC1	: Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
ATR	: Ataxia Telangiectasia and Rad3 related	miARN	: MicroARN
ATRX	: Alpha-thalassemia/mental retardation X-linked	MILI	: Piwi-like protein 2
BRCA1	: BReast CAncer 1	MIWI	: Mouse PIWI
BTBD16	: BTB (POZ) domain containing 16	MIWI2	: Mouse PIWI 2
C57BL/6	: C57 black 6	MLH1	: MutL homolog 1
CAF1	: Chromatin assembly factor-1	MLH3	: MutL homolog 3
CASA	: Computer-assisted sperm analysis	MRE11	: Homolog, double strand break repair nuclease
CENP-A	: CENtromeric Protein A	MSCI	: Inactivation des chromosomes sexuels en méiose
DAXX	: Death domain-associated protein 6	PAR	: Pseudo-Autosomal Region
DMC1	: Disrupted meiotic cDNA 1	piARN	: PIWI-interacting RNA
ERV	: Rétrovirus endogène	PIWIL1	: Piwi-like protein 1
ET	: Eléments transposables	PMSC	: Post-meiotic sex chromatin
FIV	: Fécondation <i>in vitro</i>	PNA	: Peanut agglutinin
G34L	: Mutation de la glycine 34 en leucine	PPT	: PolyPurineTract
G34R	: Mutation de la glycine 34 en arginine	PRC2	: Complexe repressif polycomb 2
G34V	: Mutation de la glycine 34 en valine	RA	: Rétinoïque acide
G34W	: Mutation de la glycine 34 en tryptophane	RNF8	: RING-type E3 ubiquitin transferase
H2AK119ub	: Ubiquitination de la lysine 119 sur l'histone H2A	RT	: Reverse transcriptase
H3K27ac	: Acétylation de la lysine 27 sur l'histone H3	SCML2	: sex comb on midleg-like 2
H3K27me3	: Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3	SCP1	: Complexe synaptonémal 1
H3K36me	: Méthylation de la lysine 36 de l'histone H3	SCP3	: Complexe synaptonémal 3
H3K36me3	: Triméthylation de la lysine 36 sur l'histone H3	siARN	: Small Interfering RNAs
H3K4me2	: Diméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3	SINE	: Short-INterspersed Elements
H3K4me3	: Triméthylation de la lysine 4 sur l'histone H3	siRNA	: Short interfering RNA
H3K9ac	: Acétylation de la lysine 9 sur l'histone H3	SOX9	: Sex determining region y]-box 9
H3K9me3	: Triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3	SPO11	: Initiator of meiotic double stranded breaks
H4K20me3	: Triméthylation de la lysine 20 sur l'histone H4	TDRD1	: Tudor domain containing 1
H4K8ac	: Acétylation de la lysine 8 sur l'histone H4	TDRD3	: Tudor domain containing 3
H4K8hib	: Ubiquitination de la lysine 8 sur l'histone H4	TDRD5	: Tudor domain containing 5
H4S47ph	: Phosphorylation de la sérine 47 sur l'histone H4	TDRD6	: Tudor domain containing 6
HA	: Hémagglutinine	TP1	: Protéine de transfert 1
HIRA	: Histone Regulator A	TP2	: Protéine de transfert 2
HIV	: Virus de l'immunodéficience humaine	Trim33	: Tripartite motif-containing 33
HP1	: Heterochromatine protéine 1	TUNEL	: Terminal Transferase dUTP Nick end Labeling
ICSI	: Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde	UBN1	: Ubinuclein-1
ISWI	: Imitation Switch	γH2AX	: Phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2AX

ABRÉVIATIONS DES GÉNOTYPES

H3.3^{WT} : Souris homozygote sauvage.

H3.3B^{KO} : Souris homozygote ayant perdu les deux allèles *H3f3b*.

H3.3A^{KO} : Souris homozygote ayant perdu les deux allèles *H3f3a*.

H3.3B^{HA} : Souris hétérozygote dont l'un des deux allèles *H3f3b* porte un tag HA-FLAG-FLAG.

H3.3A^{HA} : Souris hétérozygote dont l'un des deux allèles *H3f3a* porte un tag HA-FLAG-FLAG.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine.	13
Figure 2 : Représentation de la structure cristallographique de la particule cœur du nucléosome vue de face (A) et vue de profil (B).	15
Figure 3 : Modèle structurale du complexe entre le domaine globulaire de H1 (gH1) de <i>Drosophila</i> et le nucléosome: représentation en surface (A) et en ruban (B).	16
Figure 4: Spermatide ronde vue au microscope électronique.	17
Figure 5 : Modes de remodelage de la chromatine.	18
Figure 6 : Structure générale des 4 facteurs de remodelage de la chromatine.	19
Figure 7 : représentation des principales modifications post-traductionnelles des histones.	19
Figure 8 : Représentation schématique du nucléosome et des différentes variantes d'histones de cœurs le composant.	21
Figure 9 : Variants de l'histone H2A.	22
Figure 10 : Variants de l'histone H2B.	25
Figure 11 : Alignement de la séquence en aminoacides des histones de la famille H3 de mammifères.	26
Figure 12 : Représentation schématique de l'émergence des différents variants d'histones non centromériques de la famille H3 durant l'évolution des espèces.	29
Figure 13 : Représentation schématique des différences entre H3.3 et ses deux histones canoniques H3.1 et H3.2.	31
Figure 14 : Analyse des séquences génomiques et protéiques des gènes <i>H3f3a</i> et <i>H3f3b</i> de <i>Mus musculus</i> .	32
Figure 15 : Image d'un chromosome où sont représentées les régions particulières de déposition de H3.3 en fonction de sa chaperonne.	33
Figure 16 : Structure cristallographique de H3.3 et DAXX.	34
Figure 17 : Structure cristallographique de l'association du dimère H4-H3.3 avec ses complexes de remodelage.	37
Figure 18 : Mutations de H3.3 dans différents tissus cancéreux associés à l'âge des patients lors de leur diagnostic.	39
Figure 19 : Testicule de souris et sa structure interne. Schéma représentant une coupe de testicule.	42
Figure 20 : Coupe histologique transversale d'un testicule de souris adulte et plus précisément d'un tubule séminifère.	44
Figure 21: Représentation des différentes étapes de la spermatogenèse.	46
Figure 22 : Génération de vagues de différenciation de l'épithélium séminifère.	47
Figure 23 : Cycle de l'épithélium du tubule séminifère.	48
Figure 24 : Le modèle proposé par Griwold basé sur des pulsations d'acide rétinolique pour générer les cycles de l'épithélium du tubule séminifère.	49
Figure 25 : Relative quantité d'expression de 1286 groupe d'amorces régulés avec un facteur 4 dans différents types cellulaires et dans chaque étape de la spermatogenèse.	50
Figure 26 : Schéma représentant la chronologie des différentes étapes de la spermatogenèse chez la souris.	52
Figure 27 : Représentation schématique de la dynamique d'apparition et de disparition du complexe synaptonémal au cours de la méiose chez la souris.	57
Figure 28 : Formation de l'acrosome chez la souris vue par immunofluorescence et par microscopie électronique.	60
Figure 29 : Représentation schématique de la formation du spermatozoïde lors de la spermiogenèse chez la souris.	61
Figure 30 : Schéma représentant le profil d'expression des acteurs épigénétiques majeurs durant la spermiogenèse chez la souris.	62
Figure 31 : Activité des chromosomes sexuels durant la spermatogenèse.	66
Figure 32 : Répartition de la composition des séquences du génome Humain.	71
Figure 33 : Représentation schématique de la formation des éléments transposables de classe I et de classe II.	72
Figure 34: Classification des rétrotransposons.	73
Figure 35: Structure génomique des rétrovirus endogènes intacts et des LTR « solo ».	75
Figure 36: Répartition des piARN durant la spermatogenèse.	81
Figure 37: Représentation de la séquence régulatrice du promoteur des piARN pachytènes.	82
Figure 38 : Expression différentielle des protéines PIWI durant la spermatogenèse.	84
Figure 39 : Biogenèse des piARN chez la souris.	86
Figure 40: Image représentant le montage de la chambre de sédimentation pour séparer les cellules germinales par gradient de BSA.	103
Figure 41 : Illustration représentant la formation d'un nucléosome contenant le variant d'histone H3.3 en présence ou en absence de la forme H3.3B sur les chromosomes sexuels dans la spermatogenèse.	175
Figure 42 : Distribution des séquences répétées RLTR10B et RLTR10B2 sur un caryotype de souris.	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste des amorces pour le génotypage.	91
Tableau 2 : Amorces pour la RT-qPCR.	93
Tableau 3 : Liste des anticorps primaires.	97
Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires.	97

CHAPITRE I. INTRODUCTION

I.1 LA CHROMATINE

I.1.1 Dynamique de la chromatine

I.1.1.1 Les niveaux de compaction chromatinienne

Au sein des cellules, la molécule d'ADN (d'un diamètre de 2 nm) qui porte l'information génétique est engagée dans une structure particulière, la chromatine. La chromatine possède différents niveaux d'organisation et de condensation (Figure 1). Le premier niveau de condensation est le nucléosome, l'unité structurale de base de la chromatine. Il est composé d'environ 146 pb d'ADN qui s'enroulent de 1,65 tours (hélice gauche) autour d'un octamère de protéines histones pour former la particule cœur du nucléosome. Les particules cœurs des nucléosomes sont reliées par de l'ADN internucléosomique nommé également ADN de liaison. La répétition de ce motif à intervalles réguliers (environ 200 pb) donne naissance à une structure de 11 nm, dite en "collier de perles" ou en "chapelet" (Felsenfeld and Groudine, 2003).

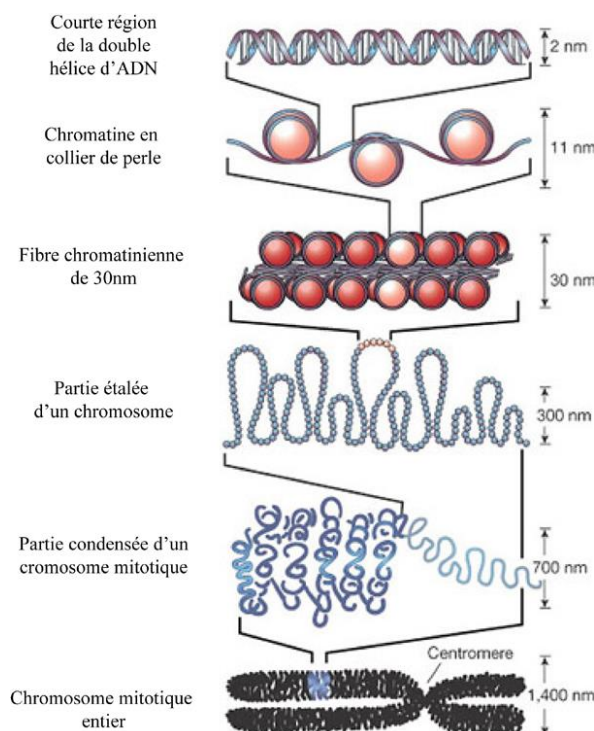


Figure 1 : Les différents niveaux d'organisation de la chromatine. (modifié de Felsenfeld and Groudine, 2003). Schéma représentant les différents niveaux de compaction de la chromatine allant de la chromatine la moins compactée dite « en collier de perle » au chromosome métaphasique forme la plus condensée.

Une autre histone, l'histone de liaison (H1) se fixe sur les segments d'ADN sortant et entrant du nucléosome. L'addition de cette histone permet une condensation en spirale qui donne naissance à une fibre de 30 nm de diamètre. Cette fibre subit alors une série de repliements successifs sur elle-même pour aboutir au chromosome métaphasique condensé qui a été observé dès 1882 par W. Flemming (Flemming, 1882).

I.1.1.2 Le nucléosome unité de base de la chromatine

Les histones de cœur :

Les histones de cœur sont extrêmement conservées au cours de l'évolution. Elles sont retrouvées chez les plantes, les animaux, les eucaryotes inférieurs et même chez les archéobactéries ce qui laisse penser qu'elles ont peut-être évolué à partir d'une «protohistone» commune (Wolffe, 1992). Ces petites protéines, de masse moléculaire comprise entre 11 et 15 kDa sont au nombre de quatre : H3, H4, H2A et H2B. Malgré une faible homologie de séquence entre les quatre histones, leurs structures secondaires et tertiaires sont remarquablement similaires. Ces protéines possèdent deux domaines distincts : une queue N-terminale peu structurée et un domaine central et C-terminal qui adoptent une structure particulière dite en « repliement histone » (ou « histone fold »). Leurs extrémités N-terminales sont fortement chargées positivement et riches en lysines pour les histones H2A et H2B ou en arginine pour les histones H3 et H4. Les interactions électrostatiques entre les charges positives des histones et les charges négatives des groupements phosphates de l'ADN maintiennent l'ADN autour de l'octamère (Clark and Kimura, 1990). Le domaine « histone fold » est formé de trois hélices (α_1 , α_2 , α_3) séparées par deux boucles L1 et L2 (Wang et al., 1994) comme représenté sur la figure 2 (Luger et al., 1997).

Architecture de l'octamère d'histone, particule cœur du nucléosome :

Résolue à 1,9 Å par cristallographie (Richmond and Davey, 2003), la structure du nucléosome est formée d'une structure tripartite, constituée d'un tétramère central (H3/H4)₂ flanqué par deux dimères H2A/H2B (Figure 2). Les interactions entre deux dimères

s'effectuent grâce aux boucles d'histone L1 et L2. Les 2 dimères H3/H4 interagissent entre eux via les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de H3 pour former le tétramère de $(H3/H4)_2$. Puis ce tétramère $(H3/H4)_2$ s'associe aux deux dimères H2A/H2B via des ponts hydrogènes et des liaisons hydrophobes entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ des histones H2B et H4 (Luger et al., 1997). Seules les extrémités N-terminales des histones de cœur dépassent de l'ensemble du nucléosome et sont libres d'interagir avec l'ADN ou d'autres protéines en fonction de leurs états de charges.

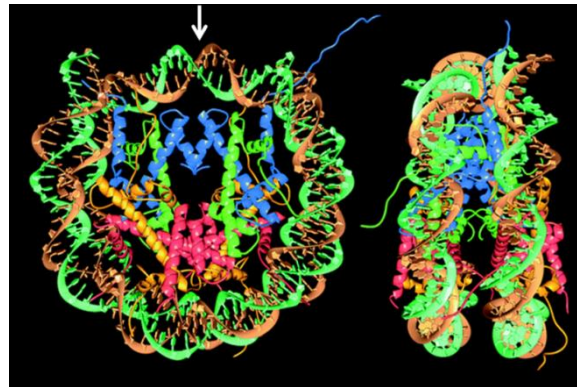


Figure 2 : Représentation de la structure cristallographique de la particule cœur du nucléosome vue de face (A) et vue de profil (B). L'ADN (marron et vert) s'enroule sur 146 paires de bases autour de l'octamère d'histone composé de huit histones (bleu : H3 ; vert : H4 ; orange : H2A ; rouge : H2B). L'axe de symétrie du nucléosome appelé « dyad axis » est représenté par une flèche blanche. (D'après luger et al., 1997)

L'histone de liaison : H1.

L'histone H1 et ses variants sont des histones dites de liaison car elles ne se localisent pas au cœur du nucléosome mais à l'extérieur au niveau de l'entrée et de la sortie des deux brins d'ADN (Figure 3). La structure de H1 ne présente pas d'homologie avec les histones cœurs. Elle est composée d'un domaine globulaire structuré au centre dit en « wing-helix » (Brown et al., 2006; Clore et al., 1987) et d'un domaine N et C-terminal à chaque extrémités non structurées sujet à de nombreuses modifications post-traductionnelles. L'histone H1 stabilise le nucléosomes *in vitro* en rendant notamment son glissement le long de l'ADN plus difficile (Bednar et al., 2017; Pennings et al., 1994; Varga-Weisz et al., 1994). Il influence également le degré de compaction de la chromatine et son éviction conduit à une décondensation (Fan et al., 2005; Thoma.F, Koller.TH, and Klug.A, 1979).

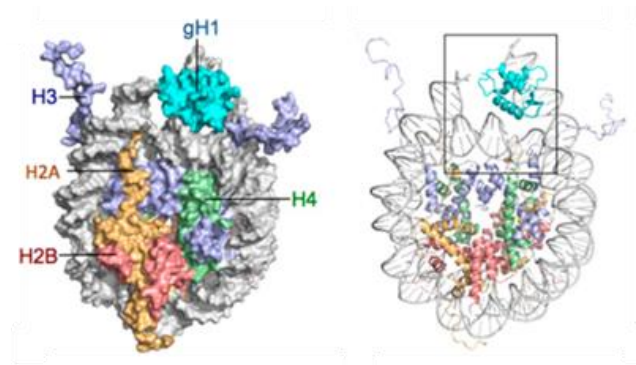


Figure 3 : Modèle structurale du complexe entre le domaine globulaire de H1 (gH1) de *Drosophila* et le nucléosome: représentation en surface (A) et en ruban (B). Le rectangle encadre la dyade, l'ADN entrant et sortant ainsi que H1 (d'après Zhou et al., 2013).

I.1.1.3 Territoires fonctionnels

L'ADN n'est pas organisé aléatoirement dans la cellule mais selon des territoires fonctionnels. En microscopie optique, on observe dans le noyau d'une cellule en interphase ces territoires distincts qui correspondent à deux types de structures chromatinienne : l'hétérochromatine et l'euchromatine (Figure 4).

L'hétérochromatine :

L'hétérochromatine est composée d'une chromatine dense et compacte, d'aspect opaque en microscopie. Du fait de sa compaction, l'ADN y est peu transcrit. Elle est localisée en périphérie du noyau et du nucléole. Des marques caractéristiques y sont associées comme la triméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 9 (H3K9me3) ou la présence de la protéine HP1 (heterochromatine proteine1) (Litt et al., 2001; Taverna et al., 2002). On distingue deux formes d'hétérochromatine l'une constitutive et l'autre facultative.

- L'hétérochromatine constitutive contient peu de gènes et est formée essentiellement de séquences moyennement ou fortement répétées telles que les séquences satellites (Grewal and Elgin, 2007). Ces régions sont situées au niveau des télomères, des régions péri centromériques et des centromères. Ces deux dernières régions s'associent chez les mammifères pour former une région particulière appelée le chromocentre (Taddei and Gasser, 2004). Cette hétérochromatine est stable et irréversible. Elle est transmise entre chaque division cellulaire constituant alors une mémoire épigénétique (Grewal and Elgin, 2007).

- L'hétérochromatine facultative est réversible et contient des régions codantes. Elle peut selon son contexte cellulaire, temporel et parental, être condensée ou décondensée pour un même type cellulaire. Chez les mammifères femelles, c'est notamment le cas du chromosome X inactivé qui présente des caractéristiques structurale et fonctionnelle de sa chromatine différentes de son homologue actif.

L'euchromatine :

L'euchromatine est une chromatine décondensée qui présente un aspect peu opaque en microscopie. Transcriptionnellement active, l'euchromatine est répartie à l'intérieur du nucléoplasme et contient les régions actives du génome. On retrouve dans cette zone des modifications d'histones caractéristiques telles que la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me) (Bernstein et al., 2005), la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, l'hyperacétylation des histones H3 et H4 (Grunstein, 1997; Santos-Rosa et al., 2002).

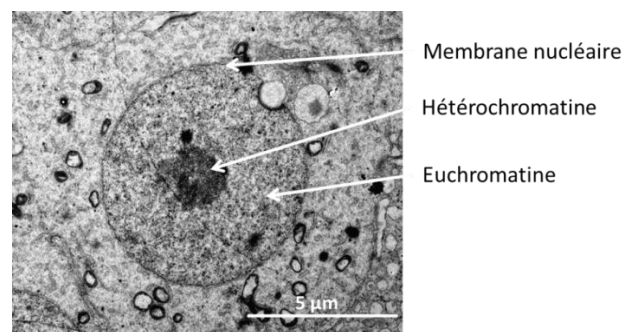


Figure 4: Spermatide ronde vue au microscope électronique. On observe autour du noyau la membrane nucléaire. La zone dense au centre du noyau est composée d'hétérochromatine constitutive. La zone moins dense dans le noyau est composée d'euchromatine.

I.1.1.4 La régulation épigénétique

Les nucléosomes ainsi que leurs positionnements sur la séquence régulent l'accessibilité à l'ADN. Cette accessibilité à l'ADN, permet à la cellule d'engager ou non des actions majeures nécessaires à son fonctionnement telles que la transcription, la réplication, la réparation de l'ADN ou la ségrégation des chromosomes lors des divisions cellulaires. Chaque type cellulaire dispose d'une organisation, d'une composition et d'une structure chromatinienne qui lui est propre en rapport avec ses besoins. Par exemple, les cellules souches changent l'expression de leurs gènes lorsqu'elles se différencient en cellules somatiques. Ces modifications de la chromatine sont la base des phénomènes dits «

épigénétiques » dont le rôle est de moduler l'expression du patrimoine génétique. Pour moduler l'expression de son patrimoine génétique, la cellule dispose de plusieurs outils pour rendre la structure de la chromatine plus dynamique notamment la méthylation de l'ADN, les complexes de remodelages, les modifications post-traductionnelles des histones et l'incorporation de variants d'histones.

Les complexes de remodelages :

Comme son nom l'indique le complexe de remodelage a pour but d'agir sur la structure de la chromatine pour la remodeler en provoquant un mouvement du nucléosome. Ils ont la capacité de déplacer un nucléosome en *cis*, par glissement, en *trans* par transfert ou même de réaliser une éviction totale ainsi ils peuvent moduler l'accès à l'ADN et par là-même spécialiser des régions de chromatine (Figure 5).

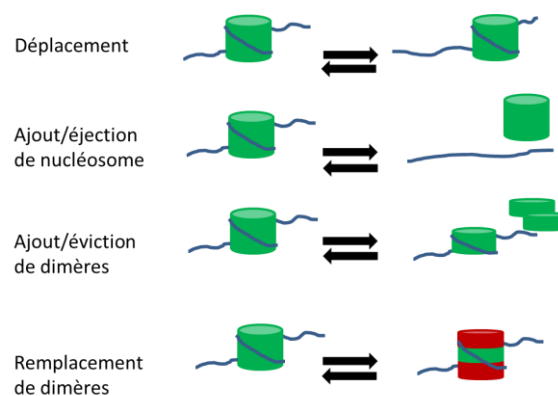


Figure 5 : Modes de remodelage de la chromatine. Les facteurs de remodelage ont la capacité de déplacer le nucléosome le long de l'ADN, d'ajouter ou d'enlever un nucléosome complet ou seulement des dimères et également de venir remplacer des dimères sur le nucléosome (vert dimère d'histone, en bleu l'ADN, en rouge de nouveaux dimères d'histones).

Ils sont constitués d'une sous unité ATPase qui leur procure l'énergie nécessaire pour altérer les liaisons ADN-protéine (Becker and Hörz, 2002). Les complexes de remodelage peuvent se subdiviser en quatre grandes classes selon les similarités de leurs sous-unités ATPase (Figure 6). La classe des ISWI (Imitation Switch) possède des domaines SANT (SWI3, ADA2, NCoR, TFIIB) capables de se lier aux queues des histones et à l'ADN. La famille des CHD (Chromodomain, Helicase, DNA binding) contient un domaine CHROMO qui se lie aux lysines méthylées. La famille des SWI/SNF (Switching defective/Sucrose

Diagram illustrating the domain organization of four classes of chromatin remodelers:

- Classe SWI/SNF:** Contains ATPase (red) and Bromodomaine (purple).
- Classe ISWI:** Contains ATPase (red) and SANT (blue).
- Classe CHD:** Contains Chromodomaine (purple), ATPase (red), and liaison à l'ADN (green).
- Classe INO:** Contains ATPase (red).

Elles affectent principalement les extrémités amino-terminales des histones. Il faut savoir que d'autres modifications ont été trouvées sur la partie C-terminale de H2A et H2B et dans le domaine « histone fold ». Ces modifications peuvent moduler les contacts histone-histone et histone-ADN entraînant une modification de l'architecture chromatinienne qui peut notamment favoriser ou défavoriser la transcription. Les modifications H3K9me3 ou H3K27me3 sont par exemple trouvées principalement dans des zones d'hétérochromatines télomériques et centromériques où la chromatine est fermée et la transcription réprimée. À l'inverse, un état hyperacétylé des histones H3 et H4 ou la di- ou triméthylation de H3K4 correspondent généralement aux régions actives (Tse et al., 1998).

Les modifications post traductionnelles participent à la régulation génique soit en provoquant directement la création d'une nouvelle structure chromatinienne soit en recrutant d'autres facteurs nucléaires. Ainsi il a été démontré que les lysines acétylées sont reconnues par les protéines à bromodomaines et les lysines méthylées par des chromodomaines (Marzluff et al., 2008; Bannister and Kouzarides, 2011; Zhang et al., 2010). Ces dernières années, de nombreux travaux ont mis en évidence une action coordonnée de certaines modifications post-traductionnelles. Les combinaisons complexes de ces modifications seraient associées à un processus physiologique bien précis et constituent un véritable « langage » nommé « code histone ». Du fait, de la complexité des environnements cellulaires, de la multitude de combinaisons de modifications post-traductionnelles, ce langage reste aujourd'hui encore mal compris. Nous aborderons dans le chapitre épigénétique et spermatogenèse ce langage qui évolue au cours de la différenciation des cellules germinales.

I.1.1.5 Incorporation de variants d'histones

Les généralités :

Bien que particulièrement conservées lors de l'évolution, les histones possèdent plusieurs variants non alléliques. À l'exception de H4, il existe pour chaque histone conventionnelle (H3, H2A, H2B et H1), des variants d'histones (Figure 8). Ces variants remplacent les histones canoniques au sein de la chromatine créant par là même un niveau supérieur de complexité épigénétique. Ils ont la capacité de venir modifier la structure nucléoprotéique en altérant les interactions ADN-protéines ou protéine-protéines. Portés par

des gènes distincts de leurs histones canoniques, ils présentent des degrés d'identité de séquence variables par rapport à leur histone canonique. En effet, si on compare deux variants de l'histone H3, H3.3 et CENP-A on remarque que H3.3 présente une homologie de séquence de 96% alors que CENP-A ne présente que 47%. (Figure 11).

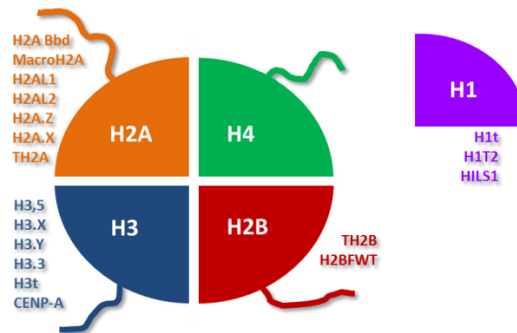


Figure 8 : Représentation schématique du nucléosome et des différents variants d'histones de cœurs le composant. En orange est représentée l'histone canonique H2A, en bleu H3, en rouge H2B ainsi que leurs variants associés. H4 est indiquée en vert et ne possède pas de variant d'histone connu à ce jour.

Les histones canoniques sont en général la forme majoritairement représentée. Transcrit durant la phase S, ces gènes sont organisés en tandem ce qui provoque de fait un apport massif d'histones conventionnelles à cette étape (Marzluff et al., 2008). Leurs incorporations à la chromatine se fait lors de la réplication. Au contraire, les variants d'histones ne montrent pas un pic d'expression en phase S et sont transcrits à partir d'un gène unique tout au long du cycle cellulaire. De nombreuses études ont été réalisées, ces dernières années, pour comprendre comment ces histones de remplacement sont incorporées à la chromatine et quelles sont les marques épigénétiques associées. À ce titre, il a été découvert par exemple que la phosphorylation de la sérine 139 de H2AX, un variant de H2A intervient dans la réparation des cassures double brins de l'ADN.

Découvert en 1977 par A. Zweidler, la composition des ARNm est différente entre les histones variants et canoniques (Franklin and Zweidler, 1977). En effet, les histones canoniques ont la particularité de ne pas posséder d'intron et de porter à l'extrémité 3' de leur ARNm une structure dite « en tige-boucle » qui induit une dégradation dépendante du cycle cellulaire (Pandey and Marzluff, 1987). En revanche, les variants d'histones possèdent une structure exonique/intronique et une queue poly-A qui augmente leur stabilité (Moss et al., 1989).

Leur synthèse ainsi que leur incorporation sont des évènements finement régulés tout au long du développement suggérant que chaque histone joue un rôle spécifique particulièrement important. En effet ces dernières années, de nombreux travaux montrent un lien entre la dérégulation ou la mutation de ces variants d'histones et le développement de pathologies humaines. Récemment, il a même été proposé que γ H2AX et CENP-A soient utilisés comme des marqueurs de pronostics vitaux dans de nombreux cancers. En effet, leur augmentation simultanée ou non est retrouvée dans de très nombreux tissus cancéreux et corrélée avec un faible pronostic vital (Palla et al., 2017; Sun et al., 2016).

Aujourd'hui et malgré de nombreuses études, il reste encore beaucoup à découvrir sur le rôle structural et fonctionnel exact de ces variants au sein de la chromatine. La multitude des possibilités de combinaisons entre les histones variants et d'autres modifications épigénétiques augmente la complexité du langage histone. Ces phénomènes agissent sur la structure de la chromatine pour la rendre plus ou moins active et dynamique et par là même, permettre à la cellule de moduler au mieux son activité.

Dans ce manuscrit, mes travaux se focalisent essentiellement sur les variants d'histones de H3 et notamment sur H3.3. Comme, j'ai étudié H3.3 dans le processus de spermatogenèse et que ce dernier fait intervenir de très nombreuses autres variants d'histones, je vais donc très brièvement vous décrire dans la partie suivante ces différents variants. Dans une seconde partie, nous reviendrons plus précisément sur les variants de H3.

Les variants d'histone de la famille H2A :

En plus de l'histone canonique H2A, il existe 9 histones de remplacement dans la famille des H2A : H2AZ, H2AX, macroH2A, H2AY, H2ABbd, tH2A, H2A.L1, H2A.L2.

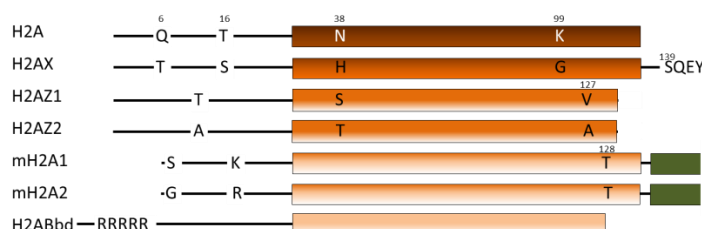


Figure 9 : Variants de l'histone H2A. Représentation de la structure secondaire de différents variants de l'histone canonique H2A chez l'homme. Le domaine structuré est représenté par un rectangle. Le rectangle marron foncé n'est pas à l'échelle et représente le macrodomaine. À gauche se situe la queue N-terminale non structurée indiquée par un trait noir (Maze et al., 2014).

H2A.Z : Le variant d'histone H2A.Z est hautement conservé au cours de l'évolution. Deux isoformes ont été identifiés, H2A.Z1 et H2A.Z2. Le rôle de ces deux variants est inconnu et les études ne font pas la distinction entre les formes 1 et 2. H2A.Z ne possède que 60% d'homologie avec son homologue H2A et aurait plusieurs fonctions biologiques importantes. Elle intervient dans la régulation de la transcription au niveau des séquences régulatrices des gènes sur les promoteurs mais aussi au niveau centromérique dans la régulation de l'hétérochromatine péricentrique pour la ségrégation des chromosomes (Billon and Côté, 2013; Raisner and Madhani, 2006). Très peu d'études se sont intéressées à H2A.Z dans la spermatogenèse. Néanmoins, son enrichissement dans les spermatides rondes a été mis en évidence au niveau de la vésicule sexuelle. L'hypothèse avancée est que H2A.Z viendrait en remplacement de macroH2A afin de maintenir une hétérochromatine facultative sur les chromosomes X et Y (Greaves et al., 2006).

H2AX : Le variant d'histone H2AX est conservé chez tous les eucaryotes supérieurs. Il est impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome en réponse aux lésions double-brins de l'ADN (Bassing et al., 2003). Sa phosphorylation sur la sérine 139 (nommée γ H2AX) au niveau des sites de cassures d'ADN permettrait le recrutement des facteurs de réparation comme BRCA1 dans les régions chromatinienne endommagées (Celeste et al., 2003). De fait, dans la spermatogenèse, γ H2AX est détecté durant l'enjambement de chromatides sœurs de la méiose. De façon surprenante, γ H2AX est enrichi spécifiquement sur les chromosomes sexuels dans le corps sexuel en pachytène sans que l'on sache pourquoi (Bellani, 2005; Turner et al., 2004).

MacroH2A : Variant spécifique des vertébrés, macroH2A a la particularité de posséder une queue C-terminale de très grande taille (20 KDa) nommée macrodomaine. MacroH2A se retrouve être trois fois plus grand que son histone canonique (Pehrson and Fried, 1992). Il existe deux isoformes de macroH2A : macroH2A1 et macroH2A2. Son rôle semble être lié à la répression de la transcription. Notamment, des études *in vitro* montrent que sa présence interfère avec les facteurs de transcription et bloque l'ARN polymérase II (Angelov et al., 2003; Doyen et al., 2006). Très peu d'études ont analysé macroH2A dans les cellules

germinales. Cependant, il a été retrouvé enrichi sur le corps sexuel en pachytène (Hoyer-Fender, 2003). Ainsi son rôle serait probablement de maintenir une hétérochromatine sur cette vésicule durant la méiose.

H2A.Bbd (H2A-Bar body deficient) : Présent uniquement chez les mammifères, H2ABbd est plus petit que H2A et ne conserve que 48% d'homologie avec ce dernier. H2ABbd tire son nom de sa localisation. En effet, il est exclu du chromosome X inactif (Chadwick and Willard, 2001). Très peu d'études ont été menées sur ce variant dans le contexte de la spermatogenèse. Néanmoins, H2A.Bbd a été retrouvé exprimé dans les testicules de souris et dans les spermatozoïdes d'humains sans que l'on sache aujourd'hui quel est son rôle (Ishibashi et al., 2010).

tH2A (H2A testiculaire) : Originellement identifié chez le rat, tH2A est présent aussi chez la souris et l'humain (Rao et al., 1983; Trostle-Weige et al., 1982). Chez la souris, une étude récente a mis en évidence par immunofluorescence que tH2A est présent de façon ubiquitaire lors de la spermatogenèse dans les cellules souches, les cellules méiotiques et post-méiotiques mais pas dans les cellules de Sertoli (Hada et al., 2017). Également, ce variant d'histone peut être phosphorylé sur sa thréonine 127. Cette modification post-traductionnelle est retrouvée dans les spermatides rondes au stade III lorsque les protamines sont incorporées et que la chromatine se condense (Hada et al., 2017). Son rôle reste encore aujourd'hui à élucider.

H2A.L1 (H2A like1) et **H2A.L2** (H2A like2) : Identifiés chez la souris en 2007, ces deux variants sont incorporés à des stades tardifs de la spermatogenèse dans les spermatides rondes entre la vague d'acétylation des histones et l'apparition des protamines. H2AL1 et H2AL2 sont maintenus au sein de la chromatine dans les spermatides allongées et les spermatozoïdes matures. De ce fait, il a été proposé que ces variants soient importants lors de la fécondation. Parallèlement dans les spermatides allongées, ces deux variants ont été trouvés enrichis dans les zones d'hétérochromatine péricentromérique (Govin et al., 2007).

Les variants d'histone de la famille H2B :

La famille de H2B possède peu de variants identifiés, chez l'homme, on en dénombre 3 : TH2B, H2BFWT et H2BE (Figure 10). Les deux premiers ont la particularité d'être exprimés dans les cellules germinales.

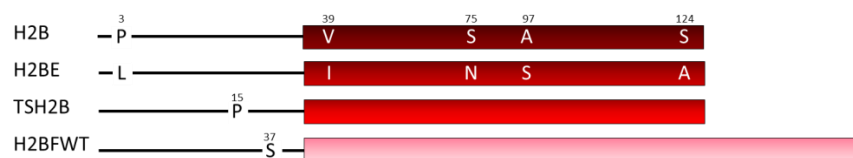


Figure 10 : Variants de l'histone H2B. Représentation schématique de la structure secondaire des variants d'histone de la famille des H2B connus chez l'homme. Le domaine structuré *histone fold* est représenté par un rectangle et la queue N-terminale est indiquée par un trait noir (Maze et al., 2014).

TH2B (H2B.1) : Il possède 85% d'homologie avec son histone canonique. Les principales variations se situent sur sa partie N-terminale où trois sites potentiels de phosphorylation sont insérés : une sérine en position 12, une thréonine en 23 et une thréonine en 34 (Zalensky et al., 2002). Sa présence a été détectée chez le rat, la souris et l'humain. Il est extrêmement conservé entre ces espèces. Absent dans les cellules souches germinales, l'expression de TH2B apparaît au stade leptotène et sa quantité reste élevée jusqu'en post-méiose (Montellier et al., 2013; Shinagawa et al., 2015). La quantité de TH2B augmente en même temps que celle de H2B diminue au cours de la spermatogenèse. TH2B devient alors la forme majoritaire dans les cellules germinales. L'ajout d'un tag sur sa partie C-terminale provoque une infertilité des souris mâles par de sévères anomalies dans les spermatides en élongations (Montellier et al., 2013).

H2BFWT : Peu conservé durant l'évolution, H2BFWT est apparu tardivement chez les grands singes et l'homme sans aucun orthologue connu chez la souris et le rat. Extrêmement divergent, H2BFWT ne possède que 45% d'identité avec H2B son histone canonique (Churikov et al., 2004). Son expression est retrouvée spécifiquement dans les testicules et les spermatozoïdes. De ce fait, il est probable que son rôle est de participer à l'organisation particulière que subit la chromatine dans le processus de spermatogenèse. En 2014, une étude

a présenté un lien entre une mutation de H2BFWT dans le premier exon et une susceptibilité augmentée pour les patients porteurs d'être infertiles (Li et al., 2014).

H2BE : Découvert récemment, H2BE présente 5 aminoacides de différence avec H2B. Il est localisé dans les neurones olfactifs chez la souris ce qui laisse présager d'un rôle spécifiquement dédié à ce type cellulaire (Santoro and Dulac, 2012).

Les variants d'histone de la famille H3 :

La famille des histones H3 est composée de 7 histones dont 3 sont des variants (Figure 11). Chaque histone possède un rôle spécifique que ce soit lors de sa transcription ou de son incorporation dans la chromatine. Par exemple, l'incorporation de H3.1 et H3.2 est dépendante de la réplication de l'ADN en phase S ou de la réparation suite à un dommage à l'ADN. À l'inverse, les variants CENP-A et H3.3 sont indépendants de la synthèse d'ADN. CENP-A est incorporé à la chromatine durant la télophase 1 du cycle cellulaire alors que H3.3 peut l'être à tout moment du cycle cellulaire (Frank et al., 2003a; Wu et al., 1982). La composition de ces 5 protéines présente des degrés de similitude très divergents allant de 96.3% d'identité entre H3.1 et H3.2 à 42.1% entre H3.1 et CENP-A (Figure°11).

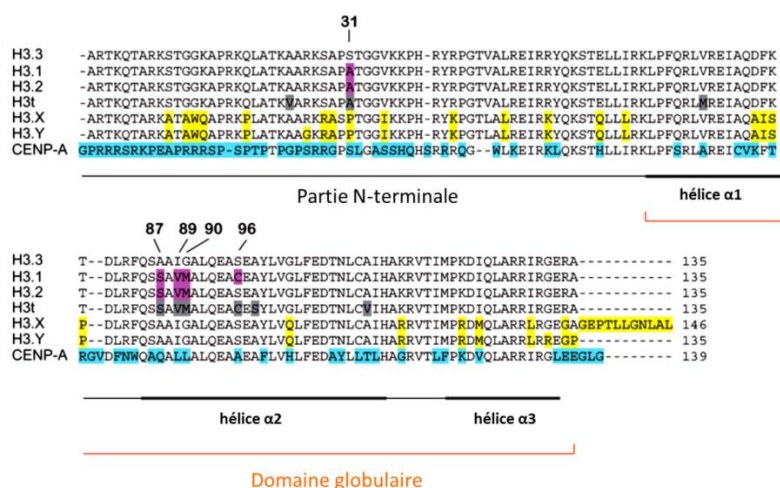


Figure 11 : Alignement de la séquence en aminoacides des histones de la famille H3 de mammifères. Les quatre histones ne sont pas identiques. L'encadrement coloré en jaune, bleu, gris et violet indique les aminoacides différents avec l'histone H3.1. CENP-A présente une séquence particulièrement éloignée des 6 autres histones de la famille H3. La position du domaine globulaire composé de trois hélices α est représentée par des barres noires (Szenker et al., 2011).

H3.1 et H3.2 : Les histones canoniques de la famille des H3 sont H3.1 et H3.2. Ces deux protéines de 15,4 kDa sont codées par 135 aminoacides. H3.2 diffère de H3.1 par un aminoacide, la cystéine en position 96, qui est remplacée par une sérine dans H3.2. Ces deux histones canoniques sont déposées dans la chromatine par le complexe CAF-1 (Chromatin Assembling Factor-1) durant la mitose. Contrairement aux variants H3.3 et CENP-A, codés par un ou deux gènes, les gènes de H3.1 et H3.2 sont organisés en cluster respectivement sur le chromosome 1 pour H3.1 (10 gènes HIST1H3A à HIST1H3J) et le chromosome 6 pour H3.2 (3 gènes HIST2H3A, HIST2H3C, HIST2H3D) chez l'humain (Marzluff et al., 2002). Ces deux histones canoniques représentent la forme majoritaire des histones H3. Il a été montré que H3.1 et H3.2 constituent 35 % des histones H3 dans les testicules contre 75.5% dans l'épididyme (Kwak and Dohmae, 2016).

CENP-A : CENP-A ou CENH3, pour CENtromeric Protein A est la première protéine du centromère à avoir été identifiée en 1985 (Earnshaw and Rothfield, 1985; Palmer et al., 1991). CENP-A est un acteur majoritaire de la constitution et du fonctionnement du centromère. Son domaine CATD (CENP-A Targeting Domain) lui permet d'être déposé sur le centromère (Ray-Gallet and Almouzni, 2010). Une surexpression de CENP-A mène à la création de nouvelles unités centromériques partielles contenant des protéines du kinétochore comme CENP-C sur les bras chromosomiques mais pas un kinétochore entier et fonctionnel (Van Hooser et al., 2001). *In vivo*, les nucléosomes contenant CENP-A sont disposés en alternance avec des blocs de nucléosomes contenant l'histone H3. Cette organisation particulière de la chromatine est supposée créer une chromatine cylindrique dont l'extérieur est composé de nucléosomes contenant CENP-A. Cette position est stratégique pour son rôle dans la formation du kinétochore et son interaction avec les microtubules (Sullivan et al., 2001). Une des protéines chaperonnes majeures déposant CENP-A dans la chromatine est HJURP (Holliday Junction Recognizing Protein) (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009). Son rôle ainsi que celui de HJURP dans la ségrégation des chromatides sœurs lors de la mitose a fait l'objet de nombreuses études. Il est intéressant de noter que les mutants nuls de CENP-A voient leurs cellules bloquées en interphase.

H3.1t (H3t) : H3t est fortement exprimé dans les testicules d'où son nom. Il représente 41% des histones H3 dans les testicules. En revanche, elle est indétectable dans l'épididyme par HPLC et faiblement détectée dans les cellules somatiques (Kwak and Dohmae, 2016). *In vitro*, Nap2 semble faciliter l'assemblage de H3t dans le nucléosome. Récemment, l'équipe de Yamagata a montré que H3t est exprimé tout au long de la spermatogenèse sauf dans les spermatogonies de type A. De plus, la perte de H3t chez la souris provoque une stérilité chez les mâles par un arrêt de la spermatogenèse lors des toutes premières phases de la méiose. (Ueda et al., 2017). Aujourd'hui, peu de données ont été publiées sur H3t. Son rôle exact dans les mécanismes cellulaires ainsi que ses partenaires restent à identifier.

H3.Y et H3.X ont été découverts récemment. Ils sont présents uniquement chez les primates. Ces variants ont la capacité de s'incorporer de manière aussi stable à la chromatine que H3. Leurs ARN messagers sont retrouvés dans plusieurs tissus sains comme les testicules et tumoraux (Ueda et al., 2017; Wiedemann et al., 2010). H3Y semble être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et la réponse au stress des cellules (Wiedemann et al., 2010). Il a la capacité d'être reconnu par l'une des chaperonnes de H3.3, HIRA mais pas par l'autre chaperonne ATRX/DAXX (Zink et al., 2017). Peu de données ont été rapportées à ce jour sur ces deux variants.

H3.5 est un tout nouveau variant de la famille des H3, découvert en 2011 et présent uniquement chez les hominidés. Il possède 96% d'homologie avec H3.3. L'ARNm de H3.5 est exprimé spécifiquement dans les tubules séminifères des testicules humains (Schenk et al., 2011). Bien qu'il soit majoritairement localisé autour des sites d'initiation de la transcription, on ne connaît pas son rôle spécifique dans le processus de spermatogenèse chez les primates (Urahama et al., 2016). Il faut noter qu'il se trouve dérégulé dans certaines infertilités (Shiraishi et al., 2018).

1.1.2 Le variant d'histone H3.3

Dans la partie précédente, les caractéristiques générales des histones de remplacement et les différents variants d'histones connus ont été abordés. Dans cette partie, la description du

variant d'histone H3.3 est présenté. J'ai volontairement mis l'accent sur H3.3 car il est au centre de ce manuscrit dans le cadre de la fertilité.

I.1.2.1 H3.3 : Une histone ancestrale

Le variant d'histone H3.3 est considéré comme une histone ancestrale. Dans l'évolution, il est apparu en premier, bien avant les deux histones canoniques H3.1 et H3.2 (Figure 12). Il a été envisagé que cet histone pouvait avoir un rôle universel de par ses origines et sa capacité à être produit et incorporé à la chromatine indépendamment du cycle cellulaire. Chez la levure, H3.3 est le seul histone H3, non centromérique, présent. Tous les histones H3 non centromériques dérivent de cette forme originelle de H3.3 ancestral. L'histone conventionnelle H3.2 est la première à dériver de la forme originelle de H3.3. Elle est retrouvée notamment chez les arthropodes comme la Drosophile. Les histones H3.1 et H3t sont apparues plus tardivement chez les mammifères tels que la souris. Les derniers histones à être apparues durant l'évolution à partir de H3.3 sont les histones H3.X et H3.Y chez les primates (Malik and Henikoff, 2003; Postberg et al., 2010).

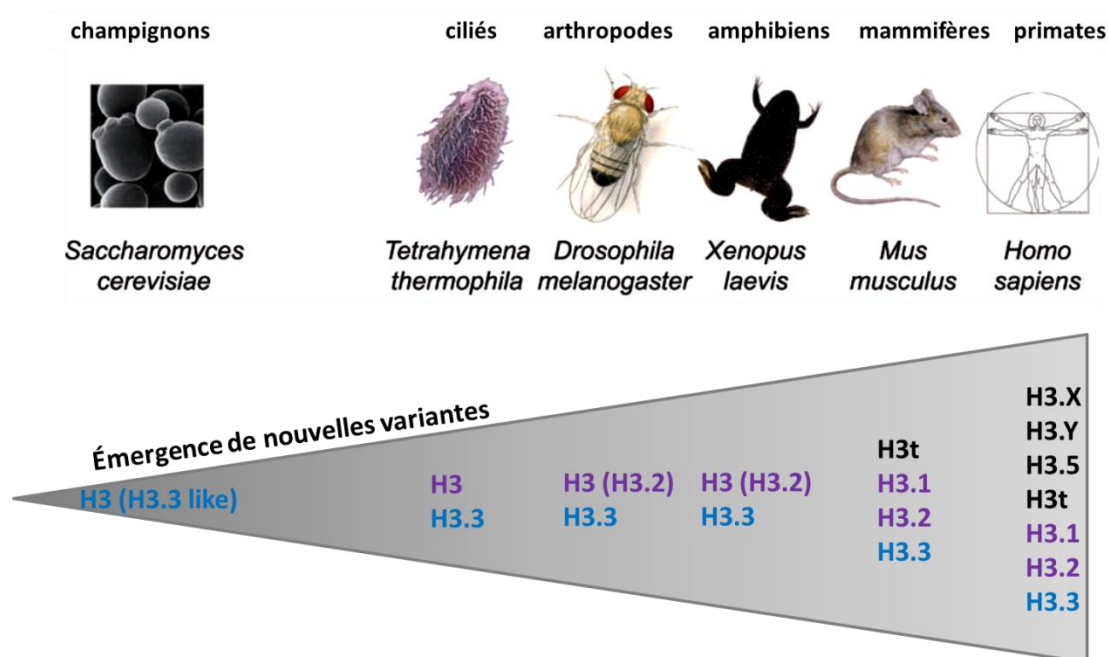


Figure 12 : Représentation schématique de l'émergence des différents variants d'histones non centromériques de la famille H3 durant l'évolution des espèces. Il a été proposé que tout les histones H3 non centromériques dérivent de la forme primitive de H3.3 en bleu. Les histones dits canoniques H3.1 et H3.2, en violet sont apparues plus tardivement ainsi que H3t, H3.X, H3.Y et H3.5 (Modifié de Szenker et al., 2011).

I.1.2.2 H3.3 les généralités

H3.3 est un variant d'histone ubiquitaire. Son expression dépend beaucoup du type cellulaire. La quantité de protéine H3.3 par rapport aux protéines de la famille de H3 peut varier de 20 à 50% dans les cellules en division (Hake et al., 2006). Dans les cellules germinales des testicules de souris, il représente 23% des histones de la famille des H3 non centromériques contre 41% pour H3t et 35% pour H3.1 et H3.2 (Kwak and Dohmae, 2016).

Contrairement à H3.1 ou H3.2, H3.3 est exprimé et incorporé pendant tout le cycle cellulaire (Frank et al., 2003b; Wu et al., 1982). En effet, la création de chimère H3.3 fusionnée avec la GFP a permis de mettre en évidence que H3.3 est incorporé à la fois pendant et en dehors de la phase S chez la *Drosophile* (Ahmad and Henikoff, 2002). Lorsque les cellules ne se divisent pas, par exemple dans les cellules quiescentes comme les neurones, H3.3 se trouve même être la forme majoritaire présente au point de pratiquement remplacer les histones canoniques non synthétisées (Bosch and Suau, 1995).

Extrêmement conservé durant l'évolution, H3.3 présente seulement 4 et 5 aminoacides de différence avec ses histones canoniques respectivement H3.2 et H3.1 (Figure 11 et 13) :

Dans la région N-terminale, seul un résidu est différent. L'alanine en position 31 sur les histones canoniques est modifiée en sérine sur H3.3. Ce résidu sérine est le siège d'une phosphorylation *in vivo* (Hake et al., 2005). Dans les cellules souches H3.3 S31P est notamment retrouvé enrichie sur les télomères (Wong et al., 2008). On ne connaît pas encore le rôle exact de cette modification mais on sait qu'elle se produit aussi sur des régions péricentromériques en prophase (Hake et al., 2005).

Les autres modifications se situent toutes dans l'hélice $\alpha 2$ du domaine *histone fold*. Les résidus S, V et M (position 87, 89 et 90) de H3.1 et H3.2 sont transformés en résidus A, I et G (positions 87, 89 et 90) dans H3.3. Ces modifications le rendent inaccessible aux facteurs diffusibles tels que les enzymes de modifications post-traductionnelles. De plus, ces résidus AIG sont responsables de l'incorporation de H3.3 dans la chromatine indépendamment de la réplication (Ahmad and Henikoff, 2002). Il a été montré par délétion de la partie N-terminale de H3.3 que cette partie n'était pas requise pour une incorporation indépendante de la réplication (Ahmad and Henikoff, 2002). Il semblerait donc que AIG soit

dévolue à la détermination du mode d'assemblage de H3.3 dans la chromatine. En 2012, des données cristallographiques ont mis en évidence que l'alanine 87 et la glycine 90 sont responsables de l'interaction entre H3.3 et ses chaperonnes nommées DAXX et HIRA (Liu et al., 2012).



Figure 13 : Représentation schématique des différences entre H3.3 et ses deux histones canoniques H3.1 et H3.2. On observe respectivement 4 à 5 aminoacides modifiés entre H3.3 et H3.2 et H3.1. Les aminoacides impliqués dans la reconnaissance par les chaperonnes sont notés en noir sur fond rouge. (A : alanine, S : sérine, V : valine, M : méthionine, I : isoleucine, G : glycine, C: cystéine.)

Ces modifications entre les histones canoniques et H3.3 ne changent vraisemblablement pas la structure générale du nucléosome (Jin and Felsenfeld, 2007). En revanche, l'octamère d'histone contenant H3.3 semble être moins stable que celui contenant H3. Face à une augmentation de la concentration en sels, le nucléosome contenant H3.3 est plus sensible que son homologue contenant H3 canonique. Cela se traduit par une perte plus précoce des dimères H2A-H2B lorsque H3.3 est présent (Jin and Felsenfeld, 2007).

I.1.2.3 Structure des gènes H3f3a et H3f3b

Contrairement à H3.1 et H3.2, le variant d'histone H3.3 n'est pas transcrit à partir d'un cluster de gènes mais a la particularité d'être transcrit à partir de deux gènes distincts : *H3f3a* et *H3f3b*. Les protéines issues de ces deux gènes *H3f3a* et *H3f3b* sont nommées respectivement H3.3A et H3.3B. Ces protéines de 135 acides aminés sont strictement identiques, on les retrouve d'ailleurs nommées sous le nom de H3.3 lorsque les auteurs de travaux scientifiques ne font pas la différence entre les isoformes A et B.

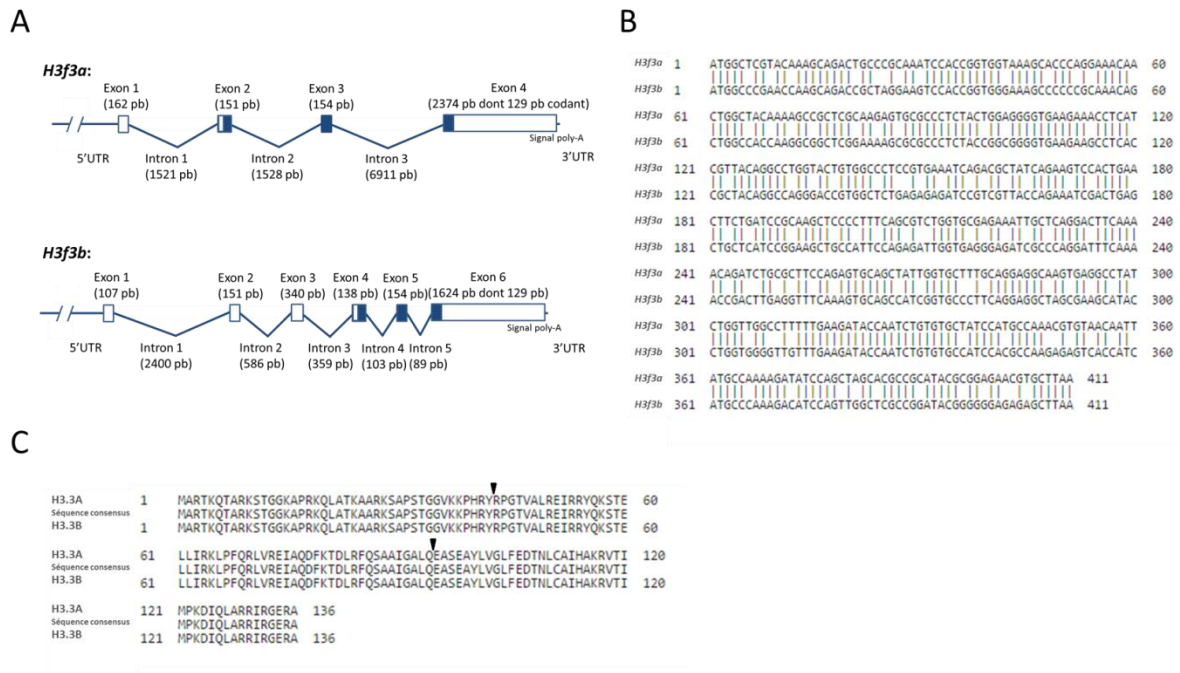


Figure 14 : Analyse des séquences génomiques et protéiques des gènes *H3f3a* et *H3f3b* de *Mus musculus* (séquences récupérées via Ensembl, analyse par NCBI blast). **(A)** Représentation schématique de la structure des gènes *H3f3a* et *H3f3b*. Les introns sont représentés par des traits fins, les exons par des rectangles. Les parties codantes sont indiquées par des rectangles pleins. **(B)** Sur l'alignement des séquences codantes des gènes *H3f3a* et *H3f3b*, on observe 77% d'homologie entre ces deux séquences. **(C)** Une composition protéique identique est observable sur l'alignement entre la protéine H3.3A et H3.3B (blast NCBI). Pour les deux protéines H3.3A et H3.3B, le passage des exons 1 à 2 et 3 à 4 est identique et représenté par un triangle noir.

Le premier gène, *H3f3a* est porté par le chromosome 1 chez la souris (1;1H4) et l'humain (1q42.12) alors que *H3f3b* est porté par le chromosome 11 chez la souris (11;11E2) et le chromosome 17 chez l'humain (17q25.1) (Source Ensembl et NCBI). De tailles différentes ces gènes sont composés de 4 exons dont trois codants pour *H3f3a* et 6 exons dont 3 codants pour *H3f3b* chez *Mus musculus* (Figure 14A). L'alternance des exons codants a été conservée entre ces deux isoformes chez la souris. En effet, elle s'effectue exactement au même endroit sur la séquence nucléotidique de *H3f3a* et *H3f3b*, après la tyrosine 42 et la glutamine 94 (Figure 14 C). La séquence codante de *H3f3a* présente une homologie de 77% avec celle de *H3f3b* (Figure 14 B). Les différences entre ces deux séquences nucléotidiques ne modifient pas leur séquence protéique finale qui sont strictement identiques dans toutes les espèces.

On retrouve dans la protéine H3.3, le domaine N-terminal, non structuré et le domaine *histone fold* structuré nécessaire pour la formation de l'octamère d'histones. Les protéines H3.3A et H3.3B sont identiques, il est par conséquent impossible de les différencier (Figure 14 C). De ce fait, la majorité des publications étudie l'expression de H3.3A et H3.3B comme un tout, sans faire de distinction. Pour les analyser séparément, certaines équipes analysent l'ARN messager ou alors insèrent un tag sur l'une ou l'autre des isoformes de H3.3.

I.1.2.4 Les chaperonnes de H3.3

Les histones sont incorporées à la chromatine par des complexes protéiques nommés des chaperonnes. Dans le cas des histones H3.1, H3.2 et H3.3, on sait que le site de reconnaissance se situe sur les positions 87, 89 et 90. Il existe une chaperonne spécifique pour les histones canoniques H3.1 et H3.2 qui est CAF-1. H3.3 dispose de deux chaperonnes spécifiques pour être incorporé à la chromatine nommées DAXX/ATRX et HIRA (Zhang et al., 2016). Elles ont la particularité de déposer H3.3 soit dans l'hétérochromatine via DAXX/ATRX soit dans l'euchromatine via HIRA (Figure 15).

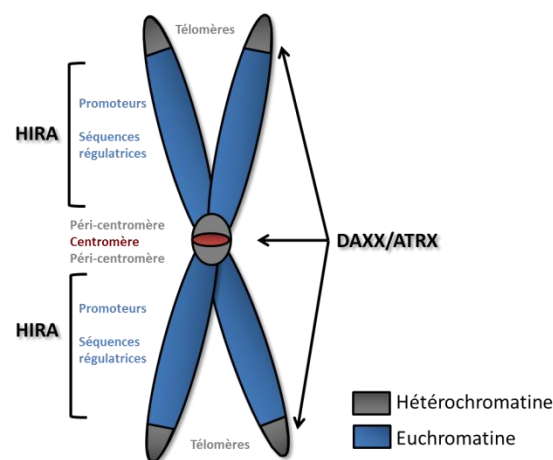


Figure 15 : Image d'un chromosome où sont représentées les régions particulières de l'incorporation de H3.3 en fonction de sa chaperonne. H3.3 est incorporé au niveau des régions d'hétérochromatine par le complexe DAXX/ATRX (zone en gris) et dans l'euchromatine par HIRA (en gris). Le centromère est représenté en rouge.

DAXX/ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation X-linked) :

Le complexe d'incorporation de H3.3, composé de la chaperonne DAXX et du facteur de remodelage ATRX de la famille SWI/SNF, est responsable de la déposition de H3.3 dans les zones de séquences répétées du génome (Drane et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Wong

et al., 2010a) via son site AIG (Figure 13 et 16). ATRX a été identifiée au départ sur des patients présentant une mutation sur des gènes liés au chromosome X provoquant chez ces patients un retard mental, une alpha-thalassémie ainsi que de multiples malformations (Picketts et al., 1996).

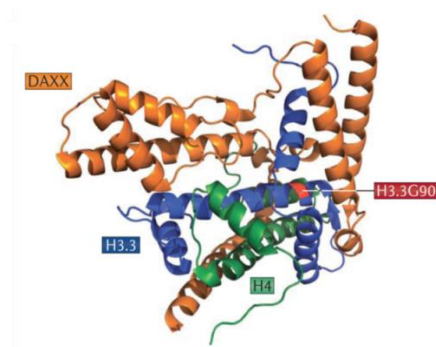


Figure 16 : Structure cristallographique de H3.3 et DAXX. Représentation de la structure cristallographique du domaine de liaison de H3.3 avec son histone de déposition DAXX. En vert, on peut voir la localisation de H4 qui forme un dimère avec H3.3 en bleu. La glycine en position 90 (en rouge) permet la reconnaissance et la prise en charge par DAXX (en orange) du dimère H3.3-H4 (d'après Elsässer et al., 2012).

L'association de H3.3 avec l'hétérochromatine a été pour la première fois rapportée sur les télomères dans des cellules souches de souris en 2009 (Wong et al., 2010b). Cette découverte a été suivie de près par l'identification des deux facteurs ATRX et DAXX qui se localisent sur les télomères au niveau des structures secondaires G quadruplex (Law et al., 2010; Levy et al., 2015). Ces deux complexes ont été jugés essentiels pour le dépôt du variant d'histone H3.3 sur l'hétérochromatine télomérique et péricentromérique (Drane et al., 2010; Goldberg et al., 2010; Wong et al., 2010a). Néanmoins, la signification fonctionnelle de cette voie de dépôt ainsi que la présence de H3.3 dans ces régions particulières reste inconnue aujourd'hui.

Ce dépôt est réalisé aussi dans des zones d'hétérochromatines constituées de séquences répétées réparties dans tout le génome comme les rétrotransposons ou les îlots CpG hyperméthylés de l'ADN (Elsässer et al., 2015; He et al., 2015; Sadic et al., 2015; Voon et al., 2015). Ces données coïncident avec le fait que DAXX, ATRX et H3.3 sont enrichis sur des

sites principalement retrouvés dans les zones d'hétérochromatines présentant H3K9me3, H4K20me3, HP1 et la méthylation de l'ADN. Sur les éléments transposables comme ERV (Rétrovirus endogène), ATRX/DAXX et H3.3 ont été retrouvés enrichis ainsi que KAP1/SETDB1, une lysine transférase qui catalyse H3K9me3. Il a été démontré que ATRX reconnaît la méthylation de H3K9me3 via son domaine ADD (ATRX-Dnmt3-Dnmt3L) (Dhayalan et al., 2011; Eustermann et al., 2011; Iwase et al., 2011) et que DAXX interagit directement avec KAP1 (Elsässer et al., 2015). La perte de l'un de ces deux acteurs ATRX ou DAXX provoque une chute de H3K9me3 et de H3.3 dans ces régions (Udugama et al., 2015a; Voon et al., 2015). Désormais, l'hypothèse mise en avant propose que H3.3, DAXX, ATRX et H3K9me3 sont intimement liés dans le maintien d'une hétérochromatine silencieuse sur les séquences répétées.

H3.3 semble pouvoir subir des modifications post-traductionnelles sur les zones d'hétérochromatine mais via des mécanismes différents. Sur les rétrotransposons, il a été proposé que KAP1/SETDB1 puisse catalyser une modification post-traductionnelle de H3.3 : H3.3K9me3. À l'inverse, sur les télomères et les régions péricentromériques, H3.3K9me3 serait catalysée par SUV39H1 (Suppressor of variegation 3-9 homolog 1) (Benetti et al., 2007; Leung et al., 2014). En effet, la perte de SUV39H1 induit une perte de la modification H3.3K9me3 spécifique sur les télomères (Peters et al., 2001; Udugama et al., 2015b).

Il n'en reste pas moins que la mise sous silence transcriptionnel de toutes ces régions d'hétérochromatine est un élément clé pour la stabilité génomique. En effet, la mutation de ATRX ou son absence est directement corrélée avec une altération des télomères dans de nombreux cancers comme les tumeurs pancréatiques neuroendocrines (Heaphy et al., 2011). Dans les souris dépourvues de ATRX ou de H3.3, on note une augmentation de l'expression de rétrotransposons tel que IAP (Intercisternal A particle) (Elsässer et al., 2015; Sadic et al., 2015). La levée du silence transcriptionnel sur les séquences répétées comme les rétrotransposons provoque une instabilité génomique. De nombreuses hypothèses suggèrent que H3.3 serait un acteur décisif dans le maintien d'une hétérochromatine silencieuse et par là même de la stabilité et de l'intégrité du génome.

HIRA (Histone Regulator A) :

Le premier complexe de déposition de H3.3 découvert a été le complexe HIRA du nom de sa protéine centrale HIRA (Tagami et al., 2004). H3.3 est co-purifié avec ce complexe que ce soit chez la levure ou l'humain, ce qui suggère une conservation de cette voie d'assemblage durant l'évolution (Elsaesser and Allis, 2010; Tagami et al., 2004). Ce complexe est composé de la protéine HIRA, de l'ubinucléin-1 (UBN1), de CABIN1 (Calcineurin binding protein 1) et de ASF1a (Anti-Silencing Function 1A) (Figure 17). Toutes ces protéines se lient à la protéine HIRA respectivement sur son domaine N-terminale pour UBN1, sur son domaine B central pour ASF1a et sur son domaine C-terminal pour CABIN1. ASF1a coopère avec ce complexe mais sa présence n'est pas strictement nécessaire à son fonctionnement. En revanche, il a été montré récemment par cristallographie que UBN1 est le premier responsable de l'interaction entre le complexe HIRA et le motif AIG de H3.3 (Figure 17) (Daniel Ricketts et al., 2015).

À l'inverse de DAXX/ATRX, le complexe HIRA dépose H3.3 sur des domaines chromatinien riches en gènes transcriptionnellement actifs où se situe l'ARN polymérase II. La quantité de H3.3 est positivement corrélée avec l'expression de ces gènes (Mito et al., 2005; Schwartz, 2005). Plus précisément, H3.3 est déposé par HIRA sur les régions régulatrices, les promoteurs et les séquences intergéniques sans que l'on sache encore aujourd'hui quel est son rôle exact. Dans les cellules souches dépourvues en HIRA, les enrichissements en H3.3 sur le promoteur et le corps des gènes actifs sont affectés. Cela suggère que HIRA participe à la déposition de H3.3 sur ces sites spécifiques (Ray-Gallet et al., 2011). H3.3 peut dans ces zones actives en transcription être associé à d'autres variants d'histones. Ainsi la présence de nucléosomes double variants H3.3/H2A.Z est un marqueur des zones particulièrement pauvres en nucléosomes comme les promoteurs actifs ou les régions régulatrices chez l'humain (Jin et al., 2009).

Il est important de noter que HIRA et H3.3 sont en lien direct avec les mécanismes de signalisation cellulaire. En effet, le dépôt de H3.3 par HIRA dans la chromatine est régulé par une sérine/thréonine kinase PAK2 qui phosphoryle H4 sur la sérine 47 (H4S47ph) et favorise ainsi le dépôt de H3.3. Dans le même temps, la phosphorylation de H4 est capable de réduire

l'association entre CAF1 et H3.1. Cela favorise ainsi l'incorporation de H3.3 dans le dimère avec H4S47ph dans les cellules humaines au détriment de H3.1 (Kang et al., 2011). Une autre modification post-traductionnelle comme H3K4me2 est présente lorsque H3.3 est fortement incorporé. Cette dernière modification est le signe d'une euchromatine où les gènes sont actifs chez *D.melanogaster* (Mito et al., 2005).

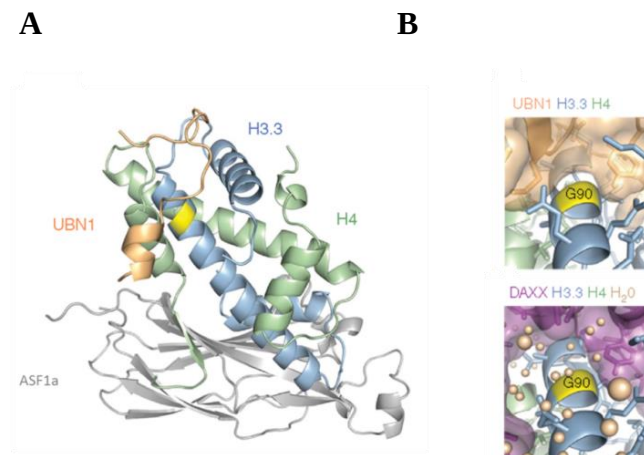


Figure 17 : Structure cristallographique de l'association du dimère H4-H3.3 avec ses complexes de remodelage. (A) Représentation de la structure cristallographique de H4 (en vert) et H3.3(en bleu) avec UBN1 (en orange) et ASF1a (en gris) composant le complexe de remodelage HIRA. (B) Comparaison des structures cristallographiques du dimère H4-H3.3 complexé avec ses deux chaperonnes en orange UBN1 (complexe HIRA) et DAXX en violet (complexe DAXX/ATRX). La glycine G90 est indiquée en jaune. On observe que la structure au niveau de la liaison entre UBN1 ou DAXX avec le dimère H4-H3.3 est similaire malgré une composition protéique et une structure générale très différente entre ces deux chaperonnes (d'après Daniel Ricketts et al., 2015).

De nombreuses études ont montré récemment que HIRA n'agit probablement pas seule pour déposer H3.3 au sein de la chromatine. Notamment, dans les cellules souches de souris, HIRA, H3.3 et le complexe répressif polycomb2 (PRC2) interagissent pour maintenir une chromatine spécifique sur les gènes nécessaires à la différenciation. Dans un autre contexte du développement, au niveau de l'embryogenèse précoce, HIRA dépose H3.3 sur le génome paternel lors de sa décompaction chez la Drosophile et la souris. À cette étape les protamines initialement placées sur le génome paternel lors de la spermiogenèse sont remplacées par les histones dans l'embryon précoce. Le complexe de remodelage CHD1 de la famille des SWI/SNF intervient avec HIRA pour l'incorporation de H3.3 sur le génome paternel dans l'embryon de bovin (Zhang et al., 2016).

Le variant d'histone H3.3 et la machinerie de réparation de l'ADN :

Il est à noter également que H3.3 intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires essentielles comme la réparation. Notamment, lors de dommages à l'ADN liés aux rayonnements UV, H3.3 est incorporé très rapidement par HIRA sur les sites lésés. Son rôle serait de protéger ces sites et d'assurer le maintien de la progression de la boucle de réplication après dommage (Frey et al., 2014). H3.3 peut aussi être recruté dans le redémarrage de la transcription suite aux dommages à l'ADN. En effet, l'absence de H3.3 provoque une altération de la synthèse d'ARN après illumination aux UV (Adam et al., 2013). Dans ce contexte, lorsqu'il y a cassure de l'ADN plusieurs marques d'hétérochromatine apparaissent comme H3.3 sur les sites de cassures. On retrouve notamment γ H2AX.

Ainsi H3.3 est un acteur de la machinerie de réparation mais on ne connaît pas encore son rôle exact. Il est intéressant de noter que de plus en plus d'études mettent en évidence une implication de H3.3 également dans la tumorigénèse.

I.1.2.5 Le potentiel oncogénique de H3.3

Le variant d'histone H3.3 est associé à de nombreux cancers comme le glioblastome à haut grade (cancer du cerveau) de l'enfant et du jeune adulte, les chondroblastomes et les tumeurs de l'os à grandes cellules. Le glioblastome pédiatrique à haut grade représente entre 8 et 12% des cancers du cerveau mais il est malheureusement dévastateur puisque 70 à 90% des patients sont décédés 2 ans à peine après le diagnostic (Wu et al., 2014). On ne possède pas encore de traitement efficace qui puisse contrecarrer ces cancers (Kallappagoudar et al., 2015). Le séquençage de ces tumeurs a révélé la présence de mutations dans H3.3 chez un grand nombre de patients. Par exemple, dans le cas de cancer du cerveau, nommé gliome du tronc cérébral, H3.3 est retrouvé muté chez 78% des patients. Ces mutations peuvent être une modification du type K27M, G34R, G34V G34W G34L et K36M.

Bien que H3.3A et H3.3B possèdent une séquence en acide aminée identique certaines mutations sont retrouvées uniquement sur l'une ou l'autre de ces isoformes dans un tissu tumoral donné. Par exemple, la mutation K36M sur H3.3 n'est portée que par la forme H3.3B dans les chondroblastomes alors que les autres modifications sont uniquement portées par

H3.3A (Behjati et al., 2013). Notons par exemple que les mutations G34R ou G34V sont portées par H3.3A uniquement dans les glioblastomes pédiatriques multiformes localisés dans les hémisphères du cerveau, alors que la mutation K27M est retrouvée dans le gliome du tronc cérébral au carrefour entre le cerveau, le cervelet et la moelle épinière (Aihara et al., 2014; Bjerke et al., 2013; Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2014) (Figure 18 A et B). De façon surprenante, H3.3A G34 peut subir d'autres mutations différentes G34W et G34L mais cette fois-ci dans les tumeurs de l'os à cellules géantes (Behjati et al., 2013). Dans les cancers de l'os, la mutation K36M est presque systématique puisqu'on la retrouve dans le tissu cancéreux de 95% des patients atteints de chondroblastome (Behjati et al., 2013; Kallappagoudar et al., 2015; Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2014). On remarque également une distribution de la classe d'âge des patients corrélée aux mutations. En effet, les patients porteurs d'une mutation K27M sont extrêmement jeunes, essentiellement avant leur 15 ans alors que les mutations de type G34 sont plus tardives depuis l'adolescence jusqu'au jeune adulte (Figure 18 C).

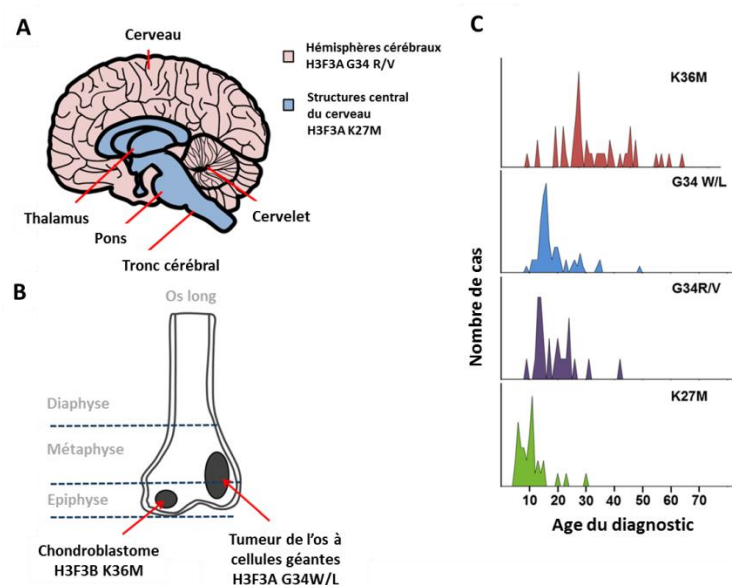


Figure 18 : Mutations de H3.3 dans différents tissus cancéreux associées à l'âge des patients lors de leur diagnostic. (A) Représentation des différentes aires du cerveau où sont localisées les tumeurs associées à la mutation *H3f3a* G34R/V (en rose) et *H3f3a* K27M (en bleu). (B) Dessin illustré d'un os long composé de ces trois parties : la diaphyse, la métaphyse et l'épiphyse avec les tumeurs associées à la mutation *H3f3b* K36M pour les chondroblastomes et *H3f3a* G34W/L pour les tumeurs de l'os à grandes cellules. (C) graphique représentant l'âge à laquelle les patients ont été diagnostiqués. On observe un resserrement de l'âges dans les mutations K27M, G34R/V et G354W/L (Modifié de Kallappagoudar et al., 2015).

Ainsi, il est de plus en plus admis que les mutations de H3.3 possèdent un pouvoir oncogénique. En revanche, il reste aujourd'hui à comprendre comment la cascade des mutations se déroule et quels sont les nouveaux mécanismes mis en place par les mutations de H3.3. La réponse à ces questions permettrait d'apporter de nouvelles connaissances afin de trouver un traitement adapté pour ralentir la progression tumorale ou mieux l'éliminer.

I.1.2.6 Importance de H3.3 dans la fertilité

Le variant d'histone H3.3 est impliqué dans la reproduction. Quelques travaux dont la grande majorité ont été publiés pendant la préparation de ma thèse, montrent que l'absence ou l'altération de l'un ou l'autre de ces deux gènes provoque des défauts de fertilité mâle chez la souris (Bush et al., 2013; Couldrey et al., 1999; Tang et al., 2013; Yuen et al., 2014).

De manière surprenante, les phénomènes observés divergent entre les différentes publications. Notamment, il a été décrit l'apparition d'une sub-fertilité chez les mâles exempts de H3.3A avec apparition de spermatozoïdes anormaux (Couldrey et al., 1999; Tang et al., 2015). À l'inverse en 2015, une étude montre que l'absence de H3.3A n'a aucun impact sur la fertilité (Jang et al., 2015). Dans le cas du gène *H3f3b*, les publications divergent également. Le groupe de Mann en 2015 relate une stérilité des mâles hétérozygotes H3.3B^{WT/KO} par une disparition des spermatides rondes, alors que l'équipe de Knoepfler montre que des mâles hétérozygotes H3.3B^{WT/KO} sont fertiles (Tang et al., 2015; Yuen et al., 2014). Dans cette dernière publication, seuls les mâles homozygotes H3.3B^{KO/KO} présentent une stérilité. Le modèle proposé par l'équipe de Knoepfler stipule que l'absence d'une quantité suffisante de H3.3 induirait une diminution de l'expression des gènes nécessaires à la spermiogenèse associée à une éviction non complète des histones en spermiogenèse. La raison des différences observées entre ces études n'est pas comprise aujourd'hui. Néanmoins, on peut remarquer que ces études ont été menées sur des souris transgéniques avec des fonds génétiques et des constructions génomiques parfois différentes. Cela pourrait être expliquer tant de divergence entre ces résultats.

L'impact de H3.3 sur la fertilité est relativement conservé entre espèces puisque qu'il a aussi été décrit chez la Drosophile. On relève notamment que l'absence de H3.3 est directement corrélée avec l'apparition de mâles stériles dans cette espèce. À cette occasion, il a été montré que la fertilité des mâles ne peut pas être restaurée par la surexpression de

l'histone canonique H3. La stérilité n'est donc pas le résultat d'une quantité insuffisante d'histones de la famille des H3 mais bien à une absence du variant H3.3 (Hödl and Basler, 2009; Sakai et al., 2009).

Chez les souris mâles, l'expression des deux gènes *H3f3a* et *H3f3b* est détectée lors de la spermatogenèse (Bramlage et al., 1997; Yuen et al., 2014). Notamment, H3.3 semble s'accumuler dans le corps sexuel des cellules en prophase I de la méiose (van der Heijden et al., 2007). En fin de spermatogenèse, lors de la formation du spermatozoïde, il est intéressant de noter que la totalité des histones n'est pas totalement échangée avec les protamines. On estime qu'il reste environ 1% d'histones résiduelles sur la chromatine spermique. Ces nucléosomes résiduels sont largement composés de H3.3 chez la souris. Cette fraction de H3.3 est localisée dans des régions génomiques importantes pour le développement du zygote (Erkek et al., 2013; Kong et al., 2018). Notamment, H3.3 est enrichi sur les îlots CpG non méthylés. Les îlots CpG sont fréquemment associés à des promoteurs de gènes actifs. Cet enrichissement est conservé dans l'évolution car on le retrouve chez la souris comme chez l'humain (Hammoud et al., 2009). Par conséquent, il a été suggéré que la présence d'histones et notamment de H3.3, sur les îlots CpG non méthylés dans le spermatozoïde, constitue une marque épigénétique forte qui participe à la transmission d'une mémoire épigénétique transgénérationnelle du génome paternel. Dans le zygote, les variants histones H3.3 paternels sont progressivement remplacés par les variant d'histones H3.3 maternels (Kong et al., 2018). Il est aujourd'hui indéniable que H3.3 est un acteur essentiel dans la reproduction et particulièrement dans la spermatogenèse. Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce phénomène restent encore aujourd'hui largement méconnus.

I.2 L'ORIGINE DE LA VIE, VUE À TRAVERS LA SPERMATOGENÈSE

I.2.1 Le déroulement de la spermatogenèse

I.2.1.1 Rappel sur l'appareil génital masculin

Le testicule et l'épididyme :

Chez les mammifères, l'appareil génital mâle est dédié à la production des gamètes mâles ou spermatozoïdes. Chez un humain, environ 10^3 spermatozoïdes sont produits par seconde cela représente 45 millions de spermatozoïdes produits en 24 h pour un seul testicule (Johnson, 1994). Les testicules ont une seconde fonction qui est la synthèse des hormones stéroïdiennes (les androgènes majoritairement la testostérone). Ces hormones outre le fait qu'elles soient essentielles à la production de spermatozoïdes, déterminent les caractères secondaires mâles de l'individu (Figure 19).

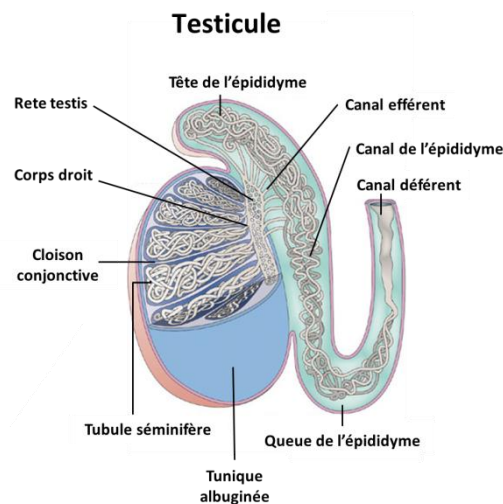


Figure 19 : Testicule de souris et sa structure interne. Schéma représentant une coupe de testicule. Les spermatozoïdes sont formés dans les tubules séminifères logés dans les nodules testiculaires séparés par de fines cloisons conjonctives. Chaque tubule séminifère débouche sur un élément droit reliant à la rete testiculaire. Les canaux excréteurs extra-testiculaire continuent par les canaux efférents qui se déversent dans le canal de l'épididyme puis dans le canal efférent (Modifier de Arnheim and Calabrese, 2009).

De forme ovoïde, les testicules sont délimités par une membrane de tissu conjonctif épais nommée la tunique albuginée. Sur son pôle supérieur, on peut observer un épaississement qui est le siège du regroupement des tubules séminifères dans la rete testiculaire chez la souris comme chez l'homme. Les tubules séminifères, lieu où se déroule la spermatogenèse, sont regroupés entre l'albuginé et la rete testiculaire dans un lobule. À l'intérieur de chaque lobule, se logent 2 à 3 tubules séminifères enroulés. Chaque testicule contient entre 200 et 300 lobules séparés par de fines cloisons conjonctives.

Chaque tubule séminifère converge vers la rete testiculaire par un tube droit qui sera ensuite dirigé vers les canaux efférents qui se regroupent pour former le canal de l'épididyme puis le canal déférent (Figure 19). Plusieurs glandes reproductives accessoires débouchent dans le canal déférent dont la vésicule séminale et la prostate, qui produisent le liquide séminal, qui mélangé avec les spermatozoïdes correspondent au sperme. Une fois mélangé, les spermatozoïdes sont momentanément regroupés en attendant d'être expulsés via l'urètre.

Les tubules séminifères :

En coupe histologique, les tubules séminifères sont des structures rondes ou tubulaires aisément identifiables car riches en cellules de la lignée germinale et bien délimités par une lame basale constituée de cellules myéloïdes. Sur le pourtour interne de cette gaine tubulaire se situent le noyau des cellules de Sertoli et des cellules souches germinales (Figure 20). De la lame basale au centre du tubule séminifère, on observe toutes les étapes de la différenciation spermatogénique du stade le plus précoce au stade le plus différencié, le spermatozoïde. Au centre où se trouve la lumière du tube, les spermatozoïdes vont être libérés des cellules de Sertoli. Les spermatozoïdes suivront ensuite les canaux intra et extra testiculaires. À ce stade, ils ne sont pas encore matures. Une première maturation a lieu dans l'épididyme et ce n'est que dans le tractus féminin que le spermatozoïde termine sa maturation pour devenir fécondant. L'association des cellules de la lignée germinale avec les cellules somatiques de Sertoli constitue l'épithélium séminifère (Hasegawa and Saga, 2012; Johnston et al., 2008; Timmons et al., 2002; Yoshida, 2006; Johnston et al., 2011).

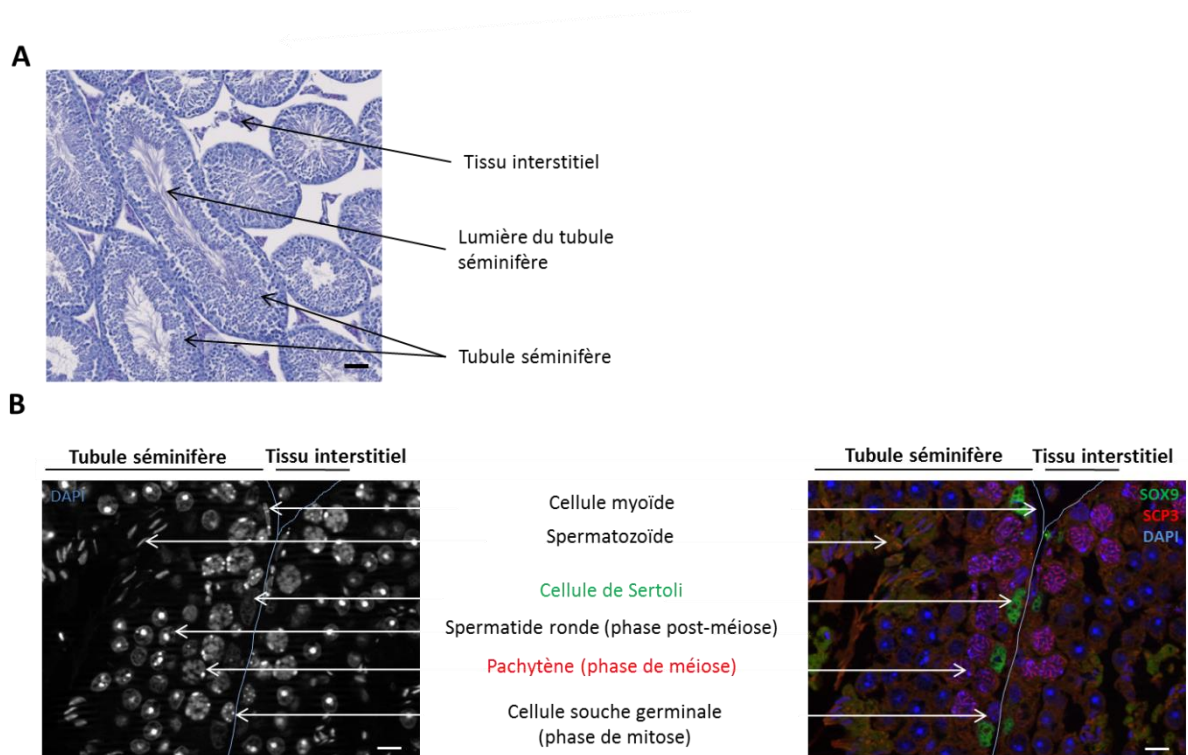


Figure 20 : Coupe histologique transversale d'un testicule de souris adulte et plus précisément d'un tubule séminifère. (A) Coloration à l'hématoxyline-éosine d'une coupe de testicule de souris de 10 μm d'épaisseur (échelle : 100 μm). (B) Agrandissement d'un tubule séminifère où l'on retrouve les cellules de Sertoli marquées par l'anticorps SOX9 (en vert), les cellules en méiose (pachytènes) marquées par l'anticorps SCP3 (en rouge) et les cellules souches germinales non marquées et positionnées sur la face interne de la lame basale entre les cellules de Sertoli et les pachytènes. Les cellules en post-méiose sont marquées par le DAPI et aisément reconnaissables par leur morphologie. Les cellules rondes sont petites et possèdent au centre de leur noyau une zone d'hétérochromatine bien ronde et centrale. Les spermatozoïdes présentent une chromatine marquée au DAPI en forme d'aiguille dans la lumière du tubule séminifère. Le tubule séminifère est maintenu par les cellules myoïdes de forme allongées situées sur la face externe du tube (échelle 10 μm).

Entre chaque tubule séminifère se trouve du tissu conjonctif. Particulièrement vascularisé, ce tissu apporte tous les nutriments nécessaires aux cellules dédiées à la spermatogenèse. Le tissu conjonctif est composé également d'îlots de cellules endocrines nommées cellules de Leydig. Le rôle principal des cellules de Leydig est de sécréter de la testostérone nécessaire au bon fonctionnement de l'ensemble des organes reproducteurs, de la spermatogenèse et des caractères secondaires mâles (musculature, changement de voix à la puberté, pilosité...). La production de testostérone est sous le contrôle d'une boucle de rétro-action via l'adénohypophyse et l'hypothalamus.

I.2.1.2 Les étapes de la spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus dédié à la formation des gamètes mâles, les spermatozoïdes. De ce fait, il est à la base de la survie de l'espèce de par la transmission héréditaire du patrimoine génétique mâle mais plus largement aussi du processus fondamental de l'évolution des espèces à travers la réorganisation génétique entre chromosomes à cette étape. Ce phénomène est finement régulé et suit un programme cyclique bien défini que nous allons aborder dans cette partie de manière générale puis étape par étape.

La spermatogenèse, un processus cyclique :

La spermatogenèse se déroule au sein des tubules séminifères dans les testicules. Ce processus de formation des spermatozoïdes est un processus de différenciation cellulaire de la cellule souche germinale vers un état de différenciation ultime, le spermatozoïde. Elle peut se subdiviser en quatre étapes :

Dans une première étape dite « mitotique », les cellules souches germinales nommées spermatogonies s'auto-renouvellent par division mitotique afin de maintenir des foyers souches à partir desquels de nouvelles vagues de spermatogenèse pourront démarrer. Les spermatogonies en auto-renouveauement sont de type A. Sur coupe transversale de tubule séminifère, on peut observer les spermatogonies intermédiaires et de type B en début de différenciation (Figure 21).

Dans une seconde étape nommée « méiotique », les cellules souches de type B continuent leur différenciation et subissent deux méioses successives qui donneront naissance aux spermatides rondes. Une des étapes clé de la méiose est la réplication de tout le patrimoine génétique puis la formation d'enjambement des chromosomes pour réaliser le brassage génétique. *In fine*, une cellule souche (diploïdes, 2N) engendre une cellule méiotique (tétraploïde, 4N) qui après divisions méiotiques donne naissance à quatre spermatides rondes (haploïdes, 1N) (Figure 21). En histologie, on observe les différentes étapes de la méiose du spermatocyte préleptotène, leptotène, zygotène, début de pachytène, pachytène, diacinèse, spermatocyte secondaire.

Dans une troisième étape dite « post-méiotique », chaque spermatide ronde haploïde se transforme en spermatozoïde, c'est la spermiogenèse. Dans cette dernière étape un important remodelage de la chromatine est nécessaire pour ultra-compacter le génome masculin dans le spermatozoïde en vue de son périple vers l'ovule. Chez la souris, il existe une multitude d'étapes entre la spermatide ronde et le spermatozoïde. Une classification a été mise en place et divise la spermiogenèse en 16 sous étapes chez la souris (Hess and Renato de Franca, 2008).

L'étape finale est la libération du spermatozoïde par la cellule de Sertoli dans la lumière du tubule séminifère. Cette étape est nommée la spermiation. Le cytoplasme résiduel du spermatozoïde est récupéré par la cellule de Sertoli pendant que le spermatozoïde est emmené dans le tube par les sécrétions.

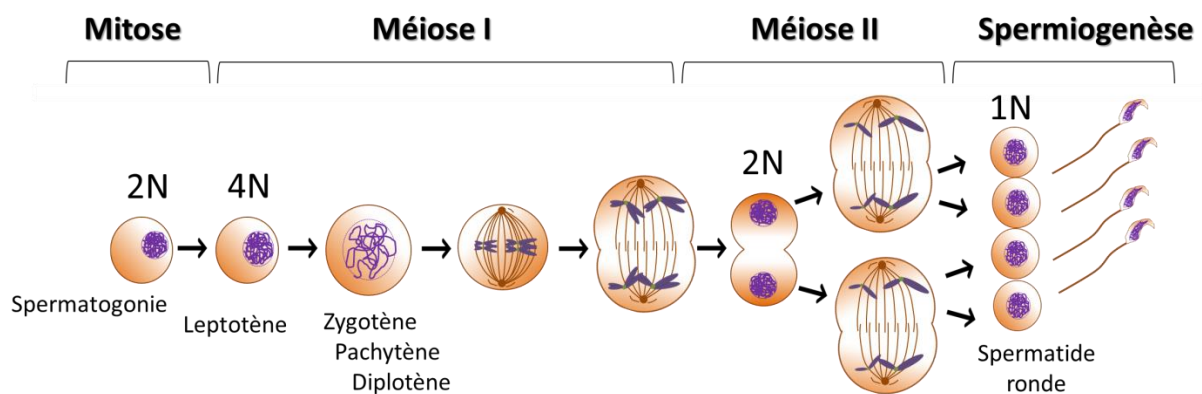


Figure 21: Représentation des différentes étapes de la spermatogenèse. Les grandes étapes de la spermatogenèse sont la mitose des cellules souches germinales nommées spermatogonies (2N). Leur différenciation aboutit à la réplication du génome complet (4N) en leptotène. Une première division méiotique est réalisée (méiose I) divisant ainsi le patrimoine génétique de moitié (2N) suivi immédiatement par la seconde division méiotique (Méiose II). Cette dernière division donne naissance à des spermatides rondes haploïdes (1N) qui elles même après la spermiogenèse formeront les spermatozoïdes.

Chez la souris, un processus complet de spermatogenèse requière 35 jours de la spermatogonie de type A à la spermiation (Clermont, 1972). Ce processus, extrêmement long, doit néanmoins assurer une production constante de gamètes mâles. Pour réaliser cela, la spermatogenèse est hautement synchronisée avec un départ de différenciation tous les 8,6 jours (Clermont, 1972). Chaque spermatogonie donnera naissance à des spermatogonies intermédiaires qui à leur tour deviendront des spermatogonies de type B et entreront en

méiose. Chaque division de spermatogonie constitue une nouvelle vague de différenciation qui s'additionne à la précédente (Figure 22). Les différentes vagues de la plus ancienne à la plus récente se retrouvent côte à côte le long du tubule séminifère (Figure 23).

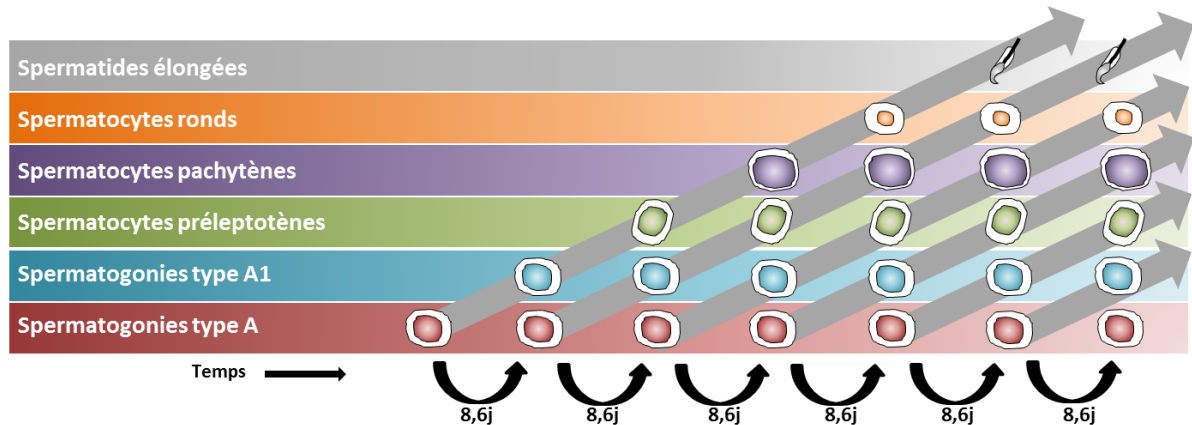


Figure 22 : Génération de vagues de différenciation de l'épithélium séminifère. La première vague de différenciation commence par la division des spermatogonies. Une part de ces cellules souches entre en différenciation et devient une cellule en préleptotène et l'autre partie reste pour constituer des futures vagues de différenciation. Cette première vague suit son cours. Les cellules en préleptotènes deviennent des spermatocytes pachytènes pendant que les spermatogonies se divisent une seconde fois pour donner naissance à la deuxième vague de différenciation 8,6 jours après. La première vague en stade pachytène poursuit en spermatide ronde pendant que la seconde vague en stade préleptotène passe au stade pachytène à son tour et que la troisième vague apparaît. Le processus est continu et rythmé par les spermatogonies (Modifié de Griswold, 2016).

Cette vague de différenciation n'est pas unidirectionnelle mais bidirectionnelle. En effet, lorsque le tubule séminifère est coupé de façon transversale, plusieurs couches cellulaires se distinguent et correspondent à chaque vague de différenciation. Dans la première couche, proche de la lame basale se trouvent les cellules précoces de type spermatogonies ou pré-leptotènes. Elles constituent la vague de différenciation la plus récente. La couche secondaire est composée de cellules en cour de méiose. Elles ont pour origine une vague plus ancienne de différenciation. Enfin, vers la lumière du tube, on retrouve la troisième vague formée de spermatozoïdes en cours d'élongation ou de libération dans la lumière. Ces derniers sont issus d'une vague plus ancienne encore, commencée il y a une trentaine de jours.

Dans une coupe transversale de tubule séminifère, on ne retrouve pas simultanément la totalité de tous les états de différenciations cellulaires réunis mais seulement quelques-uns et de façon surprenante toujours les mêmes. En effet, les coupes histologiques révèlent une

association récurrente des mêmes cellules germinales dans un état de différenciation particulier. Ces associations récurrentes ont été observées pour la première fois en 1890 et nommées par LeBlond et Clermont « cycle de l'épithélium séminifère » en 1952 (Leblond and Clermont, 1952). De là, est née une nomenclature en 12 stades qui divisent la spermatogenèse. Il est connu depuis longtemps que chaque étape de la spermatogenèse a une durée constante pour une espèce donnée. La différenciation des cellules germinales est donc réglée par un programme strict à l'échelle du temps. Le cycle est donc défini par l'association récurrente des cellules germinales à un endroit du tube au fil du temps. Une étape de ce cycle occupe un segment linéaire le long du tubule séminifère. L'étape suivante sera localisée sur le segment juxtaposé au premier et ainsi de suite tout au long du tubule séminifère (Figure 23).

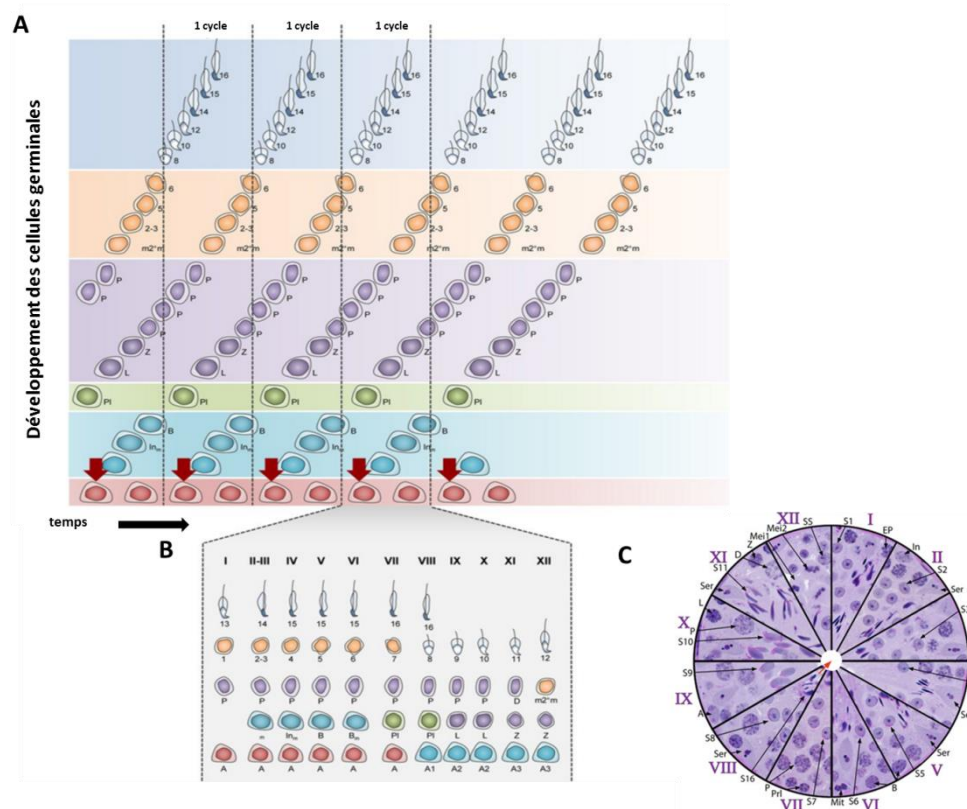


Figure 23 : Cycle de l'épithélium du tubule séminifère. (A) Représentation schématique du démarrage et de l'évolution d'une nouvelle vague de différenciation à partir d'une cellule souche en fonction du temps. Les cellules souches indifférenciées sont représentées en rouge alors que les différenciées sont représentées en bleu (In : Spermatogonies intermédiaires ; B : Spermatogonies de type B). Chaque flèche marque le début d'une nouvelle vague de différenciation. Toutes les étapes de différenciation sont indiquées par une couleur, en vert, les préleptotènes ; en violet, les cellules méiotiques en ordre chronologique (L : leptotène ; Z : zygotène ; P : pachytène ; D : diakinèse ; m2°m : 2 divisions méiotiques) ; en orange, les spermatocytes ronds du stade 1 à 7 ; en gris, les spermatozoïdes en elongation et terminaux (stade 8 à 16). (B) Le long du tubule séminifère, on retrouve cette organisation en 12 stades (I à XII) sous forme de schéma en B et de photographie en C. (C) Coloration PAS/Hématoxiline de différents stades de tubule séminifère, on observe une composition cellulaire différente en fonction des stades (Ser : cellule de Sertoli ; SS : spermatocyte secondaire ; S : spermatocyte ronde ; Mit : mitose ; Mei : Méiose). (Modifié de Griswold, 2016; Meistrich and Hess, 2013).

Malgré de nombreux progrès dans ce domaine, on ne connaît pas encore exactement le processus qui régit ce cycle. Néanmoins, il a été proposé qu'il soit lié par un facteur extrinsèque, la vitamine A (ou rétinoïque acide, RA). Griswold propose le modèle selon lequel des pulsations de RA seraient présentes tout au long du tubule séminifère avec un pic au stade VIII à IX et un creux au stade I à III (Figure 24).

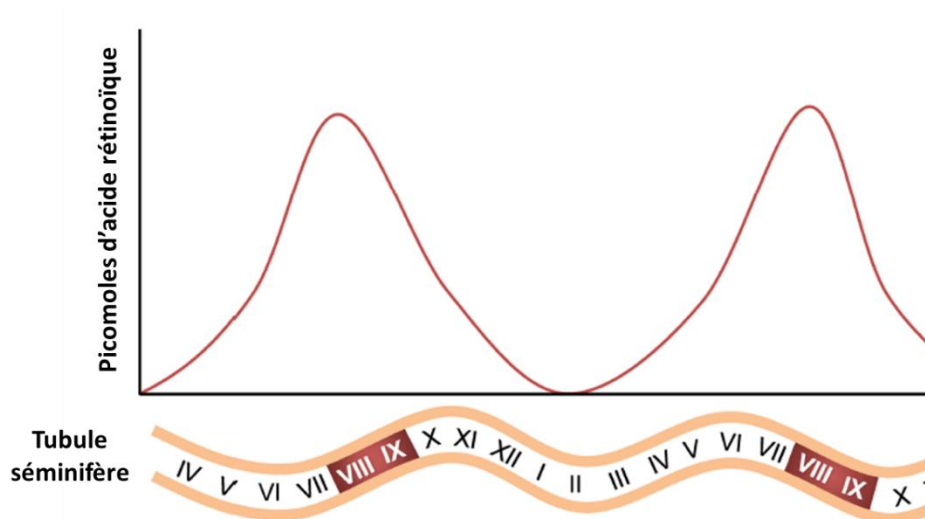


Figure 24 : Le modèle proposé par Griswold basé sur des pulsations d'acide rétinoïque pour générer les cycles de l'épithélium du tubule séminifère. Des augmentations et des diminutions de RA conduisent les vagues de différenciation le long du tubule séminifère avec un pic en stade VIII et IX et un creux en stade I, II et III (Modifié de Griswold, 2016).

Régulation génique au cours de la spermatogenèse :

Comme nous venons de l'aborder, chaque cellule composant l'intérieur du tubule séminifère se situe à une étape particulière dans son processus de différenciation. Son environnement et son état ne sont pas figés mais évoluent au cours de la différenciation. Cela provoque de fait une adaptation de chacune des cellules et par là même une modification de son expression génique. Certains gènes s'éteignent alors que d'autres au contraire deviennent actifs durant ces étapes de différenciation. En 2008, Johnston a montré une progression de l'expression génique des cellules germinales durant toute la spermatogenèse. Cette évolution de l'expression des gènes n'est pas limitée aux cellules germinales mais est aussi valable pour les cellules nourricières, les cellules de Sertoli (Figure 25).

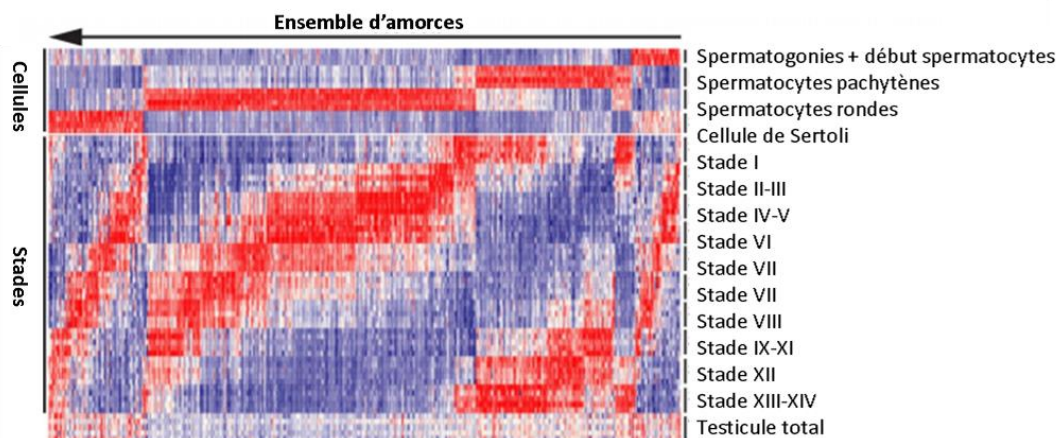


Figure 25 : Quantité relative de l'expression de 1286 groupes d'amorces régulés avec un facteur 4 dans différents types cellulaires et dans chaque étape de la spermatogenèse. Les groupes d'amorces spécifiques d'un gène sont classés dans un premier temps en fonction du type cellulaire et dans un second temps selon le stade du tubule séminifère. On observe une nette évolution de l'expression génique des différentes cellules impliquées dans la spermatogenèse y compris des cellules somatiques et les cellules de Sertoli. (En rouge sont représentés les gènes ayant une forte expression, en blanc les gènes ayant une expression moyenne et en bleu les gènes dont l'expression est diminuée.) (d'après Johnston et al., 2008).

Le détail de chaque état de différenciation sera décrit plus amplement dans la partie ci-dessous.

I.2.1.3 La phase I : Les cellules souches germinales

Toute la lignée germinale dérive d'un seul type cellulaire, les cellules souches germinales également nommées spermatogonies. De fait, ce sont elles qui vont transmettre les informations génétiques pour les générations futures. Ces cellules sont des cellules souches adultes multipotentes. Leur nombre est extrêmement faible puisqu'elles ne représentent que 0,02 à 0,04% des cellules totales de la spermatogenèse (Tegelenbosch and de Rooij, 1993). Leurs auto-renouveaulement par mitose assure une production de spermatozoïdes de l'adolescence jusqu'à un âge très avancé.

Elles sont localisées sur la face externe du tubule séminifère nichées entre les cellules de Sertoli. Les jonctions serrées situées entre les cellules de Sertoli ont un rôle à la fois protecteur mais permettent aussi aux spermatogonies d'évoluer dans un micro environnement particulier propice à leur auto-renouveaulement et leur différenciation. Notamment, les cellules

de Sertoli fournissent le facteur principal nécessaire au maintien et à l'auto-renouvellement des spermatogonies : le GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic Factor) (Kanatsu-Shinohara et al., 2003; Kubota et al., 2004). Le GDNF est un facteur finement régulé dans le processus de spermatogenèse. Chez les souris transgéniques surexprimant GDNF, les spermatogonies s'accumulent dans les tubules séminifères et la différenciation est inexistante provoquant la stérilité de l'individu. À l'inverse, l'absence de GDNF dans les souris transgéniques induit également une stérilité et une absence de différenciation cellulaire directement liée à une perte de spermatogonies (Jijiwa et al., 2008; Meng et al., 2000; Naughton et al., 2006).

I.2.1.4 La phase II : Méiose et brassage génétique

Pour obtenir des cellules haploïdes (1N) compétentes pour la fécondation, les cellules germinales vont devoir subir deux divisions méiotiques successives. Ce processus est tout d'abord précédé d'une répllication de la totalité de l'ADN. Les cellules germinales ainsi formées sont constituées de 2 chromatides d'origine maternelle et deux chromatides d'origine paternelle (4N). La première division méiotique dite « réductionnelle » mène à la séparation des chromosomes homologues d'origines maternel et paternel. Les deux cellules ainsi formées (2N) subissent une seconde division méiotique dite « équationnelle » où les chromatides sœurs se séparent pour donner naissance à la formation de deux cellules haploïdes (1N) : les spermatides rondes.

Chacune de ces divisions cellulaires se divisent en quatre grandes phases chronologiquement : prophase, métaphase, anaphase et télophase. Chacune de ces phases dure un temps bien défini qui peut être très rapide comme la méiose II ou très lente comme la phase pachytène de la méiose I (Figure 26).

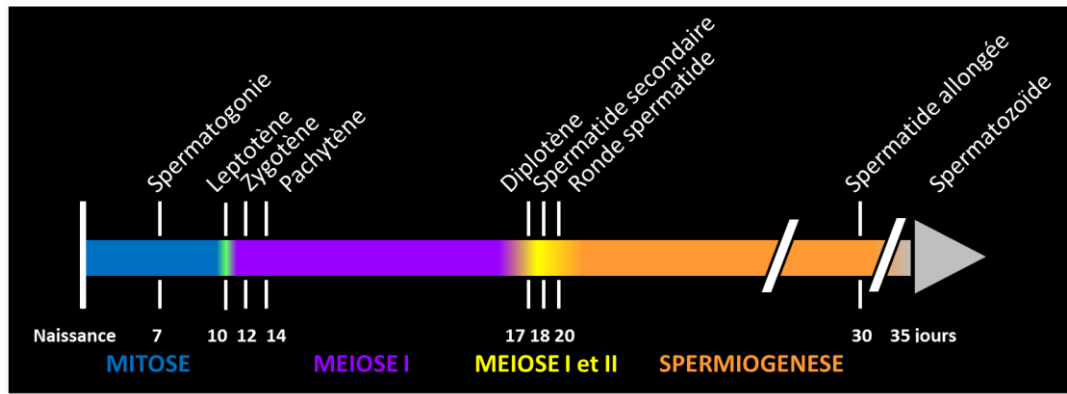


Figure 26 : Schéma représentant la chronologie des différentes étapes de la spermatogenèse chez la souris. En bleu, est représentée la phase de mitose des spermatogonies. En vert, on trouve la phase leptotène lors de laquelle a lieu la réplication de l'ADN. La suite de la prophase I est en violet avec l'apparition des différents types cellulaires : zygotène, pachytène et diplotène. La prophase I, extrêmement longue, aboutie à la division méiotique I et II (zone jaune). Ces deux divisions sont à l'inverse très rapides. L'étape ultime, la spermiogenèse en orange est composée de spermatides rondes puis allongées et enfin de spermatozoïdes (en gris). On peut voir sur l'échelle de temps, le moment où chaque type cellulaire apparaît (D'après Buaas et al., 2004).

La prophase I :

La prophase I de la première division méiotique est particulièrement longue. Elle occupe à elle seule presque la totalité du temps de méiose dans le processus de spermatogenèse. Ceci est lié au fait que de nombreuses étapes déterminantes se déroulent en prophase I notamment la condensation des chromosomes, leurs appariements et les réarrangements chromosomiques par recombinaison nécessaires au brassage génétique de l'espèce. La prophase I est subdivisée en cinq phases : préleptotène, leptotène zygotène, pachytène et diplotène.

Préleptotène :

Les cellules germinales en préleptotène présentent une morphologie proche des spermatogonies de type B dont elles sont issues. De taille assez petite, elles possèdent un noyau dont la chromatine dense est regroupée au pourtour de la membrane nucléaire. Le stade préleptotène possède la seule phase S de l'étape de méiose. La réplication complète de son ADN maternel et paternel en fait une cellule 4N. Chaque chromatide sœur est maintenue par un complexe protéique composé de cohésines (Hopkins et al., 2014; Ishiguro et al., 2014; Revenkova et al., 2001).

Leptotène : (du grec lepto : mince, et tène : bandelette).

Le stade leptotène correspond à l'entrée en méiose des cellules germinales. À ce stade, la cellule en différenciation n'est plus localisée dans le compartiment des spermatogonies mais dans la zone abluminale du tubule séminifère après la barrière hémato-testiculaire. Dans la phase leptotène, STRA8 (STimulated by Retinoic Acid 8) est un acteur essentiel (Anderson et al., 2008; Lin et al., 2008). Comme son nom l'indique, il est exprimé en réponse au signal de l'acide rétinoïque. Chez les souris transgéniques STRA8^{KO/KO}, on observe une quantité normale de spermatogonies, de spermatocytes préleptotènes. En revanche, une absence de spermatocyte après le stade leptotène est décelée conduisant à l'infertilité de l'animal (Anderson et al., 2008). Ces données suggèrent que STRA8 est requis pour le passage au stade leptotène et initier la méiose.

Morphologiquement, on note une augmentation du volume du noyau cellulaire. Cette augmentation progressive ne concerne pas uniquement cette phase mais tous les stades de la prophase I pour aboutir à un noyau extrêmement expansé en phase pachytène tardif et diplotène.

Au stade leptotène, les chromosomes commencent leur compaction en vue d'une individualisation future. Les chromatides sœurs ressemblent à des pelotes de laine où chaque chromosome ne peut pas être différencié. À ce stade, les chromatides sœurs sont maintenues liées par des cohésines. Les télomères des chromosomes s'attachent le long de la membrane nucléaire via SUN1 (Sad1 and UNC84 Domain Containing 1) et commencent leur migration vers le centrosome (Ding et al., 2007; de La Roche Saint-André, 2008). Les télomères resteront attachés à la membrane nucléaire du stade leptotène au stade diplotène. Cette attachement est essentiel à la poursuite de la méiose car les chromosomes des souris SUN1^{KO/KO} sont incapables de s'attacher à la membrane provoquant ainsi un blocage de la spermatogenèse et une infertilité totale des animaux (Ding et al., 2007).

Zygotène : (du grec zygo : liaison entre deux éléments).

En zygotène, la chromatine continue son processus de compaction pendant que les télomères se regroupent sur la membrane nucléaire au niveau du centrosome. Le complexe synaptonémal (SCP) prend forme notamment par la constitution des éléments axiaux SCP2 et SCP3 qui se mettent en place tout le long des chromatides sœurs (Figure 27). En fin de Zygotène, des dimères de SCP1 rejoignent le complexe synaptonémal et se positionnent au centre de ce dernier. SCP1 fait la jonction entre les deux SCP3 liant respectivement les deux chromatides sœurs paternelles et maternelles. SCP1 et SCP3 forment ainsi le squelette de la tétrade de chromatides caractéristiques du stade pachytène.

Au stade zygotène débute aussi la première étape du mécanisme de recombinaison de la spermatogenèse par création de cassures double brins. De plus en plus, il apparaît que ces cassures ne sont pas dispersées de manière désordonnée mais au contraire selon une organisation bien établie sur des régions récurrentes nommées « hot spot ».

Les deux modifications post-traductionnelles H3K4me3 et H3K36me3 sont retrouvées accumulées spécifiquement sur les hot spots des chromosomes autosomiques et sur la zone PAR (Pseudo-Autosomal Region) des chromosomes sexuels. La protéine PRMD9 (PR/SET domain 9) a été décrite comme étant un acteur majeur dans la spécification de ces régions (Baudat et al., 2010) de par sa liaison aux séquences spécifiques de hot spot. Or il a été trouvé récemment que sur des souris invalidées pour le gène PRMD9, on observe une chute dramatique des modifications épigénétiques H3K4me3, mais aussi H3K36me3 (Powers et al., 2016). Cela confirme le rôle essentiel de PRMD9 dans la reconnaissance et dans la formation de ces sites via la triméthylation de H3 sur ses lysines 4 et 36.

Quatre protéines ont été identifiées comme initiatrices des cassures double brins : SPO11, Mei1, Mei4 (Meiotic double-stranded break formation protein 1 and 4) et REC114 (Meiotic recombination protein 114) (Lam and Keeney, 2015; Shannon et al., 1999). En effet, l'éviction de SPO11 dans les souris transgéniques aboutie à une absence de cassure qui se traduit par une absence de RAD51 (DNA repair protein 51), protéine impliquée dans la réparation du brin lésé, et un arrêt de la spermatogenèse au stade pachytène (Romanienko and Camerini-Otero, 2000). De même, les souris Mei1^{KO/KO} et Mei4^{KO/KO} présentent une absence de cassure double brins et un arrêt légèrement plus précoce au stade zygotène (Kumar et al., 2010; Libby et al., 2002).

Ces lésions de l'ADN double brins provoquent dans un second temps le recrutement de H2AX sous sa forme phosphorylée sur la sérine 139 (γ H2AX). Ce dernier recrute la machinerie de réparation. MRE11 en fait partie, il dégrade l'ADN sur les points de cassures pour libérer de l'ADN simple brin. De là, deux recombinaisons RAD51 et DMC1 interviennent pour réaliser la reconstruction du brin lésé par recombinaison homologue. Ces deux protéines interagissent avec SCP3 et semblent être capables de rapprocher géographiquement deux chromatides issues de chromosomes homologues (Tarsounas et al., 1999) créant ainsi des chiasmas.

Néanmoins, il est important de noter que la majorité des cassures double brins sont réparées directement sans faire intervenir de recombinaisons homologues. Seule une petite partie deviendra un crossing-over avec enjambement des chromatides homologues. De manière surprenante, la machinerie de recombinaison semble intimement liée au complexe synaptonémal. En effet, les souris mâles dépourvu en SMC1, un élément du complexe axial (SMC1 : Structural Maintenance of Chromosomes), sont stériles. Elles présentent non seulement une absence du complexe synaptonémal (aucun positionnement de SCP1) mais aussi une absence des intermédiaires de recombinaison. *In fine*, les cellules germinales sont conduit vers l'apoptose (Kagawa and Kurumizaka, 2010; Pittman et al., 1998).

Pachytène : (du grec pachy : épais).

Au stade pachytène, les cellules sont caractéristiques avec un noyau expansé et très granuleux qui le rend aisément identifiable en microscopie à contraste de phase. Sa durée est dépendante de l'espèce : 2 semaines chez l'humain et 5 à 6 jours chez la souris. Dans chaque espèce le stade pachytène est le plus long des stades de la méiose. De ce fait, les cellules en pachytène représentent la majorité des cellules en phase méiose en un temps donné. Certaines revues divisent le stade pachytène en trois sous phases : précoce, intermédiaire et tardive.

Durant toute la phase de pachytène, le complexe synaptonémal, en liaison avec la tétrade, est complètement formé. Il se compose des éléments axiaux SCP2 et SCP3 liés aux cohésines REC8 (Meiotic recombination protein 8), STAG3 (Stromal antigen 3) et SMC1 au niveau des chromatides sœurs (Figure 27). Les chromatides sœurs paternelles et maternelles sont maintenues entre elles par des dimères de SCP1 qui se fixent à un élément central composé de Tex12 (Testis expressed 12), SYCE1, SYCE2 (SYnaptonemal Complex Central

Element protein 1 et 2) (Morelli and Cohen, 2005; Öllinger et al., 2005). L'absence de SCP1 ou SCP3 aboutit à un assemblage défectueux du complexe synaptonémal conduisant à une méiose perturbée et à un arrêt de la spermatogenèse par une dégénérescence des cellules germinales (Bisig et al., 2012; Yuan et al., 2000).

Étant homologue, les chromosomes autosomiques s'apparient via le complexe synaptonémal sur la totalité de leur longueur. En revanche, les chromosomes sexuels X et Y ne sont pas homologues sauf sur une petite partie nommée PAR (Région pseudo-autosomale). Sur cette région de 0,7 Mbases, les chromosomes sexuels possèdent un complexe synaptonémal complet contenant notamment l'élément SCP1 (Kauppi et al., 2012). Du fait de sa très petite taille, la zone PAR bénéficie d'une structure chromatinienne spécifique riche en tige boucle qui lui permet d'effectuer de nombreuses cassures doubles brins. En revanche, les queues non homologues des chromosomes sexuels restent non appariées. Les chromosomes sexuels vont constituer une entité à part entière appelé le corps sexuel ou MSCI (Figure 31). Ce corps est mis à l'écart en périphérie du noyau et doté de modifications épigénétiques spécifiques telles que l'enrichissement en γ H2AX.

En pachytène, les enjambements perdurent sous le contrôle d'un complexe protéique composé de MLH3 qui recrute MLH1 (Lipkin et al., 2002). L'absence de l'une ou l'autre de ces deux protéines induit une stérilité chez la souris mâle par formation incomplète du chiasma. L'éviction de MLH1 chez la souris provoque une recombinaison incomplète aboutissant à une séparation prématurée des chromatides lors de la division méiotique (Baker et al., 1996).

La recombinaison homologue joue deux fonctions principales et essentielles à la survie de l'espèce. La première est de réaliser le brassage génétique responsable de l'adaptabilité des espèces et de leur évolution. La seconde est de maintenir les chromatides suffisamment jointives pour les positionner correctement sur la plaque équatoriale mais pas trop pour ne pas bloquer la migration des chromosomes lors de leur séparation pendant la division. Une formation non conforme du crossing-over aboutit à des difficultés d'exécuter un positionnement et une séparation correcte. Ces anomalies sont décelées par la cellule qui rentre en apoptose comme chez les souris $MLH1^{KO/KO}$ (Baker et al., 1996).

Diploène : (du grec diplo : double).

Le stade diploène est dédié à la destruction du complexe synaptonémal. Dans un premier temps, les chromatides s'éloignent libérant SCP1 sauf au niveau des crossing-over où les chromatides restent jointives (Figure 27). Pour être viable, une cellule doit au moins avoir 1 crossing-over par chromosome. À ce stade, un second centrosome apparaît.

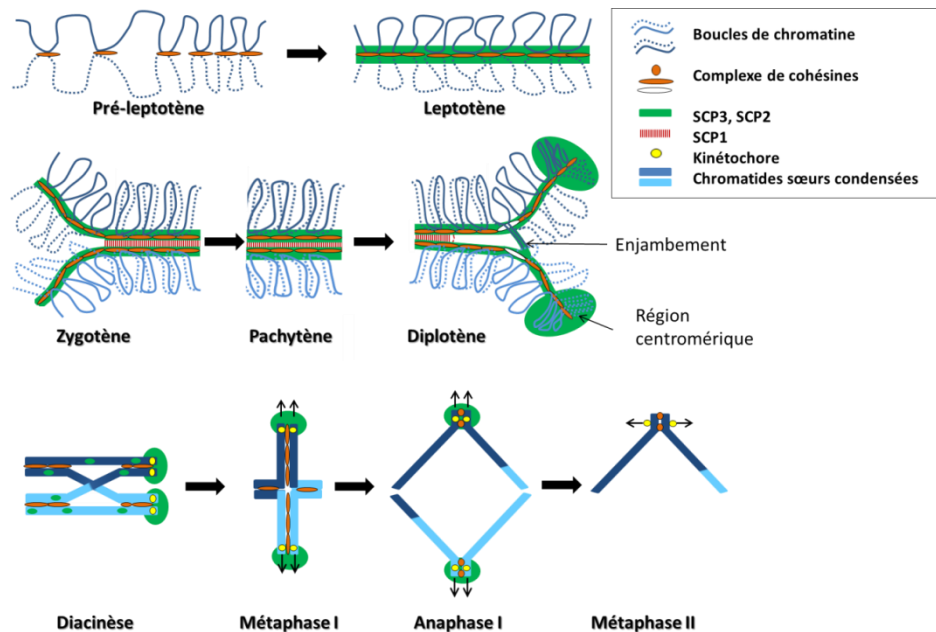


Figure 27 : Représentation schématique de la dynamique d'apparition et de disparition du complexe synaptonémal au cours de la méiose chez la souris. Au stade pré-leptotène, on observe un regroupement des boucles de chromatine grâce aux cohésines. Les éléments latéraux du complexe synaptonémal (en vert) composés de SCP3, SCP2 se forment autour des cohésines en leptotène. Au stade fin de zygotène et pachytène, le complexe synaptonémal 1 (SCP1 en rouge) vient se lier à la fois sur l'élément central du complexe synaptonémal mais aussi avec les éléments latéraux contenant notamment SCP3. Les chromatides sœurs maternelles et paternelles sont intimement liées à ce stade. Les crossing-over entre chromosomes peuvent s'effectuer. La destruction du complexe synaptonémal débute au stade diploène par la disparition de SCP1 puis en diacinèse par la disparition de SCP3 sauf au niveau du kinétochore dans la région centromérique. Les chromosomes restent liés par les chiasmas (zone de chevauchement des chromatides). À ce stade, il y a séparation des chromosomes homologues qui migrent vers les centrosomes lors de la première division méiotique (Eijpe et al., 2003). En métaphase II, SCP3 disparaît de la région centromérique. Les kinétochores sont sollicités pour la séparation des chromatides sœurs.

La diacinèse :

En diacinèse, les chromosomes paternels et maternels commencent à se détacher de la membrane nucléaire qui disparaît peu à peu. Ils ne sont pas appariés au niveau du centromère comme en mitose mais au niveau des chiasmas (Figure 27). Les résidus de SCP3 disparaissent

entre les chromatides sœurs et viennent se positionner au niveau des centromères des chromosomes (Bisig et al., 2012).

Division méiotique :

La métaphase I :

Les chromosomes se positionnent sur la plaque équatoriale. Le kinétochore se forme sur les centromères. Les microtubules s'accrochent aux kinétochores maternels et paternels afin de les séparer. Les chromatides sœurs paternelles se regroupent sur un pôle de la cellule alors que celles d'origine maternelle migrent vers l'autre pôle. Les chromosomes restent accrochés par leurs chiasmas.

L'anaphase I :

En Anaphase I, les chiasmas se rompent afin de libérer les chromosomes homologues et leur permettre de migrer vers les centrosomes, c'est la division méiotique « réductionnelle ». Ce processus sépare ainsi physiquement les chromosomes sexuels d'origine maternelle et paternelle.

La télophase I :

À cette étape, on retrouve au niveau des pôles opposés du fuseau deux groupes de chromosomes. Une nouvelle membrane nucléaire se forme autour de chacun d'eux. La cytotélorèse qui suit sera incomplète. En effet, les deux spermatides II nouvellement créées restent liées par un pont cytoplasmique.

La seconde division méiotique des spermatides II est extrêmement brève ce qui la rend difficile à étudier. Elle se déroule comme une mitose classique sans l'étape de prophase et donc de réplication de l'ADN. En métaphase II, chaque chromosome est composé de deux chromatides sœurs. Celles-ci se positionnent sur la plaque métaphasique au niveau de leurs centromères. En anaphase II les chromatides sœurs se séparent et migrent vers leurs centrosomes respectifs. En télophase II, la membrane nucléaire se reforme autour de chaque lot de chromosome. Cette dernière division nommée équationnelle aboutie à la formation de 4

cellules haploïdes appelées spermatides rondes (Gómez et al., 2016). Ces dernières vont ensuite subir plusieurs étapes de différenciation, c'est le processus de spermiogenèse.

I.2.1.5 La phase III : La spermiogenèse

Les phases de la spermiogenèse :

La spermiogenèse est le processus de différenciation cellulaire des spermatides rondes vers les spermatozoïdes. Elle se déroule au centre du tubule séminifère. Chez la souris, on divise ce processus en 16 étapes au total en fonction de la morphologie du noyau (élongation nucléaire) et du développement de l'acrosome (Meistrich and Hess, 2013). Les phases de 1 à 12 de la spermiogenèse correspondent aux étapes 1 à 12 de la spermatogenèse (voir paragraphe : La spermatogenèse, un processus cyclique)

*** De la phase 1 à 8**, on observe la présence de spermatides rondes. Ces cellules tirent leur nom de leur forme caractéristique ronde et petite. Elles possèdent un noyau rond où l'on peut distinguer par un marquage au DAPI, une zone centrale d'hétérochromatine (Turner et al., 2005). Les chromosomes sexuels forment une structure arrondie nommée le PMSC sur l'un des côtés de cette zone d'hétérochromatine (voir paragraphe : les chromosomes sexuels, un monde à part). Les spermatides rondes possèdent une forte activité transcriptionnelle jusqu'au stade 5 (Dottermusch-Heidel et al., 2014). Il est probable que cela permette de constituer un stock d'ARN et de protéines pour le spermatozoïde lors de sa maturation et de la fécondation. En effet, après le stade 5, la transcription est réduite puis arrêtée définitivement.

Ces étapes sont également caractérisées par la formation de l'acrosome. L'acrosome est une vésicule unique d'exocytose constituée à partir de l'appareil de Golgi. L'un de ses rôles principaux est de séquestrer les protéines nécessaires à la traversée des couches protectrices de l'ovocyte. La morphologie et l'allongement de l'acrosome nous permet de déterminer avec exactitude le stade des spermatides rondes (Figure 28). La spermatide ronde au stade 1 voit son appareil de Golgi se rapprocher de la membrane nucléaire alors que les centrioles migrent vers le pôle opposé. Une nouvelle polarité est donnée aux spermatides rondes où l'acrosome est orienté du côté de la cellule de Sertoli et les centrioles du côté de la

lumière du tubule séminifère. L'appareil de Golgi grossi considérablement et émergent du bout des saccules distaux, des vésicules qui se regroupent. Leurs fusions forment la vésicule acrosomiale contenant en son centre le granule acrosomial. La vésicule acrosomiale vient se plaquer sur la membrane nucléaire. Au cours des étapes de la spermiogenèse, elle va progressivement s'étirer le long de la membrane nucléaire jusqu'à former un chapeau, le capuchon encéphalique acrosomiale. Ce dernier entoure une grande partie du génome paternel (Figure 29).

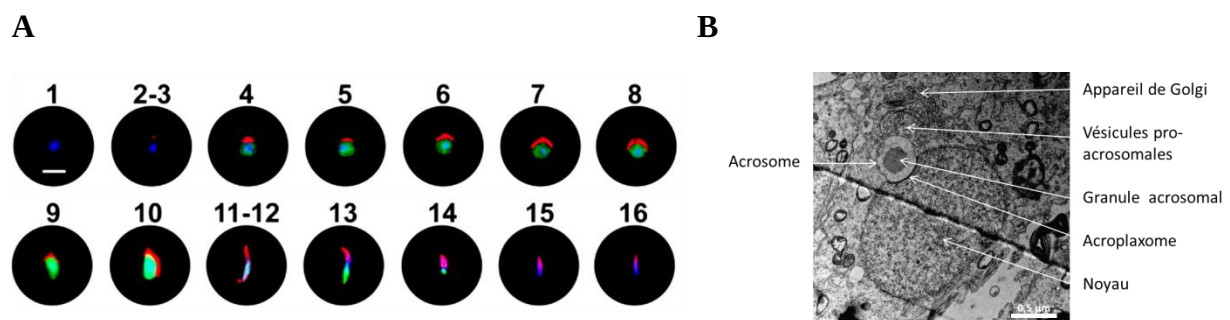


Figure 28 : Formation de l'acrosome chez la souris vue par immunofluorescence (d'après Lin et al., 2016) et par microscopie électronique. (A) On observe par immunofluorescence, l'étirement de l'acrosome tout au long des stades de la spermiogenèse par le marquage d'une protéine acrosomiales, la lectine (en rouge), de l'ADN (DAPI en bleu) et d'une ubiquitine ligase CUL4B (en vert) (échelle : 5 μ m). (B) Image prise par microscopie électronique d'une spermatide ronde au stade 4 où l'on observe la formation de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi qui produit les vésicules pro-acrosomiales. Ces vésicules s'agrègent pour former une seule et même vésicule l'acrosome. Ce dernier est composé d'un granule acrosomial central dense. Il est lié à la membrane nucléaire au niveau de l'acroplaxome, particulièrement dense en microscopie électronique (barre d'échelle : 0,5 μ m).

Au stade 8, le flagelle commence à prendre forme à partir des centrioles.

*** De la phase 9 à 11**, on trouve les spermatides en cours d'élongation. Le noyau commence progressivement à prendre une forme allongée. La transcription s'arrête et le flagelle continue sa formation par l'allongement des microtubules dans l'axonème.

*** De la phase 12 à 14**, on observe les spermatides dites élongées du fait de l'élongation du noyau dû à la condensation extrême de la chromatine et de l'axonème qui a atteint sa taille maximale.

*** De la phase 15 à 16**, on observe des spermatozoïdes formés qui seront libérés dans la lumière du tubule séminifère après phagocytose de leur cytoplasme résiduel par les cellules de Sertoli. C'est la spermiation.

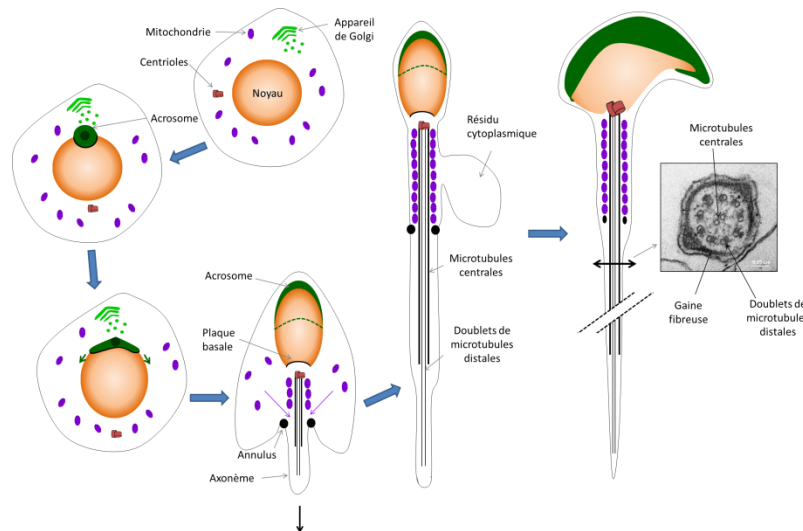


Figure 29 : Représentation schématique de la formation du spermatozoïde lors de la spermiogenèse chez la souris. Les spermatozoïdes sont composés de deux éléments, la tête et la queue. La queue est elle-même subdivisée en trois parties : la pièce intermédiaire, la pièce centrale et la pièce terminale. La tête de forme pointue est constituée de l'ADN ultra compacté surmonté par l'acrosome. En dessous de la tête, on observe la pièce intermédiaire où les mitochondries se sont distribuées de manière organisée le long des doublets de microtubules. La partie centrale de la queue du spermatozoïde est composée de deux fibres centrales de microtubules entourés de 9 doublets de microtubules maintenus par une gaine fibreuse. La queue est extrêmement longue et permet aux spermatozoïdes de se déplacer notamment lors de leur long voyage vers l'ovule.

Spermiogenèse : La chromatine dans tous ses états.

La chromatine va subir de nombreuses modifications post-traductionnelles dont le but *in fine* est de remplacer la majorité des histones. On estime que 99% des histones sont retirées chez la souris et 90 % chez l'humain (Rathke et al., 2014; Bao and Bedford, 2016). Dans un premier temps, elles sont remplacées par les protéines de transfert TP1 et TP2. Dans un second temps, ces dernières vont être à leurs tours échangées contre des protamines : protamine 1 et protamine 2. Les protamines sont riches en arginines et en cystéines. De plus petite taille, elles vont faciliter l'ultracompaction du génome paternel et le protéger face à d'éventuelles mutation ou dommage à l'ADN durant sa maturation (Rathke et al., 2014). La compaction est de 6 à 20 fois supérieure avec un génome contenant des protamines plutôt que des histones (Balhorn et al., 1977; Miller et al., 2010).

Les modalités de l'échange entre les histones et les protamines restent encore aujourd'hui largement méconnues. Néanmoins, on observe plusieurs phénomènes particuliers pouvant être impliqués dans ces processus tels que l'incorporation de variants d'histones, la constitution d'un ensemble de modifications pos-traductionnelles sur les histones, l'action de facteurs de remodelage et de protéines chaperonnes.

L'incorporation de variants d'histones :

De nombreux variants d'histones sont incorporés à la chromatine avant ou pendant l'éviction des histones (Figure 30). Ces variants ont la particularité d'être spécifiquement retrouvés dans les testicules mais pas dans des cellules somatiques. On suppose que leur rôle est d'agir sur la chromatine pour la préparer à l'échange avec les protéines de transferts ou les protamines (Orsi et al., 2009; Rathke et al., 2014; Shinagawa et al., 2015 ; Bao and Bedford, 2016). Il a été démontré par l'équipe de S. Khochbin en 2017 que l'histone H2AL2 est responsable de la mise en place d'une structure chromatinienne propice à l'échange protamine/histone (Barral et al., 2017). L'absence de H2AL2 aboutie à des spermatozoïdes pour lesquels l'échange n'est pas efficace provoquant la stérilité de ces souris transgéniques. Malgré cette découverte, il reste encore beaucoup à découvrir sur la valse des histones variants lors de la spermiogenèse. En effet, elle reste descriptive encore aujourd'hui sans pour autant que l'on ait découvert complètement les procédés sous-jacents mis en jeux.

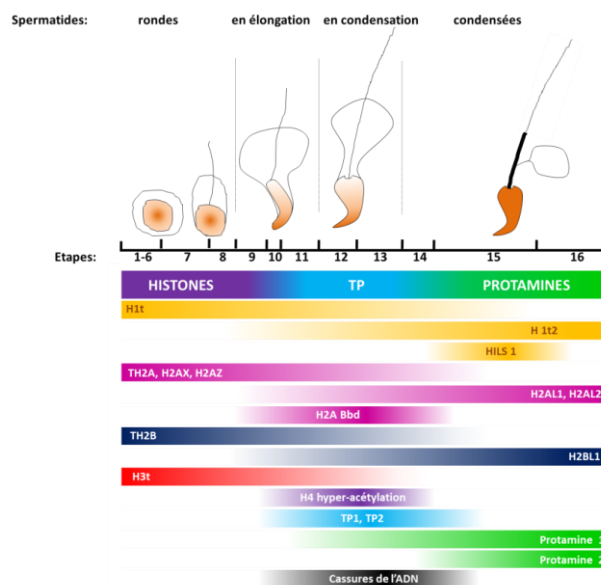


Figure 30 : Schéma représentant le profil d'expression des acteurs épigénétiques majeurs durant la spermiogenèse chez la souris. La spermiogenèse est divisée en 16 étapes où l'on voit une condensation progressive de l'ADN entre les spermatozoïdes ronds (1-8), les spermatozoïdes en élancement (9-11), les spermatozoïdes en condensation (12-13) et condensés (14-16). À la transition entre les spermatozoïdes ronds et élancés, on observe la disparition de 6 variants d'histones (H1t, TH2A, H2AX, H2A.Z, TH2B et H3t). À l'inverse, plusieurs variants d'histones apparaissent (H12, H2AL1, H2AL2, H2BL1, H2A Bbd). L'incorporation de H2A Bbd est effective comme l'hyper-acétylation de H4 (en violet), de manière concomitante à l'incorporation des protéines de transferts TP1 et TP2 (en bleu clair). Seul le variant HILS1 apparaît de manière furtive dans les spermatozoïdes condensés lors de l'incorporation finale des protamines (en vert). Les variants d'histones sont classés par couleur en fonction de leur histone canonique de référence : jaune pour la famille H1, rose pour H2A, bleu foncé pour H2B et rouge pour H3. (Modifié de Rathke et al., 2014).

Modifications post-traductionnelles :

La dynamique des modifications post-traductionnelles rajoute un niveau de complexité supplémentaire pour contrôler finement le processus de spermatogenèse mais aussi de spermiogenèse. L'histone H4 est acétylée en début de spermatogenèse, dans les spermatogonies et le stade préleptotène. En milieu de spermatogenèse, H4 est à l'inverse déacétylée en méiose et dans les spermatides rondes. En fin de spermatogenèse, dans les spermatides élongées, une vague importante d'hyper-acétylation sur les résidus lysine K5, K8 et K16 de l'histone H4 s'effectue (Goudarzi et al., 2016; Govin et al., 2004; Lahn et al., 2002). Ce phénomène est conservé dans de nombreuses espèces, des mammifères à la mouche (Zarnescu, 2007 ; Meistrich et al., 1992 ; Awe and Renkawitz-Pohl, 2010). Les lysines acétylées sont reconnues par une protéine nommée BRDT (BRomoDomain Testis associated). Si l'on supprime le premier domaine de liaison de BRDT avec des lysines acétylées, les souris mâles sont stériles et présentent des défauts importants à partir du stade 9 de la spermiogenèse (Dhar et al., 2012; Govin et al., 2007; Shang et al., 2007). L'hypothèse avancée est que l'hyper-acétylation forme une ultra-structure chromatinienne propice à l'éviction des histones et à l'incorporation de protéines basiques.

L'ensemble de ces modifications épigénétiques qu'elles soient post-traductionnelles ou via l'échange de variants d'histones, composent un langage spécifique qui crée une dynamique chromatinienne propice à l'échange des histones par les protéines de transferts puis les protamines.

1.2.2 Les chromosomes sexuels, un monde à part

Les chromosomes sexuels ont un destin particulier durant le processus de spermatogenèse. En effet, ils diffèrent des autosomes dans leurs organisations génomiques ainsi que dans la composition et l'expression de leurs gènes. Chez les mammifères mâles, les chromosomes sexuels sont hautement hétéromorphiques. De ce fait, lors de la méiose, les chromosomes sexuels ne s'apparient pas sur toute leur longueur comme les autosomes. Seule une petite région située à la périphérie des chromosomes sexuels est homologue entre les chromosomes X et Y, nommée PAR (Pseudo-Autosomal Region). Cette région est le siège de la recombinaison des chromosomes sexuels et est nécessaire pour une ségrégation correcte

des chromatides sœurs. Une mauvaise recombinaison peut provoquer par exemple chez l'homme des anomalies de sexe (Li et al., 2013a; Soh et al., 2014).

I.2.2.1 Les chromosomes sexuels en méiose.

Un autre phénomène particulier affecte uniquement les chromosomes sexuels durant la spermatogenèse. En effet, dans les spermatogonies, première phase de la spermatogenèse, les chromosomes sexuels présentent le même taux d'expression génique que les autosomes (Mueller et al., 2008). En revanche, durant la méiose, les chromosomes sexuels sont inactivés et placés à une extrémité du noyau dans le « corps YX ». En 2013, il a été démontré que l'ARN polymérase II est exclue de ce corps en pachytène (Becherel et al., 2013). À l'inverse, plusieurs marqueurs de l'hétérochromatine sont enrichies sur le « corps XY » comme CBX1 et CBX3 (ChromoBoX). Cela provoque une inactivation de 76% et 90% des gènes portés respectivement par le chromosome X et Y, contre seulement 40% pour les gènes portés par des autosomes lorsque l'on compare l'expression génique entre les spermatogonies de type B et les pachytènes (Moretti et al., 2016). Nommé MSCI (pour Inactivation des Chromosomes Sexuels en Méiose), ce phénomène est extrêmement conservé durant l'évolution. Il est essentiel pour tous les mammifères étudiés mais aussi pour des espèces plus éloignées tel que *C. elegans* (Turner, 2007). Aujourd'hui son rôle précis reste un mystère. En revanche, on sait qu'il est le siège de modifications épigénétiques spécifiques.

Établissement de l'inactivation des chromosomes sexuels :

La formation de l'inactivation transcriptionnelle des chromosomes sexuels est un phénomène dont on ne connaît pas encore avec exactitude tous les mécanismes. De nombreuses zones d'ombre restent à lever malgré les études publiées dans ce domaine ces dernières années. On sait que ce mécanisme se met en place au début du stade pachytène. Les protéines de réparation semblent particulièrement importantes dans ce phénomène puisque deux d'entre elles, γ H2AX et BRCA1 sont les premières recrutées sur les chromosomes sexuels en pachytène.

- **La mise en place du MSCI par BRCA1 et γ H2AX :**

Avant ce stade, le variant d'histone H2AX est rapidement phosphorylé sur la sérine 139 (γ H2AX) en leptotène-zygotène. Il est dans un premier temps recruté comme membre de la machinerie de réparation de l'ADN double brins cassé en leptotène tout comme BRCA1 (BRCA1, Breast Cancer 1), une protéine suppresseur de tumeur (Figure 31). Dans un second temps, en pachytène, BRCA1 s'accumule sur l'élément central des chromosomes sexuels. À ce stade, γ H2AX rejoint BRCA1 puis s'étend sur la totalité du génome chromosomes sexuels avec l'aide d'une histone acétyltransférase impliquée dans la réparation de cassure double brins de l'ADN (Mahadevaiah et al., 2001; Stucki et al., 2005; Turner, 2007; Turner et al., 2005). Deux études ont montré que la protéine de réparation de l'ADN, ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) est responsable de la phosphorylation de γ H2AX au cours du MSCI (Bellani, 2005; Turner et al., 2004). En 2001, Mahadevaiah propose un modèle selon lequel γ H2AX serait responsable de l'extinction transcriptionnelle au niveau du MSCI par une modification de l'organisation structurale de la chromatine. En 2003, on découvre que les souris dépourvues en H2AX présentent un arrêt complet de la méiose directement lié à un MSCI défectueux (Fernandez-Capetillo et al., 2003). Les chromosomes sexuels se retrouvent alors anormalement dépourvus en BRCA1. Or le destin de BRCA1 est intimement lié à celui de γ H2AX. En effet, une mutation sur l'exon 11 de BRCA1 provoque une délocalisation de γ H2AX dans tout le noyau de cellule en pachytène (Turner et al., 2004; Xu, 2003). Le phénotype *in fine* est une entrée en apoptose des cellules méiotiques (Xu, 2003). La déphosphorylation de γ H2AX intervient durant la transition diplotène-métaphase 1 (Turner, 2007). Après cette transition, le variant d'histone H2AX ne sera plus phosphorylé jusqu'à la fin de la spermatogenèse.

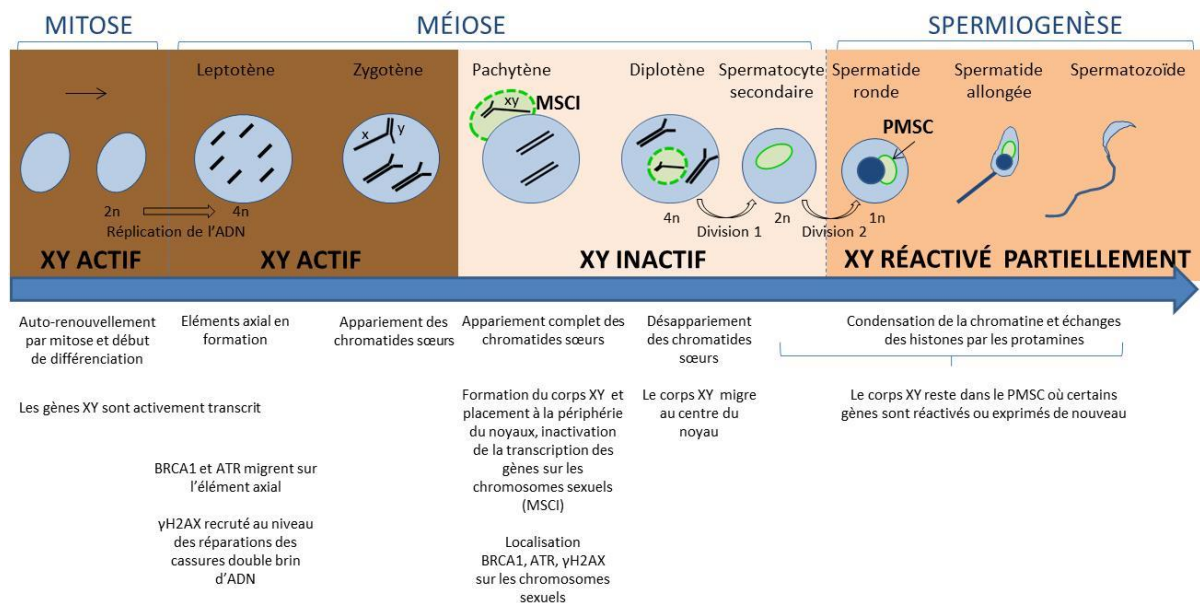


Figure 31 : Activité des chromosomes sexuels durant la spermatogenèse (Adapté de Turner, 2007). L'activité des chromosomes sexuels est montrée en marron lorsque l'expression est forte, en beige lorsque l'expression est faible et en saumon lorsqu'elle est partiellement réactivée. On observe une expression forte dans les cellules souches germinales, spermatogonies puis en leptotène et zygotène. L'expression est ensuite sévèrement réprimée à partir du stade pachytène de la méiose. Les chromosomes sexuels sont regroupés dans le corps sexuel où BRCA1, ATR et γH2AX se retrouvent enrichies pour former le MSCI (Inactivation des Chromosomes Sexuels en Méiose). Après la méiose, les chromosomes sexuels sont regroupés et positionnés dans le domaine PMSC (post-meiotic sex chromatin), en vert clair situé à côté d'un domaine d'hétérochromatine constitutive (en bleu foncé).

- La cascade de réaction induite par l'initiation du MSCI

Après l'installation de γH2AX sur les chromosomes sexuels, ce dernier interagit avec MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) qui se lie également à une E3 ubiquitine ligase, RNF8 (Adams et al., 2018). Cette protéine possède la capacité d'ubiquitiner la lysine 119 de H2A (H2AK119ub) mais aussi d'autres protéines encore inconnues dans le MSCI. Les protéines citées ci-dessus ATR, MDC1, H2AK119ub présentent une localisation similaire à γH2AX sur le MSCI. On ne connaît pas bien le rôle exact de cette ubiquitination mais les auteurs supposent qu'elle prépare à l'établissement d'une nouvelle chromatine plus permissive à la transcription pour l'étape de post-méiose. En effet, SMC2 (Sex comb on midleg-like 2) intervient en fin de pachytène pour supprimer la marque H2AK119ub. Si cette action n'est pas réalisée par exemple en absence de SCML2 ou de RNF8, les deux marques H3K4me2 et H3K27ac ne sont pas mis en place en fin de pachytène (Adams et al., 2018). Les auteurs supposent que ces deux marques servent de mémoire épigénétique lors de la transition méiose/post-méiose. En effet, elles sont connues pour être des marques retrouvées sur des

régions actives et ouvertes de la chromatine. Or en fin de pachytène, ces marques ont été détectées par ChIP-seq sur les régions promotrices et régulatrices des gènes. Elles sont par ailleurs conservées jusqu'en post-méiose dans les spermatides rondes (Adams et al., 2018).

Très récemment, une autre protéine de la réparation a été découverte impliquée dans la mise en place du MSCI, la sénataxine (Becherel et al., 2013; Jiang et al., 2018). La sénataxine est une protéine stabilisatrice des structures hybrides ADN/ARN lors de pauses dans la transcription. Elle est également impliquée dans la réparation de cassures sur l'ADN. Une étude récente montre qu'elle est localisée sur les chromosomes inactivés en pachytène. Son absence bloque ATR sur l'élément central des chromosomes sexuels et diminue la quantité de γ H2AX sur le MSCI. L'inactivation des chromosomes sexuels n'est pas efficace dans ce contexte et H2Aub est délocalisée (Becherel et al., 2013). Son intervention semble donc se faire dans les phases précoces de l'établissement du MSCI.

D'autres marques épigénétiques sont spécifiquement localisées dans le MSCI pendant ou juste après sa formation. On note la présence spécifique de macroH2A.1, la déacétylation de H3 et H4, la di et tri-méthylation de H3 sur la lysine 9, de H3.3 et la sumoylation par SUMO-1 de protéines non déterminées aujourd'hui (Baarends et al., 1999, 2005; Hoyer-Fender, 2003; Khalil et al., 2004; Motzkus et al., 1999; Vigodner and Morris, 2005). On ne connaît pas le rôle exact de ces modifications. Elles pourraient servir à maintenir un état chromatinien particulier sur les chromosomes sexuels. En effet, contrairement à γ H2AX, elles sont présentes à la fois sur les chromosomes sexuels en pachytène dans le MSCI mais aussi durant toute la phase post-méiotique de spermiogenèse. En revanche, certaines marques épigénétiques sont exclues du MSCI. C'est le cas de H3.1, H3.2, H3t et H2AL1 qui sont présentes de manière homogène dans le noyau au stade pachytène mais exclues du « corps XY ». (Greaves et al., 2006; van der Heijden et al., 2007; Soboleva et al., 2011; Ueda et al., 2017) sans que l'on en sache aujourd'hui la raison

I.2.2.2 Les chromosomes sexuels en post-méiose

Après la méiose, les chromosomes sexuels restent regroupés ensemble dans un même domaine : le PMSC (post-meiotic sex chromatin). Ce domaine est adjacent au domaine d'hétérochromatine constitutive formé d'un ou deux chromocentres aisément identifiables car denses à la coloration DAPI. Contrairement aux croyances initiales, de récentes études chez la souris montrent que le « corps XY » n'est pas réduit au silence. Certains gènes sur ces deux chromosomes sont activés ou réactivés en post-méiose. Ces données sont corroborées par le fait que les deux chromosomes sexuels sont riches en gènes nécessaires à la spermiogenèse. On peut notamment souligner que 83 % des gènes portés par le chromosome Y sont même exprimés pour la première fois au stade spermatide ronde (Moretti et al., 2016).

Les gènes portés par les chromosomes sexuels peuvent donc être activés, réprimés ou réactivés en fonction des stades de la spermatogenèse. Cela laisse penser que chaque stade est fortement régulé (Figure 31). On observe dans le PMSC une accumulation de marques épigénétiques différentes de celles portées par les autosomes (Moretti et al., 2016; Mueller et al., 2008). En effet, plusieurs marques liées à l'hétérochromatine en méiose perdurent dans les spermatides rondes telles que H3K9me3, H3K9me2, CBX1, CBX3, HP1 (Baarends et al., 1999, 2005; Khalil et al., 2004; Motzkus et al., 1999). Une publication décrit le variant d'histone H3.3 comme présent dans les pachytènes et dans les spermatides rondes sur les chromosomes sexuels (Greaves et al., 2006; van der Heijden et al., 2007; Khalil et al., 2004; Montellier et al., 2012). Son rôle, à cet endroit, n'a pas encore été élucidé. De nouvelles marques apparaissent également dans le PMSC. Elles ont principalement été mises en évidence par des marquages immunofluorescents. On trouve les variants d'histones H2A.Z et H2A.L1. De nombreuses modifications post-traductionnelles sont également présentes comme la crotonylation des lysines d'histones, la di et tri méthylation de la lysine 4 de l'histone H4, l'acétylation de la lysine 8 de H4 et la 2-hydroxybutyrate de la lysine 8 de H4 (Greaves et al., 2006; van der Heijden et al., 2007; Khalil et al., 2004; Montellier et al., 2012). L'enrichissement de certaines modifications comme H4K8hib, H4K8ac ou la crotonylation (Kcr) sur les chromosomes sexuels est controversé aujourd'hui. En effet, elles sont observées en immunofluorescence mais pas en ChIP (Moretti et al., 2016). Comme la chromatine du PMSC est condensée, il a été proposé que l'enrichissement vu en immunofluorescence serait le résultat de cette concentration plus importante de chromatine en un point et non d'un

enrichissement vrai sur les chromosomes sexuels (Moretti et al., 2016). Il n'en reste pas moins que l'on ne connaît pas exactement le rôle des modifications épigénétiques dans le PMSC.

I.3 RÉTROTRANSPOSONS ET ARN INTERFÉRENTS

I.3.1 Les rétrotransposons

Avant 1940, la communauté scientifique considérait que le génome était relativement stable. Quelques remaniements ponctuels avaient été décrits et le plus souvent associés à des phénotypes. Ce dogme a été aboli par la découverte des éléments transposables (ET) par Barbara McClintock. Désormais, nous savons que le génome présente une grande variabilité notamment dans sa composition à cause des ET. En effet, les ET représentent une partie importante du génome humain soit prêt de 40%. Ces ADN considérés initialement comme « poubelle » sont de plus en plus étudiés de nos jours. En effet, il a été démontré qu'ils pouvaient jouer un rôle primordial dans de nombreux processus biologiques. Outre le fait que les ET possèdent la capacité de se déplacer et de se multiplier dans le génome, leur présence engendre de nombreux remaniements génétiques aux conséquences parfois dramatiques. En effet, leur lieu d'insertion peut engendrer l'activation d'un gène dans le cas d'une insertion en amont du promoteur ou bien le rendre mutant ou inactif par insertion dans la séquence codante, par exemple. Ces insertions étant plus ou moins aléatoires, les phénotypes observés le sont aussi. Les mécanismes qui sous-tendent ce phénomène restent encore aujourd'hui obscurs.

I.3.1.1 Importance des éléments transposables dans le génome

Les éléments transposables sont retrouvés dans toutes les branches de l'évolution des archaebactéries aux eucaryotes en passant par les procaryotes (Chuma and Nakano, 2013). On observe durant l'évolution une augmentation de leur nombre au sein des génomes, notamment, dans ceux d'organismes supérieurs où une plus forte proportion d'ET est retrouvée.

Chez l'humain seulement 2% du génome est composé de séquences codantes. Les 98% restants sont constitués de séquences non codantes (Jasinska and Krzyzosiak, 2004). Parmi elles, on trouve des séquences fortement répétées. Ces séquences répétées représentent 55% du génome total et peuvent être divisées en 2 catégories :

Les séquences répétées en tandem (10% du génome) composées des microsatellites, des minisatellites et des grands blocs d'ADN satellite.

Les séquences répétées dispersées ou éléments transposables (45% du génome). (Figure 32)

La classe des rétrotransposons est la plus représentée des séquences non codantes répétées dans le génome humain avec 42% de présence.

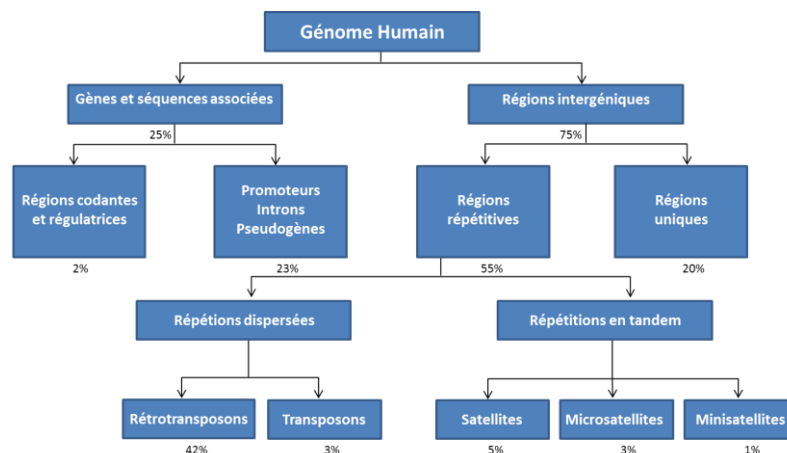


Figure 32 : Répartition de la composition des séquences du génome Humain. On observe que seulement 25% du génome est composé de séquences liées à la production de protéines. La grande majorité des séquences du génome 55% est quant à elle composée de séquences répétées. (D'après Jasinska and Krzyzosiak, 2004).

I.3.1.2 Les éléments transposables : transposons et rétrotransposons.

Il en existe deux types d'éléments transposables : les transposons (dits de classe II) et les rétrotransposons (dits de classe I). Cette distinction est faite car le mode de répllication au sein du génome est particulièrement différent. En effet, les transposons sont excisés à partir d'une séquence d'ADN donneur puis insérés au sein d'une séquence d'ADN receveuse. (Figure 33). Cette action se déroule de manière directe et exclusivement au sein du noyau dans le cas de transposons.

À l'inverse les rétrotransposons se répliquent de manière indirecte et ont besoin d'avoir une phase cytoplasmique. Dans un premier temps, le rétrotransposon est transcrit en ARN à partir de l'ADN donneur. L'ARN sort ensuite du noyau pour subir une reverse transcription donnant ainsi naissance à un ADNc. Les rétrotransposons tirent leur nom du phénomène de rétrotranscription. L'ADNc néosynthétisé entre ensuite dans le noyau pour être inséré dans une séquence d'ADN receveuse. Ce phénomène se nomme la rétrotransposition.

On note que dans le cas des rétrotransposons, une amplification du nombre de copies au sein du génome est réalisée puisque l'ADN donneur ne perd pas la séquence originale.

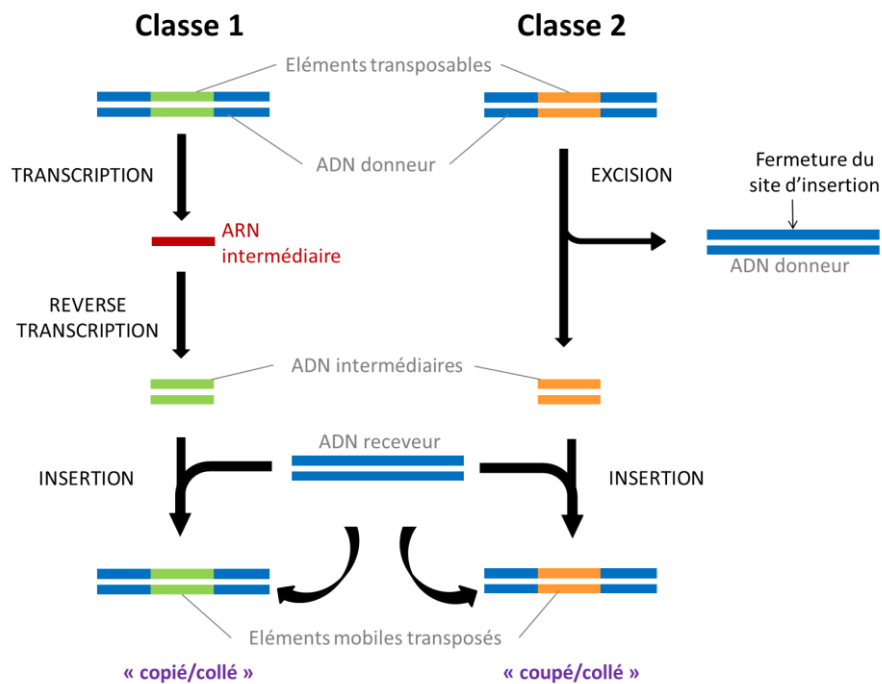


Figure 33 : Représentation schématique de la formation des éléments transposables de classe I et de classe II. Les éléments de classe I (rétrotransposons) se déplacent dans le génome avec un mode dit de « copié/collé ». L'ADN donneur est dans un premier temps transcrit (copié) en ARN puis rétrotranscrit par l'ARN polymérase en ADNc pour *in fine* être inséré dans une nouvelle séquence d'ADN receveuse (collé). Les éléments de classe II (transposons) se répandent dans l'ADN sur un mode dit de « coupé/collé ». La séquence d'ADN donneur est excisée (coupé) puis insérée dans la séquence receveuse (collé) sans l'intervention d'un intermédiaire à ARN.

Notre étude nous a amené à étudier la classe des séquences répétées les plus représentées dans le génome, les rétrotransposons. Nous nous focaliserons donc sur ce type de séquences répétées dans ce manuscrit.

I.3.1.3 Les rétrotransposons

Les rétrotransposons sont des éléments génétiques capables à la fois de se déplacer dans le génome mais aussi de se multiplier ce qui leur vaut le surnom d' « d'élément parasite ». Leur capacité à coloniser le génome est très variable en fonction de l'espèce. Il est acquis aujourd'hui que les rétrotransposons sont des facteurs majeurs de l'évolution des espèces, des génomes et des gènes. On retrouve ces séquences dans des régions introniques ou au voisinage de gènes (Lander et al., 2001). On ne sait pas encore aujourd'hui exactement où

un rétrotransposon va s'insérer. Néanmoins, on a remarqué depuis les années 1980 que les rétrotransposons présentent une prédisposition à s'insérer dans les régions riches en AT tout particulièrement dans les régions promotrices de gènes (Saigo et al., 1984). Chez la souris 18% des gènes présentent dans leur 5' ou leur 3'UTR des éléments transposables contre 27% chez l'homme (van de Lagemaat et al., 2003).

Il existe une classification des rétrotransposons ancienne, la classification de Wicker et une plus récente, la Repbase. En 1994, le Dr Jerzy Jurka a créé l'institut de recherche en génétique (GIRI) dédié à l'étude et à la caractérisation d'éléments répétés ou mobiles de l'ADN chez les eucaryotes. Cet institut maintient et développe la Repbase, une base de données de séquences répétitives. Cette base de données est devenue le standard de référence pour le classement et l'annotation des séquences répétées. Les rétrotransposons sont classés en fonction de leur composition génomique. Dans un premier temps, ils sont divisés en deux sous-groupes, l'un possédant des LTR (longues régions terminales répétées), LTR (+) et l'autre n'en possédant pas, LTR (-) (Figure 34).

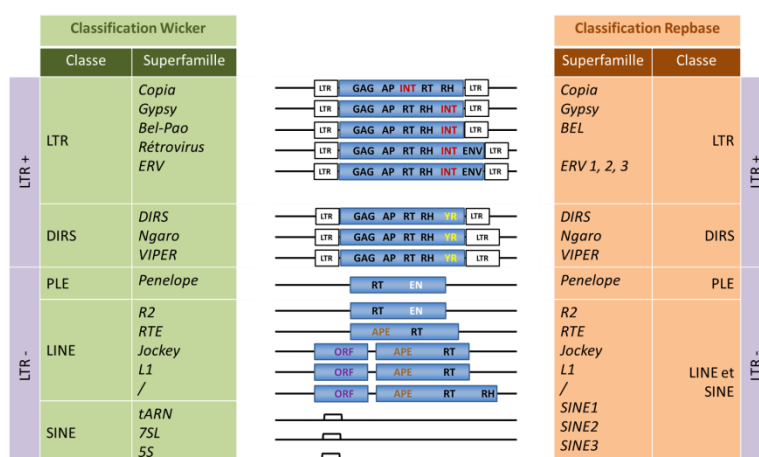


Figure 34: Classification des rétrotransposons. Il existe deux classifications des rétrotransposons très proches l'une de l'autre celle de Wicker et celle de la Repbase. Dans les deux cas, une première classification est réalisée sur la présence ou non de LTR (Long Terminale Répétition) et dans la seconde, la composition des rétrotransposons est prise en compte. On retrouve les gènes codants pour GAG (protéines de la capsid), AP (Asparatic protéase), RT (transcriptase inverse), RH (RNase H), ENV (protéine d'enveloppe), ORF (cadre ouvert de lecture). Les gènes codants pour les recombinases et les endonucléases telles que YR (Tyrosine recombinase), EN (Endonucléase), et APE (Endonucléase aspurinic) permettent de générer un sous classement (D'après Piégu et al., 2015).

Dans le groupe LTR (-) : On retrouve la classe des LINE, des SINE et Pénélope elles-mêmes subdivisées en fonction de leur composition. Les séquences possédant des éléments terminaux

sont regroupées dans la super famille Penelope celles n'en possédant pas dans le groupe LINE et SINE. La distinction entre ces deux derniers est indexée à la présence d'une partie codante (les LINE) ou à son absence (les SINE).

* *La classe des Long-INterspersed Elements (LINE)* est constituée de plusieurs milliers de nucléotides (6-8 Kbases). Elle est connue pour être active dans le génome Humain (Beck et al., 2011). En effet, les séquences LINES sont encadrées par une séquence UTR en 5' et en 3'. À l'extrémité 5', les séquences LINES possèdent un promoteur, reconnu par l'ARN polymérase II, et suivi par tous gènes nécessaires à sa rétrotransposition dans deux cadres de lecture nommés : ORF1 et ORF2 (Open Reading Frame). ORF2 contient notamment la reverse transcriptase qui va permettre à partir de l'ARN LINE de former l'ADNc, forme ultime capable de s'insérer dans un nouvel endroit du génome (Lander et al., 2001). Les séquences LINES sont capables de se propager de manière autonome.

* *La classe des Short-INterspersed Elements (SINES)* possède des séquences à l'inverse très petites. Elles sont composées de plusieurs centaines de nucléotides (100-300 pb). Elles sont transcrites par l'ARN polymérase III. À l'inverse des séquences LINES, les séquences SINES ne codent pour aucun gène. Leurs transpositions s'effectuent en détournant à leurs avantages les protéines synthétisées par d'autres rétroéléments comme les LINES. Cette dépendance fait de ces séquences des rétrotransposons dits « non autonomes ».

Dans le groupe LTR (+) : On distingue la classe nommée LTR possédant une intégrase à celle n'en possédant pas nommée DIRS. Les rétrotransposons à LTR sont divisés en quatre super-familles selon la Repbase : Copia, Gypsy, BEL et ERV (rétrovirus endogènes). Chez les mammifères, seuls les ERV ont été décrits comme étant des éléments mobiles sur le génome.

I.3.1.4 La structure des ERV

La structure des ERV est très proche de celle des rétrovirus « classiques » du type HIV, MMLV (Capy, 2005). Comme eux, ils sont composés de deux parties principales :

- Une partie centrale, la région interne, composée de séquences codantes homologues aux gènes rétroviraux. En général, les gènes des ERV sont composés de la région *gag*, *pro*, *pol* et *env*. La région *gag* est dédiée aux gènes des protéines constitutives de la capsid. La région *pro* possède les gènes de protéase. La région *pol* porte les gènes nécessaires à la réplication du rétrovirus (la transcriptase inverse, la RNase H et l'intégrase) (Figure 34). Ces gènes sont tous nécessaires à l'amplification et à la rétrotransposition du rétrotransposon dans le génome. Dans la grande majorité des rétrotransposons, le gène Δenv (protéine de l'enveloppe) est tronqué ou muté (Warmus et Brown 1989 internet). On trouve également des séquences régulatrices comme les PBS (Primer Binding Site), une séquence d'encapsidation (Ψ) et un site PPT (PolyPurineTract).
- Une seconde partie est composée de deux éléments terminaux identiques qui encadrent les gènes codants. Ces éléments sont nommés LTR pour Long Terminale Répétitions. Ils sont composés de 3 domaines actifs, U3, R et U5 impliqués dans la régulation, l'initiation de la transcription des gènes du rétrotransposon mais aussi dans l'intégration de ce dernier dans le génome.

La proximité structurale entre les ERV et les rétrovirus exogènes laisse supposer une origine commune (Figure 35). La théorie la plus répandue stipule que les cellules de la lignée germinale auraient été infectées par des rétrovirus générant ainsi une transmission à la descendance. (Temin, 1980).

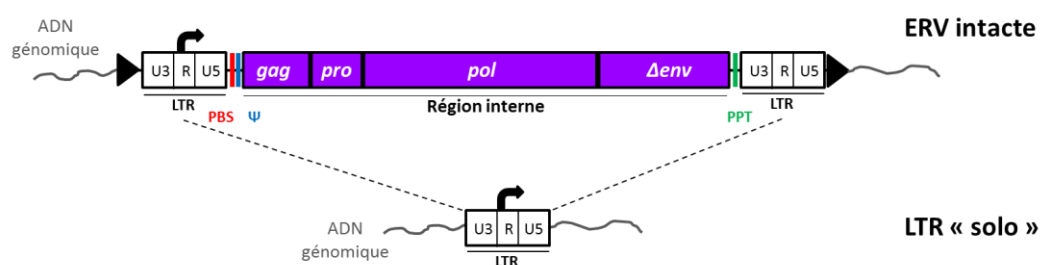


Figure 35 : Structure génomique des rétrovirus endogènes intacts et des LTR « solo ». Les ERV intacts sont formés de deux régions, la région interne et les LTR. La région interne se compose du site PBS (Primer-Binding Site), Ψ (signal d'encapsidation), PPT (PolyPurine Tract), des gènes *gag*, *pro*, *pol* et du gène muté ou tronqué Δenv . Les régions terminales en 3' et en 5' sont constituées des régions LTR. Les LTR sont formés de la séquence unique 3'(U3), unique 5' (U5) et la région régulatrice (R) où est localisé le site de départ de la transcription. Les ERV LTR « solo » sont uniquement composés des régions LTR. (Thompson et al., 2016).

Il existe des ERV nommés « solo » (pour solitaire) où la région interne a été supprimée probablement par recombinaison. Ces ERV sont composés uniquement des séquences LTR contenant une région U3', une région U5', une région régulatrice et un site de départ de la transcription. Dans le génome Humain, les ERV « solo » représentent la majorité des ERV annotés et sont estimés à 577 000 (Friedli and Trono, 2015). Ils peuvent être utilisés par la cellule comme des séquences régulatrices ou des promoteurs. Leur présence est notamment corrélée à des marques épigénétiques de chromatine ouverte et permissive à la transcription telles que H3K4me3 et H3K9ac (Thompson et al., 2016). Certains LTR « solo » sont même devenus des promoteurs spécifiques de tissus. Il a été démontré chez la souris que le gène *Dicer1* était transcrit à partir d'un promoteur à îlot CpG dans la majorité des tissus sauf dans les oocytes où sa transcription s'effectue à partir d'un LTR « solo ». La perte de ce rétrotransposon promoteur provoque une perte de *Dicer1* et une stérilité chez la femelle (Flemr et al., 2013).

I.3.1.5 Régulation des éléments transposables : les ARN interférents

Pour empêcher l'invasion des éléments transposables tels que les ERV, la cellule utilise différentes stratégies défensives comme la méthylation de l'ADN, la désamination et l'utilisation d'ARN interférents. La première consiste à contrôler l'expression des ERV par la méthylation des îlots CpG du LTR (Maksakova et al., 2008). En effet, le statut de méthylation de U3 dans le LTR est directement corrélé à l'activité transcriptionnelle de l'ERV. Cette région particulière contient toutes les séquences nécessaires à l'initiation de la transcription. Une faible méthylation de l'ADN sur ce site induit un fort taux d'expression des ERV (Khodosevich et al., 2004; Lavie et al., 2005). À l'inverse une hyper-méthylation de l'ADN est corrélée avec un faible taux de transcription.

La déamination sur des îlots CpG méthylés est un second mode d'inhibition de l'expression des ERV (Maksakova et al., 2008). La déamination de la guanine induit un appariement sélectif avec une thymine au lieu de la cytosine, produisant ainsi une mutation ponctuelle. L'insertion de ces mutations déstabilise l'expression des ERV (Lee et al., 2008; Manghera and Douville, 2013). La protéine APOBEC3G a été décrite comme impliquée dans la déamination de plusieurs ERV (Knisbacher and Levanon, 2016; Koito and Ikeda, 2013; Lee et al., 2008). Elle peut notamment transformer le site GGG du tryptophane en nouveau codon AGG, codon stop létal pour ERV ou inhiber les sites de liaison de facteurs de transcription

tels que Sp1 et Sp3 bloquant ainsi la transcription (Fuchs et al., 2011). En effet, Sp1 et Sp3 se lient sur des boîtes GC. La suppression de ces facteurs de transcription provoque une extinction de l'activité des ERV. Sp1 a été décrit comme étant un facteur protecteur de la méthylation de CpG et aidant au remodelage de la chromatine localement pour libérer l'ADN des nucléosomes (Fuchs et al., 2011).

Les ARN interférents (ARNi) constituent une troisième voie de régulation des éléments transposables. Cette voie est décrite dans la partie ARN interférents de ce document.

1.3.2 Les ARN interférents

La découverte des ARN interférents a modifié totalement la vision du monde scientifique face à la régulation de l'expression des gènes. Avant, le dogme en biologie stipulait qu'un gène ou une séquence d'ADN était régulé au niveau de son promoteur et de ses séquences régulatrices par des phénomènes épigénétiques. Ce dogme est vrai mais on sait aujourd'hui qu'il existe un niveau supérieur de régulation épigénétique avec les ARN interférents (ARNi).

Les ARNi sont des petits ARN dits non codants car ils ne codent pas pour une protéine. Ils restent sous forme d'ARN qui est leur forme active. Transcrits à partir du génome, leur rôle est dédié à la reconnaissance par homologie de séquences, d'autres séquences d'ARN codantes ou non codantes. Ces petits ARNi guident les protéines de la famille des argonautes ou des complexes protéiques similaires à trouver leurs ARN cibles pour les couper ou les détruire. De cette manière, ils possèdent la capacité de réguler de très nombreux mécanismes tels que l'expression de gènes codants, la protection du génome face aux ARN viraux exogènes ou face à la prolifération des éléments transposables et au maintien d'un état condensé de la chromatine.

La découverte par Andrew Fire et Graig Mello de l'extinction de l'expression des gènes par des ARN interférents double brins a été une avancée telle dans la compréhension des mécanismes biologiques qu'elle a été récompensée en 2006 par le prix Nobel.

I.3.2.1 Les différents types d'ARN interférents

Il existe trois classes de petits ARN non codants : les petits ARN interférents (siARN, Small Interfering RNAs), les microARN (miARN) et les petits ARN interagissant avec PIWI (piARN).

- **Les miARN** sont des ARN possédant une taille comprise entre 19 et 25 nucléotides. Leurs séquences sont détectées tout le long du génome (Shomron and Levy, 2009). Le précurseur de miARN est transcrit par l'ARN polymérase II sous le contrôle du promoteur du gène hôte (miARN intronique) ou à partir de son propre promoteur. Il forme un grand ARN composé de plusieurs tige-boucles. Ces dernières tige-boucles sont libérées les unes des autres lors du premier découpage du grand ARN précurseur dans le noyau. Les miARN tige-boucles sont alors exportés vers le cytoplasme pour être une nouvelle fois coupés par l'endoribonucléase Dicer générant ainsi le miARN mature simple brin (McIver et al., 2012). Ce dernier forme avec les protéines AGO, le complexe miRISC (miRNA – Induced silencing complex) actif qui interagit avec l'ARNm entre la partie 3'UTR et la queue poly-A pour la dégrader (Wakiyama et al., 2007). De ce fait, leur rôle est essentiellement de réguler l'expression des gènes codants. Ils ont été retrouvés dans de nombreux tissus dont les testicules. Leur rôle exact dans le processus de spermatogenèse reste à élucider. Néanmoins, ils semblent impliqués dans des phénomènes de mémoire inter-générationnelle (Grandjean et al., 2015; Kiani et al., 2013)

- **Les siARN** sont des petits ARN de 21 à 23 nt. Ils sont transcrits par l'ARN polymérase II à partir soit de séquences répétées inversées, soit d'une séquence transcrite dans les deux sens afin de former un siARN immature double brins en tête d'épingle. Ces siARN sont exportés comme les précurseurs de miARN du noyau vers le cytoplasme afin de subir un découpage adéquat par Dicer pour devenir un siARN mature. Ce dernier viendra s'incorporer au complexe siRISC (siRNA –Induced Silencing Complex) (Watanabe et al., 2008). Les siARN ont été décrits dans les cellules souches embryonnaires, les ovocytes ainsi que dans les cellules germinales mâles (Babiarz et al., 2008; Song et al., 2011; Watanabe et al., 2008). Les mécanismes sous-jacents qui modulent l'expression fine des siARN, restent encore très mal compris dans le contexte de la spermatogenèse.

- **Les piARN** sont des ARN légèrement plus grands que les siARN et miARN car ils sont compris entre 24 et 34 nucléotides (Saxe and Lin, 2011). Contrairement aux siARN et miARN dont l'ARN précurseur est double brins, les précurseurs des piARN sont simple brin induisant de fait une maturation différente. Ils ont été découverts en 2001 chez la Drosophile (Aravin et al., 2001). Depuis, leur présence a été décelée chez les poissons, les mouches et les mammifères montrant une conservation durant l'évolution. De manière surprenante, leur expression est uniquement détectée dans les lignées de cellules germinales mâles et femelles. La quantité de piARN est particulièrement impressionnante. Selon la base de données piRNAbank, 40 000 piARN ont été identifiés chez la souris contre quelques centaines pour les miARN.

Concrètement, les piARN ont la particularité de s'associer avec les protéines de la famille PIWI pour dégrader des ARN cibles avec lesquels ils possèdent des séquences pouvant s'apparier. L'étude de ces séquences a mis en évidence que les piARN s'apparient majoritairement avec les éléments transposables (ET) (Aravin et al., 2003). De plus, il sont des acteurs épigénétiques essentiels par méthylation de l'ADN, pour le maintien sous une forme répressive forte des rétrotransposons (Aravin et al., 2006; Siomi et al., 2011; Vagin et al., 2006). De fait, le complexe nucléoprotéique PIWI-piARN est considéré comme le garant de l'intégrité génétique du génome mâle face à la prolifération des éléments transposables.

I.3.2.2 L'organisation des piARN dans le génome

Les informations obtenues grâce à la cartographie du génome indiquent que les piARN ne sont pas dispersés dans le génome mais au contraire regroupés par paquets nommés clusters dont la taille est de plusieurs centaines de kb. D'après les données issues du piRNAbank, chez la souris, on dénombre un peu plus de 40 000 piARN répartis en plus de 200 clusters (Li et al., 2013b). On retrouve des clusters sur tous les chromosomes chez l'humain comme chez la souris. Chez la souris, ils sont localisés majoritairement sur l'euchromatine (Aravin et al., 2006; Girard et al., 2006; Lau et al., 2006).

L'expression ou non des clusters de piARN est un phénomène dynamique extrêmement bien contrôlé. Il conduit à une activation ou à une extinction de clusters spécifiques ou de groupes de cluster (Figure 36). Durant les différentes grandes étapes de la

spermatogenèse, ce phénomène a été observé. Il a permis de faire ressortir trois schémas différentiels d'expressions de piARN classés par stade :

- **Le stade « Pré-pachytène »** : Ce stade compte 84 clusters dont les séquences en piARN sont riches en séquences d'éléments transposables (environ 40%). Une plus faible quantité, environ 20% sont des piARN de séquences géniques. Ils sont fortement exprimés dans les phases très précoces de la spermatogenèse avec un pic 8 jours après la naissance (Stade spermatogonies). Au stade leptotène/zygotène, leur expression chute significativement mais reste néanmoins détectable jusqu'en pachytène. Il semble de plus en plus admis que ces clusters resteraient transcrits et maturés dans les pachytènes et en méiose (Li et al., 2013b).

- **Le stade « pachytène »** : On dénombre 100 clusters à ce stade. La grande majorité des clusters sont localisés sur des séquences intergéniques (93/100). Les transcrits sont détectés 10,5 jours après la naissance (stade leptotène) et augment de manière exponentielle jusqu'à obtenir un pic à 17,5 jours après la naissance (pachytène tardif/diplotène). Entre ces deux stades leptotène et pachytène tardif, la quantité de piARN pachytène augmente de 116 fois. De plus, ils représentent 95% des piARN total dans les testicules de souris adultes. Ceci est directement lié au grand nombre de cellules au stade pachytène dans les testicules de souris adultes. Les séquences cibles des piARN pachytène sont pour 70% des séquences intergéniques non annotées, 19% des ET et 14% des gènes codants (Li et al., 2013b).

- **Le stade « hybride »** : Il est composé de 30 clusters de piARN qui ont la particularité d'être exprimés dans les deux stades pré-pachytène et pachytène. Ils ont été retrouvés dans les spermatogonies et dans les pachytènes avec une augmentation d'un facteur 20 entre ces deux stades. On remarque également que leurs expressions augmentent au même titre que les piARN pachytènes, d'un facteur 10 à la fin du stade pachytène (entre 14.5 et 17.5 jours après la naissance) (Gan et al., 2011; Modzelewski et al., 2012).

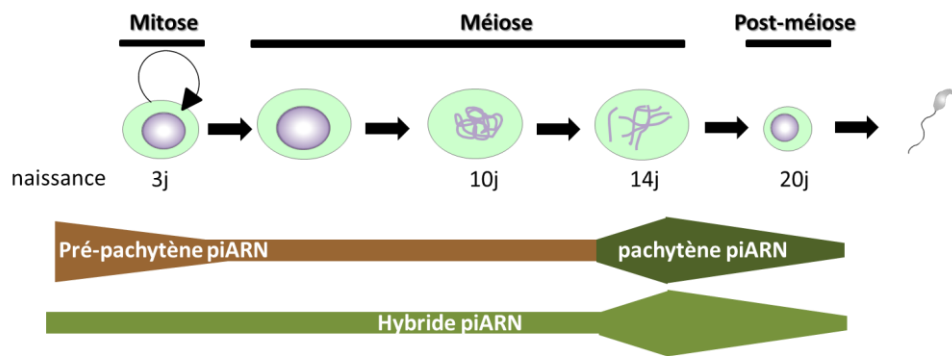


Figure 36: Répartition des piARN durant la spermatogenèse. Les piARN pré-pachytène apparaissent au stade de l'auto-renouvellement par mitose des spermatogonies. Leurs expressions diminuent à l'entrée en méiose et perdurent à une faible quantité jusqu'au stade pachytène. À ce stade, les piARN pachytènes sont fortement transcrits comme les piARN hybrides. Ces derniers sont nommés hybrides car on les retrouve exprimés avant et pendant la méiose.

Ces données laissent supposer une régulation fine des piARN durant le processus de spermatogenèse avec une accumulation de piARN durant le stade pachytène sans que l'on sache aujourd'hui pourquoi.

I.3.2.3 Organisation génomique des clusters de piARN

L'organisation génomique des clusters de piARN commence à être de mieux en mieux caractérisée même s'il reste encore de nombreuses zones d'ombre. Nous savons aujourd'hui que les clusters sont transcrits par l'ARN polymérase II. Les analyses génomiques couplées à des techniques de RNA-Seq ont mis en évidence une disparité dans la structure génomique des clusters de piARN. Cette différence se situe dans la position du promoteur par rapport au cluster :

- Soit le promoteur est à l'extrémité du cluster : la transcription est dite unidirectionnelle. C'est notamment le cas pour les clusters de piARN pré-pachytène et certains clusters dit pachytènes.
- Soit le promoteur est positionné dans le cluster de piARN : on parle alors de transcription bidirectionnelle car la transcription de l'ARN polymérase II part dans les deux sens (Li et al., 2013b). C'est le cas de nombreux clusters pachytènes.

I.3.2.4 La régulation des clusters de piARN

La régulation de l'expression des clusters reste peu connue. Les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis ces dernières années de mettre en évidence l'enrichissement de la marque épigénétique H3K4me3 (Li et al., 2013b) sur les promoteurs uni et bi-directionnels en pré-pachytène et pachytène (Figure 37). H3K4me3 est une marque caractéristique des promoteurs de gènes actifs. En 2013, l'équipe de Philippe Zamore a montré que le facteur de transcription A-MYB, responsable de la progression du cycle cellulaire de la méiose dans la spermatogenèse, était aussi un régulateur principal dans la régulation de la biogénèse des piARN en pachytène (Bolcun-Filas et al., 2011; Trauth et al., 1994). L'expression de l'ARNm de A-MYB suit l'expression des piARN pachytènes au cours de la spermatogenèse. Ce facteur agit non seulement au niveau des promoteurs des clusters de piARN mais aussi sur les promoteurs des partenaires des piARN tels que PIWIL1, TDRD1 et TDRD3 créant ainsi un environnement favorable à une amplification extrêmement importante de la quantité des piARN en pachytène pouvant augmenter en 5 jours de plus de 6000 fois (entre début et la fin du stade pachytène). Le site de reconnaissance de A-MYB est d'ailleurs retrouvé dans les promoteurs des clusters de piARN de pachytène (Li et al., 2013b) (Figure 37).

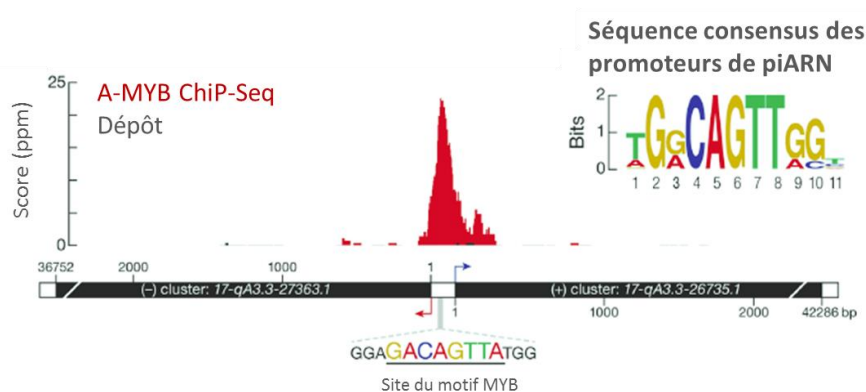


Figure 37: Représentation de la séquence régulatrice du promoteur des piARN pachytènes. Graphique représentant l'enrichissement en nucléotides dans une séquence consensus retrouvée dans les promoteurs de piARN de pachytène (en haut à droite) et du motif reconnu par A-MYB d'après un PROBE (en bas). On observe en rouge l'enrichissement de A-MYB par ChIP-Seq sur le promoteur des piARN pachytènes et du motif consensus A-MYB au niveau du promoteur bi-directionnel q A3.3 du chromosome 17. (D'après Li et al., 2013b) (ppm : part par million).

Malgré ces données, il reste encore beaucoup à faire si l'on veut comprendre le fonctionnement de la régulation des différents clusters de piARN.

I.3.2.5 Les partenaires des piARN

Les argonautes sont des partenaires essentiels de la biogénèse des ARNi. Leur structure est hautement conservée durant l'évolution entre les procaryotes et les eucaryotes (Swarts et al., 2014). Il existe deux familles, les Argonautes et les PIWI. Leur différence se situe essentiellement dans leurs localisations. En effet, la famille des Argonautes possède une localisation ubiquitaire contrairement à la famille des PIWI qui est spécifique des cellules germinales. De plus, ces deux familles ne se lient pas aux mêmes ARNi. Les Argonautes se lient aux ARN de petite taille d'environ 21 à 24 nucléotides des siARN sens et antisens et des miARN alors que PIWI se lie à des ARN simple brin de plus grande taille (24-30 nucléotides) des piARN.

Chez la souris, la famille des PIWI est principalement exprimée dans les cellules germinales mâles. Elle est subdivisée en trois sous-classes : MIWI (mouse PIWI ou PIWIL1), MIWI2 (PIWIL4) et MILI (PIWIL2) (Figure 38).

MIWI2 est la seule des protéines PIWI à être localisée dans le noyau. Elle possède la particularité d'être exprimée uniquement en début de spermatogenèse. Sa suppression provoque également la stérilité des souris mâles par un arrêt très précoce de la spermatogenèse avant le stade pachytène (Carmell et al., 2007).

MILI est exprimé dans les cellules souches puis disparaît au stade pré-leptotène, leptotène et zygotène. Son expression réapparaît progressivement pendant le stade pachytène avec un pic d'expression pachytène tardif puis reste fortement présent jusqu'aux stades 5 et 6 de la spermiogenèse (Di Giacomo et al., 2013).

MIWI est exprimée tardivement dans la spermatogenèse au stade pachytène. Comme MILI, elle est localisée dans le cytoplasme. Son rôle dans la spermatogenèse est majeur. Ainsi l'ablation de MIWI provoque une stérilité des souris mâles par arrêt de la spermatogenèse après la méiose, au stade 4 des spermatides rondes. Comme MILI et MIWI2, MIWI est capable de se lier aux précurseurs de piARN. Il possède également la capacité de se lier avec les ARNm spermiogéniques dans les spermatides rondes. De ce fait, il a été suggéré que la liaison de MIWI avec les ARN ne serait pas séquence dépendante. Un modèle a été suggéré

selon lequel MIWI posséderait deux rôles distincts. Le premier, au stade pachytène, serait de participer à la biogénèse des piARN. Le second, en post-méiose, serait dédié à la stabilisation des ARN spermiogéniques en post-méiose (Vourekas et al., 2012).

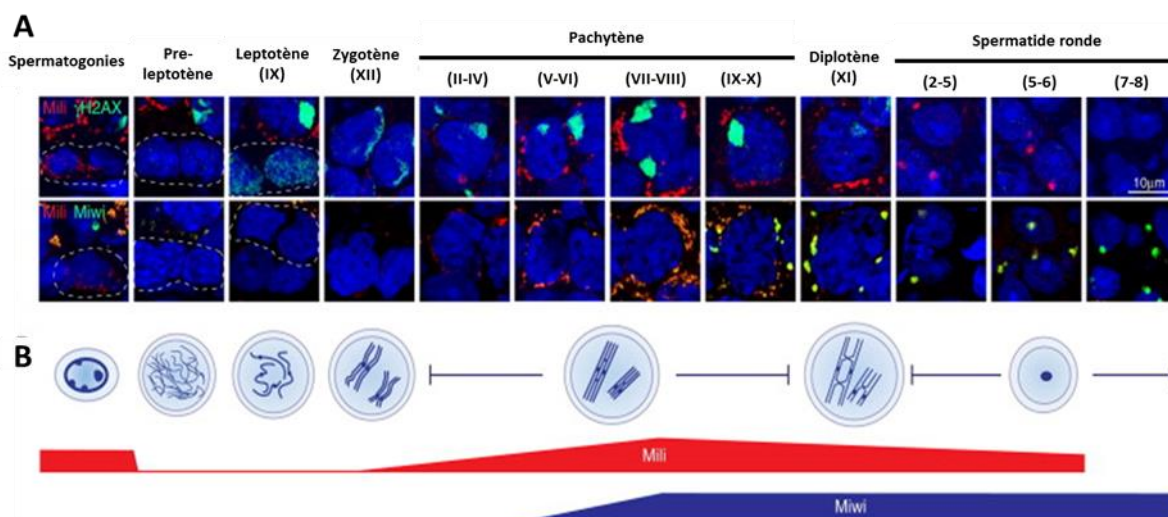


Figure 38 : Expression différentielle des protéines PIWI durant la spermatogénèse. (A) Visualisation de l'expression de MILI (en rouge) et respectivement de γ H2AX (en vert), en haut et de MIWI (en vert) en bas, par immunomarquage sur coupe de testicules. On observe la présence de MILI dans tous les types cellulaires sauf du stade pré-leptotène au stade pachytène V. MIWI n'est pas détectée dans les stades précoces de la spermatogénèse. Sa présence apparaît en début de pachytène et reste présente jusqu'en fin de spermatides rondes. (B) Représentation schématique de la présence de MILI et MIWI durant la spermatogénèse. (D'après Di Giacomo et al., 2013)

I.3.2.6 La voie des piARN et la fertilité masculine

La déficience de l'un de ces trois membres, MIWI, MILI et MIWI2, conduit irrémédiablement à une stérilité chez la souris mâle par arrêt de la spermatogénèse. Il peut subvenir à différents stades : précoces, en début de méiose, en l'absence de MILI ou de MIWI2 et plus tardifs, en spermatides rondes, dans le cas de MIWI (Carmell et al., 2007; Deng and Lin, 2002; Kuramochi-Miyagawa, 2004). Ces mutations sont associées à une levée de la répression des rétrotransposons LINE et des rétrotransposons à LTR. Il est intéressant de noter que la stérilité touche uniquement les souris de sexe masculin. En effet, les femelles restent fertiles malgré l'éviction de l'une ou l'autre de ces protéines.

Durant la spermatogenèse les protéines de la famille PIWI s'associent aux protéines de la famille TUDOR chez la souris. Au stade pachytène, TDRD1, TDRD5 et TDRD6 sont co-localisés notamment avec MIWI dans une structure péri-nucléaire nommée le corps chromatoïde. TDRD6 se lie à MIWI (Vagin et al., 2006; Vasileva et al., 2009) et TDRD1 à MILI. Les protéines TUDOR possèdent un rôle essentiel dans la spermatogenèse. En effet, lorsque l'on supprime TDRD5 et TDRD6 chez la souris cela provoque un arrêt au stade spermatide ronde comme en l'absence de MIWI. En revanche, la mutation de TDRD1 engendre un arrêt plus précoce par blocage de la spermatogenèse avant le stade des spermatides rondes (Chuma et al., 2006). Ainsi, la régulation de la spermatogenèse par la voie des piARN est un processus complexe faisant intervenir une cascade de protéines dont TUDOR et PIWI.

I.3.2.7 La biogenèse des piARN

En fonction de leur origine les piARN ne suivent pas le même mode de production. On distingue la biogénèse primaire de la biogénèse secondaire nommée « ping pong » (Figure 39). Ces deux modes de formation des piARN sont différents de celui des miARN car il est indépendant de la machinerie Dicer (Chuma and Nakano, 2013; Vagin et al., 2006). On sait aujourd'hui que les clusters de piARN sont transcrits par l'ARN polymérase II dans le noyau. Le grand fragment d'ARN dit « précurseur » issu d'un cluster contient de nombreux futurs piARN disposés les uns derrières les autres. Les modes de prise en charge et de maturation des piARN sont encore mal compris. De ce fait, plusieurs modèles ont été avancés pour tenter de clarifier le déroulement de ces processus.

Le modèle proposé par Gregory Hannon et Benjamin Czech en 2016 suggère pour la biogénèse primaire que le grand précurseur est exporté du noyau vers le cytoplasme dans une structure multiprotéique péri-nucléaire nommée « nuage » ou corps chromatoïde (Czech and Hannon, 2016). Cette structure est riche en mitochondries et en partenaires de la maturation des piARN tels que MILI, MIWI2, TDRD1, TDRD9 et MAEL (Maelstrom). Il est composée de granules nommées pi-corps (Watanabe et al., 2011)(Zhang et al., 2012, 2014). La première maturation par épissage s'effectue dans le pi-corps et donne naissance à un ARN tronqué nommé ARN intermédiaire. Les protéines Zucchini ainsi que ses cofacteurs seraient non seulement responsables de ce premier épissage mais aussi de l'ajout à extrémité 5' uracile. Ce processus requière la présence de nombreuses protéines issues de la mitochondrie telles que

Vreteno, Minotaur, Gasz. Il a été suggéré que l'ARN intermédiaire soit pris en charge par les protéines PIWI (Vourekas et al., 2015). Les PIWI assurent la stabilisation de l'ARN intermédiaire pour la seconde maturation qui consiste à cliver l'extrémité 3' de l'ARN (Ipsaro et al., 2012; Nishimasu et al., 2012). Le précurseur piARN est *in fine* modifié par la méthyltransférase HEN1 (Nescient helix loop helix 1) qui produit à l'extrémité 3' une 2'-O-méthylation (Horwich et al., 2007; Kirino and Mourelatos, 2007; Saito et al., 2007). Cette modification protège les petits ARN de la dégradation. Le piARN ainsi formé devient mature pour assurer sa fonction de guide des protéines Argonautes vers leurs cibles.

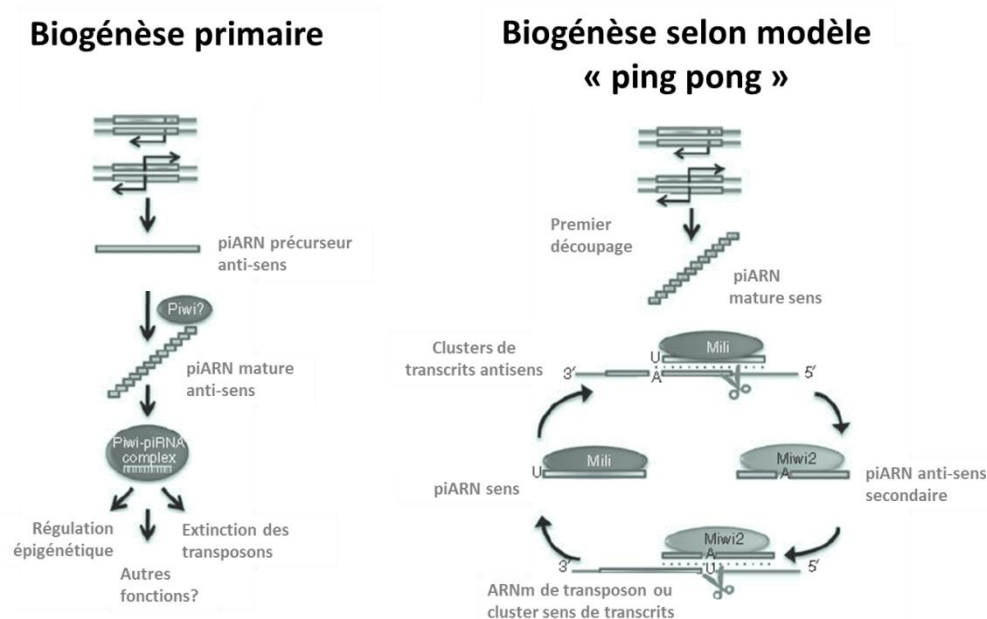


Figure 39 : Biogénèse des piARN chez la souris. Les précurseurs de piARN sont produits à partir de clusters uni ou bidirectionnelle. Dans la biogénèse primaire, après épissage et maturation, le piARN est pris en charge par PIWI. Ce complexe PIWI-piARN va jouer un rôle de régulateur épigénétique, de mise sous silence des éléments transposables et probablement d'autres activités non connues à ce jour. Les mécanismes par lesquels ce complexe agit ne sont pas encore clairement élucidés. La biogénèse secondaire nommée « ping pong » a été décrite pour les piARN pré-pachytène. Ce mode de fabrication nécessite une biogénèse primaire jusqu'à la génération de piARN (sens) mature. Le piARN (sens) mature est pris en charge par MILI dans le pi-corps. Par complémentarité de séquence, le complexe MILI-piARN (sens) vient cibler un ARN antisens, (précurseur de piARN ou d'éléments transposables) de manière spécifique pour le couper. Cette coupure a lieu 10 nucléotides après une adénine sur l'ARN cible et complémentaire avec l'uracile en 5' du piARN (Vu précédemment). L'ARN cible (antisens) devient à son tour un nouveau piARN pris en charge par MIWI2. Le complexe nucléoprotéique MIWI2-piARN antisens est capable de reconnaître un nouvel ARN sens complémentaire pour l'épisser de telle sorte à laisser un U à l'extrémité 5'. Ce dernier sera chargé sur MILI pour continuer la boucle. (D'après Saxe and Lin, 2011)

Un phénomène d'auto-amplification de production de piARN a été décrit chez la *Drosophila* et la souris. Nommé cycle « ping-pong », il a été décrit dans des cellules exprimant MIWI2. Outre la dégradation d'un ARN cible, ce processus crée simultanément un

nouveau piARN complémentaire qui à son tour amplifiera la production de piARN (Figure 39). Notons que les piARN peuvent également être pris en charge par le complexe MIWI2-TDRD9-MAEL et rentrer dans le noyau. Les auteurs suggèrent donc que ce complexe pourrait être dirigé par le piARN vers des locis de rétrotransposons méthylé afin de les rendre silencieux (Saxe and Lin, 2011).

L'ensemble des travaux et des connaissances repris dans la partie introduction de ce manuscrit ont constitué pour moi une aide précieuse sur laquelle j'ai pu me référer au cours de mes années de doctorat, pour développer au mieux l'étude du rôle épigénétique du variants d'histone H3.3 dans la fertilité masculine et plus particulièrement, la régulation de l'expression des chromosomes sexuels, des éléments transposables et des ARN interférents.

CHAPITRE II. OBJECTIFS

La composition ainsi que la structure de l'octamère d'histones permettent de modifier en profondeur la structure chromatinienne et d'en faire une entité dynamique et réactive en réponse aux besoins de la cellule. Ces modifications font partie du langage épigénétique. Elles peuvent se traduire par des modifications post-traductionnelles des histones et/ou par l'ajout d'un ou plusieurs variants d'histones à la place d'une histone canonique. L'histone canonique H3 peut être notamment remplacée par l'un de ces variants CENP-A ou H3.3 dans la chromatine. Il est communément admis que l'échange entre une histone canonique et sa forme variante peut induire une déstabilisation ou au contraire une stabilisation du nucléosome sur la fibre chromatinienne rendant ainsi plus ou moins accessible l'ADN face aux complexes protéiques actifs de transcription, de réparation....

Mon objectif général a été de déterminer le rôle biologique *in vivo* du variant d'histone H3.3.

Dans un premier temps, nous souhaitons déterminer si les variants H3.3A et H3.3B sont essentiels à la vie d'un individu et plus largement aussi à la survie de l'espèce via la reproduction. Cette question a été soulevée dans plusieurs publications ces dernières années avec des phénotypes parfois très divergents en fonction des groupes utilisant des modèles murins dépourvus en H3.3A ou H3.3B. Il apparaît que l'absence de H3.3B engendre une infertilité chez les souris mâles alors que d'autres études démontrent le contraire. Aux vues de ces données, nous avons voulu déterminer, si l'absence de H3.3A ou H3.3B induit ou non une infertilité masculine. Pour ce faire, nous avons créé de nouvelles lignées de souris transgéniques. Deux de ces lignées possèdent un marqueur HA-FLAG-FLAG associé à chaque isoforme de H3.3, elles sont nommées H3.3A^{HA} et H3.3B^{HA}. Deux autres lignées nommées H3.3A^{KO} et H3.3B^{KO} sont dépourvues de l'une ou l'autre de ces histones. L'utilisation de ces animaux transgéniques, nous permet de réinvestiguer la question du rôle de H3.3 sur l'infertilité.

Si la présence d'une infertilité est confirmée, nous souhaitons dans un second temps définir son origine. Notamment en déterminant, si elle est le résultat d'un défaut lors de

l'embryogénèse, de la fécondation ou de la formation des gamètes. Le but *in fine* réside dans l'identification de l'étape clé altérée par l'absence de H3.3. Une publication éditée pendant ma thèse indique que les souris déficientes en H3.3B sont stériles à cause d'un défaut dans l'échange entre les protamines et les histones en fin de spermatogénèse. Nous analyserons donc cette étape afin d'infirmer ou confirmer ces données.

Le but ultime serait d'identifier les mécanismes sous-jacents mis en jeu par H3.3. Pour cela, nous allons utiliser plusieurs approches pour analyser d'une part sa localisation sur le génome et d'autre part, l'impact que peut avoir H3.3 sur la transcription. Notamment pour répondre à de nombreuses questions telles que :

- Quelle est la localisation exacte de H3.3 sur le génome au cours de la spermatogénèse ?
- L'absence de H3.3 induit-il des modifications de l'expression d'un ensemble de gènes spécifiques ou d'une région particulière du génome ?
- Existe-t-il une corrélation entre sa localisation et un impact éventuel de son absence à cet endroit. Pour cela, nous déterminerons les sites de résidences de H3.3 au cours de la méiose mais aussi après cette phase, pendant la spermiogénèse. En mettant en perspectives ces données avec le statut transcriptionnel et chromatinien, nous espérons apporter de nouvelles connaissances sur le rôle épigénétique direct joué par H3.3 dans la spermatogénèse.
- H3.3 possède-t-il un rôle indirect notamment en régulant d'autres phénomènes épigénétiques important lors du processus de spermatogénèse.

La caractérisation des processus moléculaires dans lesquels H3.3A et H3.3B sont impliqués apporteront des pistes nouvelles dans deux domaines fondamentaux. Le premier réside dans la compréhension et la caractérisation de l'infertilité mâle liée à l'absence de H3.3. Ces données pourraient aussi apporter aux cliniciens des connaissances importantes sur les mécanismes moléculaires nécessaires à une spermatogénèse réussie, permettant à plus

longs termes de possibles nouvelles approches comme la spermatogenèse *in vitro* pour leurs patients masculins infertiles. Le second serait de mettre en lumière de nouveaux mécanismes de contrôle de la transcription potentiellement transférables au domaine de la cancérologie. En effet, H3.3 est impliqué dans de nombreux cancers notamment dans le glioblastome chez l'enfant ou le jeune adulte et pour lesquels aucune solution thérapeutique efficace n'a été trouvée à ce jour. Nous espérons mettre en lumière certains partenaires et/ou mécanismes qui pourraient permettre une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques mis en jeu dans ces pathologies. A terme, cela pourrait ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ce domaine.

III.1 BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

III.1.1 *Construction de lignées transgéniques*

Les souris transgéniques knock-in ont été générées à l'Institut Clinique de la Souris à Illkirch à partir de souris C57BL/6N. Deux sites LoxP ont été insérés par recombinaison homologue de telle sorte à encadrer l'exon porteur du site ATG. Concrètement, les sites LoxP sont positionnés respectivement de part et d'autre de l'exon 2 pour *H3f3a* et part et d'autre de l'exon 4 pour *H3f3b*. Deux FLAG suivi de deux séquences HA ont été également ajoutés à la suite du site d'initiation de la traduction (site ATG). Ils nous permettront de détecter spécifiquement les protéines H3.3A ou H3.3B en utilisant des anticorps anti-HA ou anti-FLAG. Ces souris sont nommées H3.3A^{HA} et H3.3B^{HA} pour les souris porteuses d'au moins un allèle LoxP-HA-FLAG-FLAG (HA). Les souris contrôles ne portent aucune modification transgénique ni sur *H3f3a*, ni sur *H3f3b* et sont nommées H3.3^{WT}.

Les souris transgéniques knock-out ont été créées à la Plateforme de Hautes Technologies Animales de Grenoble par Bertrand Favier. Concrètement, les souris porteuses d'un allèle LoxP ont été croisées avec des souris transgéniques porteuses de la CRE-recombinase sous l'action du promoteur fort et ubiquitaire de l'actine. Les souris H3.3A^{HA} actinCRE⁺ et H3.3B^{HA} actinCRE⁺ ont été injectées avec du tamoxifène. Sous l'action du tamoxifène, la CRE recombinase est exprimée et excise l'ADN génomique situé entre les sites LoxP. De ce fait, les gènes *H3f3a* et *H3f3b* perdent leur site d'initiation de la traduction ce qui a pour conséquence la perte d'expression de ces protéines. L'allèle perdu est noté KO. Les souris utilisées dans ce manuscrit sont des souris homozygotes ayant perdu leurs deux allèles *H3f3a* pour H3.3A^{KO} et *H3f3b* pour H3.3B^{KO}.

La gestion des lignées s'effectue avec l'aide du logiciel Mayakind. Les quatre lignées de souris transgéniques sont présentes sur deux animaleries : Plateforme de Hautes Technologies Animale de Grenoble et l'Animalerie de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences. (Agrément du comité d'éthique n° 436-Grenoble Institut des Neurosciences.)

III.1.2 *Extraction d'ADN génomique*

L'extraction de l'ADN génomique des lignées de souris transgéniques s'effectue à partir d'un fragment de queue. Ce fragment est digéré dans une solution de 750 µl contenant 30 µl de protéinase K à 10 mg/ml (Sigma) et 720 µl de 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl et 1% de SDS pendant une nuit à 55°C sous agitation. Après l'ajout de 250µl de NaCl 5M, l'ADN génomique est vortexé puis centrifugé 5 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant est récupéré. L'ADN génomique est ensuite précipité avec 500 µl d'isopropanol. Après agitation par retournement, les pelotes d'ADN sont culotées par centrifugation 5 minutes à 13 000 rpm à température ambiante. Le culot d'ADN est ensuite lavé à deux reprises par l'ajout de 700 µl d'éthanol 70% et la centrifugation 5 minutes à 13 000 rpm à température ambiante. Le culot est ensuite séché à l'air avant d'être repris dans 50 µl d'eau.

III.1.3 *Le génotypage*

Le génotypage est réalisé par PCR dans un tampon de 25 µl contenant 150 ng d'ADN génomique, 1X de tampon My Taq Red Mix (Bioline), 0.8 mM de chacune des amorces sens et anti-sens, 0.5 µl de Taq polymérase Bioline. Le programme de PCR comprend une étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C puis une étape d'amplification de 40 cycles de 1 minute à 95°C de dénaturation, 30 secondes à 58°C d'hybridation, de 1 minute à 72°C d'élongation suivi d'une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les fragments d'ADN ainsi amplifiés sont visualisés sur gel d'agarose à 1.2 % et colorés au bromure d'éthidium.

Gènes ciblés	Séquences des amorces sens (5' vers 3')	Séquences des amorces anti-sens (5' vers 3')	Taille des fragments et allèles
<i>H3f3a</i>	ATATCGGATTCAACTAAACATAAC	TTTGACAGACGTTTCTAATTCTACT	303 pb (HA) 177 pb (WT)
<i>H3f3b</i>	TCCTCATTCTACCACATGTTCA	TCAATCTAGGCCTAAGACCAAA	361 pb (HA) 291 pb (WT)
<i>H3f3a</i>	ATATCGGATTCAACTAAACATAAC	CAGAGACCTGCCTGCCTGCTG	465 pb (KO)
<i>H3f3b</i>	TCCTCATTCTACCACATGTTCA	CTGCCCGTTCTGCTCGCCGATT	493 pb (KO)

Tableau 1: Liste des amorces pour le génotypage.

III.1.4 Extraction d'ARN

L'extraction des ARN s'effectue selon le protocole du TRIzol (Invitrogen) à partir de cellules germinales soient isolées par dissociation à la collagénase soit par gradient de BSA. La lyse du culot cellulaire est réalisée dans 1 volume de TRIzol à 4°C. Après homogénéisation, 0,2 volume de chloroforme est ajouté. Par agitation vigoureuse les deux phases sont mélangées puis incubées 3 minutes à 4°C. L'ARN est séparé des protéines et de l'ADN par centrifugation à 12 000g à 4°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse est récupérée puis mélangée à 0,5 volume d'isopropanol 100%. Après agitation par retournement, les ARN ainsi précipités sont centrifugés à 12 000g, 10 minutes à 4°C. Le culot contenant l'ARN est ensuite lavé à deux reprises par l'ajout de 1 volume d'éthanol 75% suivi d'une centrifugation à 12 000g, 10 minutes à 4°C. À la dernière centrifugation, la totalité de l'éthanol est retiré du tube pour laisser sécher le culot d'ARN à l'air libre. Le culot est ensuite dissous pendant 15 minutes à 60°C dans 50 µl d'eau ultra-pure sans RNase. Les ARN subissent ensuite un traitement à la DNase selon le protocole du kit NucleoSpin (Macherey-Nagel). L'élution terminale des ARN se fait avec 50 µl d'eau. Les ARN sont ensuite dosés au spectrophotomètre NanoDrop et peuvent être stockés au congélateur -80°C.

III.1.5 Réverse transcription et PCR quantitative

La transcription inverse (RT) des ARN en ADNc est réalisée grâce au kit iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad). Pour chaque RT, la quantité des ARN utilisés est identique entre chacun des échantillons pour une réaction de RT-PCR. La préparation des échantillons s'effectue dans la glace. Concrètement, 4 µl du tampon iScript BioRad (contenant notamment les amorces aléatoires et des amorces dT) et la reverse transcriptase sont mélangés à 6 µl d'eau. Ce mélange est réparti à raison de 10 µl dans un puit contenant déjà 10 µl d'une solution contenant les ARN et de l'eau. Un contrôle négatif est effectué avec la même quantité d'ARN mais sans reverse transcriptase. Le programme de rétrotranscription débute par une incubation 5 minutes à 25°C pour l'hybridation suivi de 20 minutes à 46°C de reverse transcription et enfin 1 minute à 95°C d'inactivation. La réaction s'effectue dans le thermocycleur Eppendorf Master Cycler Nexus Gradient. La solution de RT est diluée au 1/25 dans de l'eau avant d'être utilisée à raison de 5 µl par point de PCR quantitative.

La PCR quantitative est réalisée avec du SuperMix Sybr Green iTaq Universal (BioRad) dans le thermocycleur BioRad C1000 Touch Thermal Cycler. Le mélange de la PCR quantitative se compose de 5 µl de solution contenant l'ARN auquel est ajouté 15 µl d'un mélange de 0,2 µM de chacune des amorces spécifiques (sens et anti-sens) et 10 µl de iTaq DNA Polymérase du kit BioRad. Le programme choisi comporte une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes suivi d'une étape d'amplification de 40 cycles composés d'une dénaturation à 95°C pendant 5 secondes et d'une étape d'hybridation/élongation à 60°C pendant 30 secondes. L'étape terminale est une remontée progressive en température de 65 °C à 95°C avec des paliers de 0,5°C pendant 5 secondes.

Le gène de référence utilisé afin d'étudier l'expression relative des gènes est le gène *Rer1* (retention in endoplasmic reticulum 1 protein) (Thomas et al., 2014). Ce gène de ménage utilisé comme contrôle interne a été préalablement testé afin de vérifier sa stabilité face aux conditions de l'expérience. La liste des amorces est donnée dans le Tableau 2. Chaque échantillon est testé à minima en duplicat avec un contrôle négatif fait en remplaçant l'ARN par de l'eau pour chaque couple d'amorces. Les RT négatives sont également analysées pour valider la qualité de la réaction de reverse transcription. Chaque couple d'amorces utilisé dans cette étude a fait l'objet d'un test d'efficacité qui consiste à réaliser une PCR quantitative en duplicat sur 5 dilutions au 1/10 de la quantité d'ADNc afin de valider leur stabilité en fonction de la concentration en ADNc.

Gènes ciblés	Séquences des amorces sens (5' vers 3')	Séquences des amorces anti-sens (5' vers 3')
<i>Rer1</i>	GCCTTGGAATTTACCACCT	CTTCGAATGAAGGGACGAAA
<i>H3f3a</i>	ACAAAAGCCGCTCGCAAGAG	ATTTCTCGCACCAGACGCTG
<i>H3f3b</i>	TGGCTCTGAGAGAGATCCGTCGTT	GGATGTCTTTGGGCATGATGGTGAC
<i>Protamine 1(Prm1)</i>	ATGCTGCCGCAGCAAAAGCA	CACCTTATGGTGTATGAGCG
<i>Protamine 2 (Prm2)</i>	ATGGTTCGCTACCGAATGAG	TTAGTGATGGTGCCTCTAC
<i>Protéine de Transfert 1 (Tnp1)</i>	ATGTCGACCAGCCGCAAGCT	TCACAAGTGGGATCGGTAAT

Tableau 2 : Amorces pour la RT-qPCR.

Chaque gène de cette étude analysé en RTqPCR a été testé huit fois en qPCR à partir de deux réactions de RT sur à minima 3 souris de même génotype.

III.1.6 Séquençage de l'ARN (RNA-Seq)

La technique de RNA-Seq est réalisée à partir de cellules germinales en méiose (pachytènes) et en post-méiose (spermatozoïdes ronds) séparées par gradient de BSA à 4°C. L'ARN des cellules est extrait selon le protocole décrit dans extraction d'ARN (au Trizol). Les échantillons sont repris dans 50 µl d'eau ultra-pure exempte de RNase puis dosés par nanodrop. Chaque point de RNA-Seq est composé du mélange de trois souris de même génotype. Concrètement, 5 souris sauvages H3.3^{WT} et 5 souris H3.3B^{KO} ont été euthanasiées pour cette manipulation. Par point, 5 testicules ont été mélangés de telle sorte que dans un point, on retrouve 4 testicules issus de 2 souris plus 1 testicule d'une troisième souris de même génotype. *In fine*, 8 échantillons ont été analysés en RNA-Seq : 2 contenant des cellules en méiose issus de H3.3^{WT} et 2 échantillons issus de H3.3B^{KO} puis 2 contenant des cellules en post-méiose issus de H3.3^{WT} et 2 échantillons issus de H3.3B^{KO}. Les ARN sont ensuite envoyés à l'IGBMC à l'équipe de Ali Hamiche pour être analysés par RNA-Seq sur la plateforme GenomEast.

III.2 TECHNIQUES IN SITU

III.2.1 Isolation de cellules germinales du tubule séminifère

Les cellules germinales sont isolées à partir de testicules obtenus sur des souris mâles de plus de 3 mois afin d'être matures sexuellement. Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale puis les testicules sont extraits. Après dissection de la membrane albuginée, les tubules séminifères sont libérés et placés 10 minutes dans une solution de 5 ml contenant du PBS 1X avec 1 mg/ml de collagénase (Sigma) à 35°C. Pour aider à la séparation des tubules séminifères, il est important d'agiter le tube régulièrement. Lorsque les tubes sont dissociés les uns des autres, il faut les laver à trois reprises par l'ajout de 20 ml d'une solution de DMEM (Invitrogen) avec 0,5% de BSA (Euromedex) et 10 mM de sodium butyrate (Sigma) à 4°C. Toute la suite de cette expérience se déroulera dans la glace. Par sédimentation, les tubules séminifères contenant les cellules germinales, tombent au fond du tube. Le surnageant contenant les cellules interstitielles, est prélevé et jeté. Cette étape d'isolation des tubules séminifères est répétée à 3 reprises. Lors du dernier lavage, conserver

2 ml de surnageant dans lequel les cellules contenues dans le tubule séminifère seront libérées et homogénéisées dans le milieu par pipetage avec une pipette p1000.

En fonction des manipulations futures à appliquer sur ces cellules le traitement sera différent. Pour visualiser les cellules germinales dissociées par immunomarquage, les cellules sont fixées 2 heures dans du formalin (Sigma) à température ambiante puis conservées à 4°C dans du PBS 1X. Les cellules qui subiront une sédimentation par gradient de sucrose seront filtrées (cf : protocole Gradient de BSA).

III.2.2 Isolation des spermatozoïdes

Dans le cas de l'étude des spermatozoïdes, les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Par dissection, la queue de l'épididyme est extraite et placée dans une boîte de pétrie de 35 mm contenant 2 ml de milieu M2 (Thermo Fisher Scientific) à 37°C. Sous loupe, la queue de l'épididyme est disséquée avec l'aide de deux aiguilles de telle sorte à permettre la libération des spermatozoïdes (Barral et al., 2017). Après 30 minutes d'incubation dans une étuve, le milieu M2 contenant les spermatozoïdes est prélevé.

III.2.3 Inclusion en paraffine, coupe histologiques et coloration à l'hématoxyline éosine

Les colorations histologiques à l'hématoxyline-éosine sont effectuées sur des coupes de testicules et d'épididymes prélevés sur des animaux euthanasiés par dislocation cervicale. Après dissection, les tissus sont fixés 1 nuit à 4°C au formalin 10% (Sigma) avant d'être inclus en paraffine. Les blocs de paraffine sont coupés au microtome (par tranche de 10 µm d'épaisseur). Les coupes ainsi formées sont placées sur des lames super frost-gold plus (Dustcher). Chaque coupe est séchée une nuit à 37°C. Avant d'être utilisées, les coupes subissent un traitement de déparaffinage et de réhydratation qui consiste à placer les lames dans plusieurs bains successifs d'écrits ci-après. Le premier bain de déparaffinage est composé de toluène. Les coupes sont incubées 10 minutes dans ce bain avant d'être incubées 10 minutes dans un bain d'éthanol 100%. Afin de réhydrater les coupes de tissus, une succession d'incubations de 10 minutes dans des bains décroissants en éthanol (90%, 80%, 50%) est effectuée. *In fine*, la réhydratation est terminée par une incubation de 10 minutes

dans du PBS 1X. Les coupes sont ensuite colorées à l'hématoxyline de Gill (Sigma) pendant 3 minutes puis lavées avec de l'eau et enfin incubées 5 minutes dans l'éosine (Sigma). Plusieurs bains de lavage à l'eau sont réalisés avant de monter les lames avec une solution de 90% de glycérol et 10% de PBS 1X. Les coupes sont visualisées avec le microscope Axio Scan.Z1 de Zeiss à l'objectif x40 apochromatique

III.2.4 Immunofluorescence et comptage cellulaire

Les marquages par immunofluorescence ont été effectués soit sur cellules dissociées (cf Isolation de cellules germinales du tubule séminifère) soit sur coupe de tissus inclus en paraffine. Dans tous les cas, les cellules ont été préalablement fixées au formol 10%. Dans le cas de cellules dissociées, les cellules sont déposées sur une lame puis séchées à l'air avant le début des marquages. Dans le cas de coupes de tissus, un déparaffinage suivi d'une réhydratation sont nécessaires avant de débiter le protocole d'immunomarquage (cf Coloration à l'hématoxyline éosine).

Les lames sont placées dans une solution de 10 mM de citrate de sodium (Sigma) pH 6 et de 0,05% de Tween 20 (Carlo Erba). La solution est chauffée progressivement de telle sorte à atteindre un plateau à 95°C pendant 40 minutes. Après une redescende lente en température, les lames sont transférées dans une solution de perméabilisation de PBS 1X contenant 0.1% de Triton-X pendant 30 minutes. L'étape suivante est de saturer les sites non spécifiques en incubant les lames 1 heure dans une solution de PBS 1X contenant 5% de lait. Après lavage des lames dans du PBS, l'anticorps primaire peut être ajouté dans une solution de PBS 1X contenant 1% de lait pendant 1 heure à 37°C (tableau : 3). Après 30 minutes de lavages au PBS, les échantillons sont incubés avec l'anticorps secondaire dans du PBS 1X, 1% de sérum de veau fœtale (Invitrogen) pendant 30 minutes à température ambiante. Un dernier lavage au PBS est réalisé ainsi que le marquage pendant 5 minutes de l'ADN par une solution de Hoechst 33342 à 0,5 µg/ml (Invitrogen) avant le montage final dans du mounting medium (DAKO). Pendant les incubations avec les solutions d'anticorps, les lames sont placées dans une chambre humide.

Cible	Référence	Dilution IF	Dilution WB
HA	Abcam ab9110	1/250	1/2500
HA	Roche 1867423	1/800	
H3	Millipore 05-928	1/200	1/5000
H3.3	Millipore 09-838	1/100	1/2000
H3K9me3	Abcam ab8898	1/600	
H4	Abcam ab10158	1/200	
Lectine PNA alexa 568	Life Science L32458	1/500	
CD9	BD pharmagen 553758	1/100	
Scp1	Abcam ab15087	1/100	
Scp3	Santa Cruz sc-20845	1/100	
Sox9	Sigma HPA001758	1/200	
γ H2AX	Abcam ab81299	1/500	

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires.

Cible	Référence	dilution
Anti-chèvre Cynanine 3	Jackson 705-165-147	1/300
Anti-lapin Cynanine 2	Jackson 111-225-144	1/300
Anti-lapin Cynanine 3	Jackson 111-165-144	1/300
Anti-rat Cynanine 3	Jackson 112-165-003	1/300
Anti-lapin HRP	Abcam ab6741	1/5000

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires.

Les échantillons marqués par HA, H3K9me3, γ H2AX, H3 et H4 sont visualisés avec le microscope Zeiss Axio-Imager Z1 avec le module apotome à l'objectif plan apochromat x63 DIC à huile.

III.2.5 Identification des cellules mitotiques, méiotiques et post-méiotiques

Les comptages cellulaires s'effectuent à partir de cellules germinales isolées, fixées au formol 4% pendant 1 nuit avant d'être stockées dans du PBS 1X à 4°C. Les cellules germinales sont déposées puis séchées sur lame à température ambiante. Les échantillons sont placés 1 heure dans un bain de 10% de SVF pour bloquer les sites non spécifiques. Après lavage 5 minutes dans du PBS 1X, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps CD9 pendant 1 heure à 37°C dans 1% de SVF. Les cellules sont ensuite lavées 30 minutes dans du PBS 1X. L'anticorps secondaire anti-rat est placé en contact des cellules pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de PBS à 1% de lait. Après lavages au PBS 1X, les cellules sont contre-colorées au Hoechst 33342. Les lames sont montées dans du milieu de montage (DAKO). Les cellules sont analysées par le microscope à fluorescence Zeiss Axio-Imager Z1 avec un objectif plan apochromat x63 DIC à huile.

Les cellules mitotiques sont identifiées comme étant positives au marquage par l'anticorps CD9 (Kanatsu-Shinohara et al., 2004) et présentant un noyau de petite taille exempt d'hétérochromatine visible. Les cellules mitotiques présentent également la particularité d'être regroupées en grappe. Les cellules méiotiques sont à l'inverse définies comme exemptes de marquage CD9. Elles possèdent un noyau de très grande taille où plusieurs zones d'hétérochromatines sont visibles grâce à la coloration au Hoechst 33342 (Mahadevaiah et al., 2001; Turner et al., 2005). Dans ce manuscrit, nous nommons cellules post-méiotiques, les spermatides rondes uniquement. Elles sont caractérisées par leur taille intermédiaire par rapport aux cellules mitotiques (petites) et méiotiques (grande) et la forme ronde de leur noyau. Au centre de ce noyau, on observe une zone typique, ronde et centrale d'hétérochromatine, quelques fois accompagnée d'une petite zone d'hétérochromatine périphérique visible par coloration au Hoechst 33342. Les spermatides rondes ne présentent pas de marquage CD9.

III.2.6 Détermination des stades des tubules séminifères

La détermination du stade dans lequel se trouvent les tubules séminifères de souris a été réalisée comme décrit (Ahmed and de Rooij, 2009; Hess and Renato de Franca, 2008; Lin et al., 2016; Meistrich and Hess, 2013; Yuen et al., 2014) en utilisant la coloration acrosomique

lectine PNA et le marquage de l'ADN au Hoechst comme guide. Le stade I a été caractérisé par la présence de deux générations de spermatides (rondes et allongées) et l'absence de granules acrosomaux dans les spermatides rondes. Les stades II-III ont été déterminés par la présence de deux générations de spermatides (allongée et ronde) associées à la présence d'un granule acrosomal petit et rond dans les spermatides rondes. Les stades IV-V ont été définis par la présence de deux générations de spermatides avec des spermatides rondes contenant un granule acrosomal imposant et légèrement aplati. Les étapes VI-VIII ont été identifiées par deux générations de spermatides dont les spermatides rondes présentent des acrosomes couvrant un à deux tiers de la spermatide arrondie. L'étape IX a été définie comme le moment où les spermatides rondes du stade VIII commencent à s'allonger et à perdre leur forme ronde, avec une seule génération de spermatides présentes. Le stade X a été caractérisé par l'allongement, les spermatides deviennent bilatéralement aplaties, avec seulement une génération de spermatides présentes. L'étape XI et l'étape XII a été caractérisée par une seule génération de spermatides allongées. Ces deux étapes se distinguent l'une de l'autre par la présence d'évènements méiotiques retrouvés à l'étape XII mais pas à l'étape XI.

III.2.7 Test apoptotique

Les tests apoptotiques ont été réalisés sur coupe d'organe incluse en paraffine et sur des spermatozoïdes extraits de l'épididyme avec la méthode dite du TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick end Labeling). Au préalable, les coupes d'organe en paraffine doivent être déparaffinées et réhydratées avant le début du protocole (Cf : paragraphe « Inclusion en paraffine, coupes histologiques et coloration à l'hématoxyline éosine ». Pour leur part, les spermatozoïdes sont récupérés de l'épididyme comme indiqué précédemment puis lavés trois fois au PBS 1X avant d'être centrifugés 5 minutes à température ambiante à 500 g. Les spermatozoïdes sont ensuite fixés dans un mélange 1/3 d'acide acétique et 2/3 de méthanol avant d'être incubés 30 minutes à 4°C. Les spermatozoïdes sont enfin déposés sur des lames puis séchés à l'air une nuit sous sorbonne avant que le protocole d'apoptose soit réalisé.

Le test apoptotique utilisé suit scrupuleusement celui du kit TUNEL (Sigma). Les échantillons sont lavés 10 minutes dans du PBS 1X. Les lames sont placées dans une chambre humide. Chaque échantillon est incubé 30 minutes à 37°C dans un tampon de dégradation des protéines contenant 20 µg/ml de protéinase K (exempt en nucléase) dans 10 mM de Tris-HCl

pH : 7,5. Après un lavage de 10 minutes dans du PBS 1X, l'échantillon servant de contrôle positif est placé 10 minutes à 37°C dans une solution de dégradation de l'ADN contenant 2 ng de DNase I (promega) dans 50 mM de Tris-HCl à pH : 7,5. Après lavage au PBS 1X, tous les échantillons sont incubés 60 minutes à 37°C dans le noir en chambre humide avec une solution composée de 50 µl de solution 1 (contenant l'enzyme terminale déoxynucléotidyltransférase) et 450µl de solution 2 du kit (contenant des nucléotides dUTP marqués à la fluorescéine). Les lames sont lavées 10 minutes dans du PBS 1X avant d'être contre-colorées dans une solution de Hoechst à 0,5 mg/ml (Invitrogen). Après un dernier lavage dans du PBS 1X les lames sont montées avec du mounting medium (DAKO).

Les images sont acquises sur coupe de tissus par le microscope Axio Scan.z1 à l'objectif x40. La quantification est réalisée avec l'aide du logiciel Zen Office 2.3 lite. Dans le cas des spermatozoïdes, le comptage est réalisé avec le microscope Zeiss Axio-Imager 2 à l'objectif x63 plan apochromat DIC à bain d'huile.

III.2.8 Gradient de BSA : Isolations de cellules en méiose et post-méiose

Préparation de la suspension cellulaire et de la sédimentation :

La séparation des cellules germinales méiotiques et post méiotiques est réalisée par sédimentation sur gradient linéaire de BSA (Bellvé, 1993; Buchou et al., 2017). Après euthanasie de trois souris adultes (de 3 à 6 mois), les testicules sont prélevés. Les albuginées sont retirées par dissection. Les tubules séminifères sont séparés par une incubation pendant 10 minutes à 35°C dans du PBS 1X additionné avec 1 mg/ml de collagénase (Sigma). La totalité de la suite de cette expérimentation se déroulera à 4°C en présence de 10 mM de sodium butyrate (Sigma), un inhibiteur d'histone déacétylase. Les tubules séminifères sont ensuite lavés à 3 reprises par l'ajout de 20 ml de DMEM (Invitrogen) composés de 0,5% de BSA (Sigma) à 4°C. Le surnageant est jeté une fois la sédimentation naturelle des tubules séminifères effectuée. Les cellules germinales sont ensuite libérées et isolées manuellement en pipetant les tubes avec une P1000 sur la glace. Après obtention d'une solution homogène, les cellules sont filtrées à travers un tamis cellulaire de 100 µm (Sigma). Le volume total de solution cellulaire est de 18 ml final. Cette suspension cellulaire est enfin déposée sur un gradient de BSA (2-4% dans du DMEM) préalablement préparé dans une chambre de

100

sédimentation. Une solution de PBS 1X est ensuite ajoutée à la chambre de sédimentation après adjonction des cellules. Le volume final contenu dans la chambre est de 468 ml. Le processus de sédimentation dure 70 minutes à 4°C. Les fractions sont collectées à raison de 10 ml par tubes puis centrifugées 200g 5 minutes à 4°C. Chaque surnageant des fractions est aspiré de telle sorte à laisser 2 ml de surnageant. Le culot cellulaire est ensuite dissocié dans ces 2 ml. Un volume de 10 µl est prélevé par fraction et déposé entre lamelles pour être analysé au microscope à contraste de phases, le but étant de déterminer le type de cellules présentes dans chacune des fractions. Afin d'enrichir le nombre de cellules méiotiques (pachytènes) et post méiotiques (spermatides rondes), les phases contenant les mêmes types cellulaires sont regroupées. Chacun des tubes sont centrifugés une dernière fois à 200g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot conservé pour de futures expériences d'extraction d'ARN, de protéines, de ChIP-seq.

Préparation de la chambre de sédimentation :

La préparation de la chambre de sédimentation ainsi que la sédimentation en elle-même s'effectuent dans une pièce froide. Il est important pendant toute la durée de l'expérience de s'assurer de l'absence de chocs ou vibrations aux abords du montage. La chambre de sédimentation est connectée par le dessus à un long tuyau en plastique souple qui est connecté à deux éprouvettes. Ces dernières sont connectées entre elles, en série, par un tuyau en partie basse régulé par un robinet nommé n°2 (Figure : 40). À la sortie des éprouvettes, un autre robinet nommé n°1 permettra de réguler le flux d'adjonction de solutions de DMEM-BSA, de cellules dans la chambre. En fin de sédimentation, il permettra aussi de réguler le flux de solution sortante de la chambre de sédimentation lors de la récupération des fractions. La partie basse de la chambre de sédimentation est reliée à une solution liquide de haute densité, le fluorinert-FC77 (Sigma). Ce liquide permet de maintenir stable le gradient de BSA

Dans un premier temps, la chambre est totalement remplie de ce liquide jusqu'au robinet de connexion n°1 situé entre la chambre et les éprouvettes. Dans un second temps, l'éprouvette la plus proche de ce robinet est remplie de 180 ml de solution de DMEM-BSA 4%. À ce stade il est important de chasser les bulles éventuelles entre le fluorinert et la solution de DMEM-BSA 4%. Pour ce faire, il faut, après avoir ouvert le robinet n°1 soulever la bouteille de fluorinert pour créer un flux remontant qui entraîne les bulles vers l'éprouvette. Ceci étant fait, le robinet n°1 peut être refermé et la bouteille reposée sur la paillasse au même

niveau que la chambre de sédimentation. La seconde éprouvette plus éloignée peut alors être remplie de 180 ml de DMEM-BSA 2%. Le robinet n°2 connectant les deux éprouvettes est ensuite à mettre en position ouverte. À ce moment, le robinet n°1 peut être ouvert délicatement et partiellement de telles sortes à ce que le flux s'écoule lentement à raison de 1 ml pour 10 secondes. Ce robinet peut être arrêté dès que la totalité des solutions DMEM-BSA a été transférée dans la chambre de sédimentation.

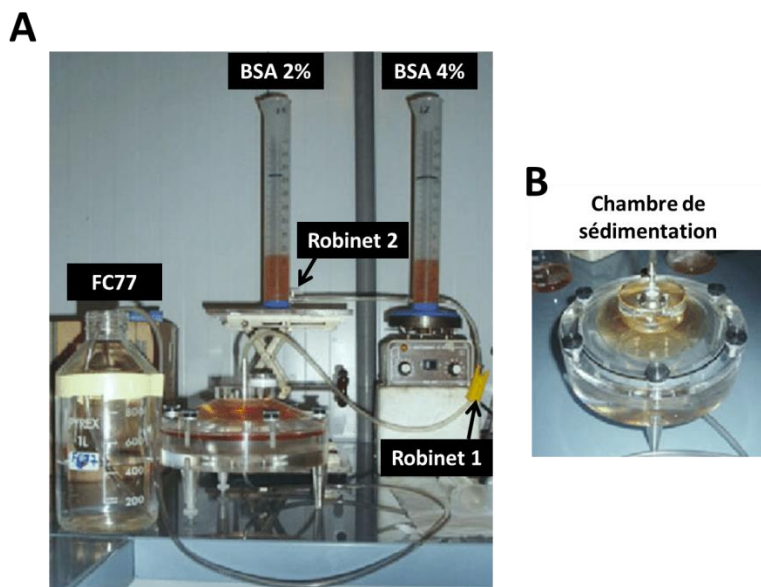


Figure 40: Image représentant le montage de la chambre de sédimentation pour séparer les cellules germinales par gradient de BSA. (A) Photo prise du montage. On observe les deux éprouvettes contenant respectivement du DMEM-BSA 2% puis du DMEM-BSA 4% séparées par le robinet numéros 2. À la sortie des éprouvettes, le liquide suit une tubulure qui est connectée par le dessus à la chambre de sédimentation. Cette tubulure dispose d'un robinet (numéro 1). Par le dessous la chambre de sédimentation est connectée avec du fluorinert (FC77). **(B)** Sur cette image, on peut voir la chambre de sédimentation contenant du DMEM-BSA (liquide rose).

III.2.9 Coloration à la chromomycine A₃

Les échantillons de spermatozoïdes sont récupérés comme indiqué dans le paragraphe « Isolation des spermatozoïdes » puis lavés deux fois avec 5 ml de PBS 1X avant d'être fixés dans une solution contenant un mélange de 1 volume d'acide acétique pour 3 volumes de méthanol à 4°C pendant 30 minutes. Les spermatozoïdes sont ensuite étalés sur lame Superfrost et séchés sous hotte à l'air pendant une nuit à température ambiante. Les échantillons sont marqués en utilisant une solution de chromomycine A3 à 0,25 mg / ml diluée dans une solution de Mcilvaine tampon (pH 7) pendant 20 minutes. Après deux lavages pendant 2 minutes avec la solution de Mcilvaine, les noyaux de spermatozoïdes sont contre

colorés dans une solution de Hoechst à 0,5 mg/ml pendant 5 minutes. Les lames sont montées avec du milieu de montage DAKO après avoir été lavées 5 minutes dans du PBS 1X. Les lames sont analysées grâce à un microscope à fluorescence Zeiss Axio-Imager 2 avec un objectif plan apochromat x63 DIC à huile.

III.2.10 Coloration au bleu d'aniline

Les spermatozoïdes sont extraits de l'épididyme comme décrit dans le paragraphe « Isolation des spermatozoïdes » puis lavés à deux reprises avec 5 ml de PBS 1X. Les échantillons de sperme sont fixés avec une solution de glutaraldéhyde à 3% diluée dans du PBS 1X pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être déposés sur une lame puis laissés à sécher à l'air sous hotte une nuit. Les lames sont ensuite incubées 5 minutes dans de l'eau puis colorées 10 minutes dans 5% de bleu d'aniline dilué dans une solution d'acide acétique à 4%. Après deux lavages de 2 minutes dans de l'eau, les échantillons sont déshydratés dans des bains croissants de solution d'éthanol 70, 90 et 100% à raison de 2 minutes par bain. Le dernier bain est une solution de toluène 100% dans lequel les lames sont plongées pendant 2 minutes avant d'être montées entre lame-lamelle avec du milieu de montage DPX (Sigma). Les lames sont visualisées par microscopie à lumière blanche avec un objectif à immersion d'huile x63 plan apochromat sur le microscope Zeiss Axio-Imager 2.

III.2.11 Analyse de la morphologie des spermatozoïdes

Les échantillons de spermatozoïdes sont extraits (cf paragraphe : Isolation des spermatozoïdes) puis lavés au PBS 1X et déposés sur une lame. Après séchage, les échantillons sont fixés dans une solution d'éther/éthanol puis colorés avec du Harris-Schorr. L'analyse a été réalisée par microscopie en lumière blanche à l'objectif x100. La numération des spermatozoïdes normaux et anormaux a été réalisée par Guillaume Martinez.

III.2.12 Analyse automatique de la motilité des spermatozoïdes

L'analyse de la concentration des spermatozoïdes ainsi que celle de leur vitalité s'effectue sur des spermatozoïdes frais récupérés selon le protocole « Isolation des

spermatozoïdes ». Les spermatozoïdes sont dilués au 1/40^{ème} dans du PBS 1X à 37°C puis 10 µl sont déposés dans une chambre Leja et analysés par microscopie à lumière blanche grâce au système CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) CEROS-Hamilton-Thorne sur une platine chauffée à 37°C. L'utilisation du système CASA a été effectuée par Guillaume Martinez (Équipe GETI-IAB).

III.2.13 Fécondation In Vitro

Les ovocytes sont récupérés à partir de femelles OF1 (Oncins France 1) de 6 à 8 semaines (Laboratoire Charles River) synchronisées par l'injection de 5 unités de sérum gonadotrophine chorionique équine (Intervet) additionné de 5 unités gonadotrophine chorionique humaine (Intervet). Les spermatozoïdes sont récupérés comme décrit dans « Isolation des spermatozoïdes » puis capacités dans du milieu M16 (Sigma) contenant 2% de BSA (Sigma) pendant 45 minutes à 37°C avec une atmosphère de 5% en CO₂. Après lavage dans du M16 et centrifugation à 500g pendant 5 minutes, les spermatozoïdes sont mis en contact avec les ovocytes à raison de 1,5 à 5 x10⁵ spermatozoïdes capacités par ml dans du milieu M16 (Sigma) à 37°C avec 5% de CO₂. Après une incubation de 4 heures, les ovocytes sont transférés dans une boîte contenant 500 µl de M16. Après 24 heures d'incubation à 37°C sous 5% de CO₂ dans du M16, les embryons au stade 2 cellules sont comptés. Les blastocystes sont comptés à 3,5 j après fécondation. La manipulation de synchronisation des femelles et la fécondation *in vitro* a été réalisée par Roland Abi Nahed (Équipe GETI-IAB). (Agrément du comité d'éthique n° 296-Grenoble Institut des neurosciences)

III.3 TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

III.3.1 Extraction de protéines

Les protéines sont extraites à partir de cellules lysées dans du TRIzol. Après extraction de l'ARN, les protéines sont isolées selon la procédure décrite du fournisseur (TRIzol réf : 15596026 de Invitrogen). Concrètement, après la récupération de l'ARN (cf protocole précédent), 300 µl d'éthanol à 100% est ajouté pour 1 ml de TRIzol au départ. Les échantillons sont mélangés puis incubés 3 minutes à 4°C avant d'être centrifugés à 4°C pendant 5 minutes à 2 000 g. Le surnageant est récupéré puis les protéines sont précipitées

avec 1,5 ml d'isopropanol pendant 10 minutes à froid. Après centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 12 000 g, le culot est lavé à deux reprises par l'ajout de 2 ml de 0,3M de guanidine hydrochloride. Après une incubation de 20 minutes à 4°C, les protéines sont centrifugées à 4°C pendant 5 minutes à 7 500 g avant de subir le second lavage. Le surnageant est systématiquement jeté. Le dernier et troisième lavage est réalisé par l'ajout de 2 ml d'éthanol 100%. Le culot est légèrement vortexé puis incubé 20 minutes avant d'être centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 7 500 g. Le surnageant est jeté et le culot de protéine est séché à l'air pendant 5 à 10 minutes. Les protéines sont finalement suspendues dans 200 µl d'une solution à 1% de SDS. Pour assurer une suspension maximale, les échantillons sont incubés à 50°C. Les protéines ainsi suspendues sont conservées à -20°C.

III.3.2 Western blot

Les extraits protéiques sont dénaturés 10 minutes à 100°C dans une solution de Laemmli contenant 100 mM de Tris-HCl pH : 6,8, 2% de SDS, 10 % de glycérol, 1% de β mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol. Après une centrifugation de 5 minutes à 13 000 rpm, les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide (SDS-PAGE). Les protéines sont séparées dans le gel d'électrophorèse lors de la migration à 30 mA dans du tampon de migration contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1% de SDS.

Le transfert des protéines du gel d'électrophorèse sur une membrane PVDF 0.2µm préalablement activée 5 minutes dans 100% d'isopropanol, est réalisé dans un tampon contenant 20 % d'éthanol, 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 0,1% de SDS sous 100 volts pendant 1 heure. Après transfert, la membrane est saturée 1 heure dans un tampon contenant 5% de lait demi-écrémé dilué dans du PBS 1X. La membrane est ensuite lavée avant d'être incubée 1 nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dans un tampon de PBS 1X contenant 0.2% de Tween, 1 % de SVF. Les conditions d'utilisations des anticorps sont répertoriées dans le tableau 3. Après 30 minutes de lavages dans du PBS 1X, la membrane est incubée 30 minutes à température ambiante avec l'anticorps secondaire dans un tampon contenant 1% de lait demi-écrémé, 0,2% de Tween dans du PBS 1X. La membrane est ensuite lavée 30 minutes dans du PBS. La révélation de la membrane est effectuée par le système Luminata (Millipore).

IV.1 PUBICATION N°1: Dual role of histone variant H3.3 in spermatogenesis: positive regulation of piRNA transcription and inactivation of X-chromosome.

La partie résultats de mon manuscrit de thèse sera présentée sous forme d'une publication prête à être soumise aux éditeurs. Le résumé en français de cette publication vous est présenté ci-dessous :

Introduction : Le variant d'histone H3.3 ne diverge, respectivement, que de trois et quatre résidus d'acides aminés par rapport à ses histones conventionnelles H3.2 et H3.1. La protéine H3.3 est codée par deux gènes distincts *H3f3a* et *H3f3b*. Les protéines H3.3A et H3.3B codées par ces gènes, présentent une séquence en acides aminés identique. Il a été montré que H3.3 est nécessaire à la spermatogenèse, mais le mécanisme moléculaire de sa fonction spermatogénique reste obscure. L'objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle de chacune des protéines H3.3A et H3.3B dans la spermatogenèse. Pour cela, j'ai utilisé quatre lignées de souris transgéniques : deux lignées knock-in FLAG-FLAG-HA-H3.3B (H3.3B^{HA}) et FLAG-FLAG-HA-H3.3A (H3.3A^{HA}) pour détecter les isoformes de la protéine H3.3 et deux lignées knock-out H3.3A^{KO} et H3.3B^{KO}.

Résultats : Nos résultats montrent l'apparition d'une infertilité uniquement chez les souris mâles dépourvues en H3.3B mais pas celles dépourvues en H3.3A. L'étude du spermogramme a permis de mettre en évidence plusieurs anomalies sur les spermatozoïdes notamment une oligospermie et une tératospermie chez des souris mâle en l'absence de H3.3B. Par des approches d'immunomarquages, nous avons découvert que le variant H3.3B est essentiel à la spermatogenèse et plus particulièrement à la méiose et à la transition méiose/post-méiose. Notamment, l'absence de H3.3B provoque une augmentation du nombre

de cellules apoptotiques en méiose et une chute du nombre de spermatides rondes, en post-méiose. Nos expériences ont également mis en exergue dans ces deux étapes de la spermatogenèse que H3.3 était enrichie de manière uniforme sur les chromosomes sexuels entiers, les rétrotransposons RLTR10B et RLTR10B2 ainsi que sur les amas de piARN. L'analyse par ARN-seq à l'échelle du génome révèle que la déplétion de H3.3B, dans ces deux étapes, est associée à une expression anormalement accrue de l'ensemble des chromosomes sexuels X et Y comme des rétrotransposons RLTR10B et RLTR10B2. À l'inverse, une régulation à la baisse de l'expression des clusters de piARN est observée chez les souris dépourvues de H3.3B.

Conclusion : Le variant d'histone H3.3B est essentiel à la fertilité masculine et plus particulièrement pour la méiose et la transition méiose/post-méiose de la spermatogenèse. Il intervient notamment dans la régulation des chromosomes sexuels, des rétrotransposons RLTR10B et RLTR10B2 ainsi que des piARN. L'ensemble de nos données dissèquent les mécanismes moléculaires mis en jeu par H3.3B au cours de la spermatogenèse et démontrent que H3.3B, en fonction de sa localisation chromatinienne, est impliqué dans la régulation à la hausse ou la diminution de l'expression de grandes régions chromatiniennes définies.

Dual role of histone variant H3.3 in spermatogenesis: positive regulation of piRNA transcription and inactivation of X-chromosome

Fontaine^{1, #}, E, Papin^{2, #}, C, Martinez¹, G., Abi Nahed¹, R., Héry³, P., Buchou¹, T., Ouarrhni², K, Le Gras², S., Favier⁴, B., Gautier¹, T., Gerard⁴, M., Bednar¹, J., Arnoult^{1, *}, C, Dimitrov^{1, *}, S. & Hamiche^{2, *}, A.

¹Institute for Advanced Biosciences, INSERM U 1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

²Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)/Université de Strasbourg/ CNRS/INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France

³Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette 91198, France.

⁴Université de Grenoble Alpes, Etablissement Français du Sang, EA 7408, BP35, 38701 La Tronche, France.

#, equal contribution

*, corresponding authors: hamiche@igbmc.fr; stefan.dimitrov@univ-grenoble-alpes.fr; christophe.arnoult@univ-grenoble-alpes.fr

Summary

The histone variant H3.3 differs of only four amino-acid residues from conventional H3 and is encoded by two distinct genes *H3f3a* and *H3f3b*. However, the encoded H3.3A and H3.3B proteins exhibit identical amino-acid sequence. H3.3 is required for spermatogenesis, but the molecular mechanism of its spermatogenic function remains obscure. Here, we have studied the role of each one of H3.3A and H3.3B proteins in spermatogenesis. We have generated transgenic conditional knock-out/knock-in (cKO/KI) epitope-tagged FLAG-FLAG-HA-H3.3B (*H3.3B^{HA}*) and FLAG-FLAG-HA-H3.3A (*H3.3A^{HA}*) mouse lines. We show that H3.3B, but not H3.3A, is required for spermatogenesis and male fertility. Analysis of the molecular mechanism unveils that the absence of H3.3B led to alterations in the meiotic/post-meiotic transition. Genome-wide RNA-seq reveals that the depletion of H3.3B in meiotic cells is associated with increased expression of the whole sexual X and Y chromosomes as well as of both RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons. In contrast, the absence of H3.3B resulted in down-regulation of the expression of piRNA clusters. ChIP-seq experiments uncover that RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons, the whole sexual chromosomes and the piRNA clusters are markedly enriched of H3.3. Taken together, our data dissect the molecular mechanism of H3.3B functions during spermatogenesis and demonstrate that H3.3B, depending on its chromatin localization, is involved in either up-regulation or down-regulation of expression of defined large chromatin regions.

Introduction

DNA in the eukaryotic nucleus is packaged into chromatin. Chromatin exhibits repeating structure and its basic unit, the nucleosome core particle, consists of an octamer of core histones (two of each H2A, H2B, H3 and H4) around which DNA is wrapped into ~1,67 helical turns¹. This arrangement allows not only DNA packaging but also the control of all nuclear processes. Transcription is a dynamic process that requires permanent adjustments. To answer to these critical needs, the cell is using several epigenetic strategies, including chromatin remodeling, histone post-translational modifications and replacement of canonical histones with histone variants. This confers novel structural and functional properties of the nucleosomes and in turn, permits to either activate or repress transcription^{2,3}.

Histone variants are non-allelic isoforms of conventional histones. Each conventional histone family, except H4, has histone variants⁴. Histone variants are incorporated into chromatin by dedicated histone chaperones⁵⁻¹⁰. The histone H3 family, in addition to conventional H3, comprises two main histone variants, CENP-A and H3.3. H3.3 is encoded by two distinct genes *H3f3a* and *H3f3b*, which are localized on different chromosomes and showed various organization, but the coded proteins exhibit identical amino acid sequence¹¹. H3.3 differs of only four amino acids residues from conventional H3¹² and its deposition in chromatin is assisted by two specific chaperones, DAXX and ubinuclein^{10,13}.

The available data suggest that H3.3 is implicated in several essential nuclear events, including transcription and mitosis^{9,14-16}. Genome-wide ChIP analysis has shown that H3.3 is located on promoters, gene bodies and both centromeric and telomeric chromatin^{9,14,16}, but

how does H3.3 act on these elements is not clear. The turnover of H3.3 depends on its localization, suggesting that the residence time of H3.3 association with specific chromatin loci is linked to its function¹⁷.

H3.3 is also involved in spermatogenesis. A very strong phenotype, including severe infertility and reduced viability were observed in *Drosophila* loss of functions mutants, where both *H3.3A* and *H3.3B* were deleted by P element transposition¹⁸. Inactivation of both *H3f3a* and *H3f3b* genes in mice led to early embryonic lethality and double *H3.3A^{KO/WT}/H3.3B^{KO}* mutant males are totally infertile, while double *H3.3A^{KO/WT} / H3.3B^{KO}* females are fertile, revealing a specific role of H3.3 in spermatogenesis¹⁶. Another study showed that *H3.3B* depletion is alone sufficient to generate infertility in mice¹⁹. Other reports claimed that *H3f3b* heterozygotes were growth-deficient with males being sterile because of problems at the level of round spermatids, while *H3.3A* depleted males were found subfertile with dysmorphic spermatozoa²⁰. A hypomorphic gene-trap mutation in *H3f3a* led to high mortality by weaning and the surviving animals exhibited severe infertility²¹. Taken as a whole, these data demonstrate that H3.3 is an important player in spermatogenesis. The various genetic background of the animals used could explain the observed different impact of *H3f3a* and *H3f3b* on the progress of spermatogenesis in the different studies (discussed in²⁰). The molecular mechanism of H3.3 function during spermatogenesis and in particular, the impact of the H3.3 deficiency on transcription at genome-wide level, are, however, only superficially addressed.

Repression of the transcription of transposable elements^{22,23}, including long terminal repeats (LTR), long interspersed nuclear elements (LINE), and short interspersed nuclear elements (SINE), satellites and simple repeats (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002) are of prime importance. In germ cells, transposable elements, if transcribed, could spread into the host genome and pose an ongoing genetic threat. Hosts have developed specific strategies to silence them²⁴. For instance, RLTR10B containing retrotransposons such as MMERVK10C, one of the youngest retrotransposons in the mouse genome, was reported to be strongly down-regulated during spermatogenesis²⁵, through Trim33, a protein exhibiting ubiquitin ligase activity. No other chromatin associated proteins acting as repressors of RLTR10B were identified to date.

Another important sophisticated strategy for safeguarding the germ line genome in animals is the piwi (piRNA) pathway^{24,26}. This small RNA pathway is employed by the host animals to silence retrotransposons both transcriptionally and post-transcriptionally by using complexes of the Argonaute subfamilies with piRNA to destroy the retrotransposon transcripts²⁶. Of note, the piwi pathway is also able to affect the epigenetic properties of the cognate genetic loci.

Here, we have studied the role of each one of H3.3A and H3.3B proteins in spermatogenesis by using conditional knock-out/knock-in (cKO/KI) epitope-tagged *H3.3A^{HA}* and *H3.3B^{HA}* mouse lines. We showed that H3.3B is required for spermatogenesis. The use of genome-wide approaches uncovered the intimate mechanism of H3.3B spermatogenic functions. Our results revealed that H3.3B has a complex “dual” role in spermatogenesis. Indeed, H3.3 positively regulates piRNA expression, but it is also required for both XY-chromosome inactivation and transcriptional repression of RLTR10B and RLTR10B2 repetitive elements. Our data illustrated the ability of the cell to use the same histone variant to control two opposite

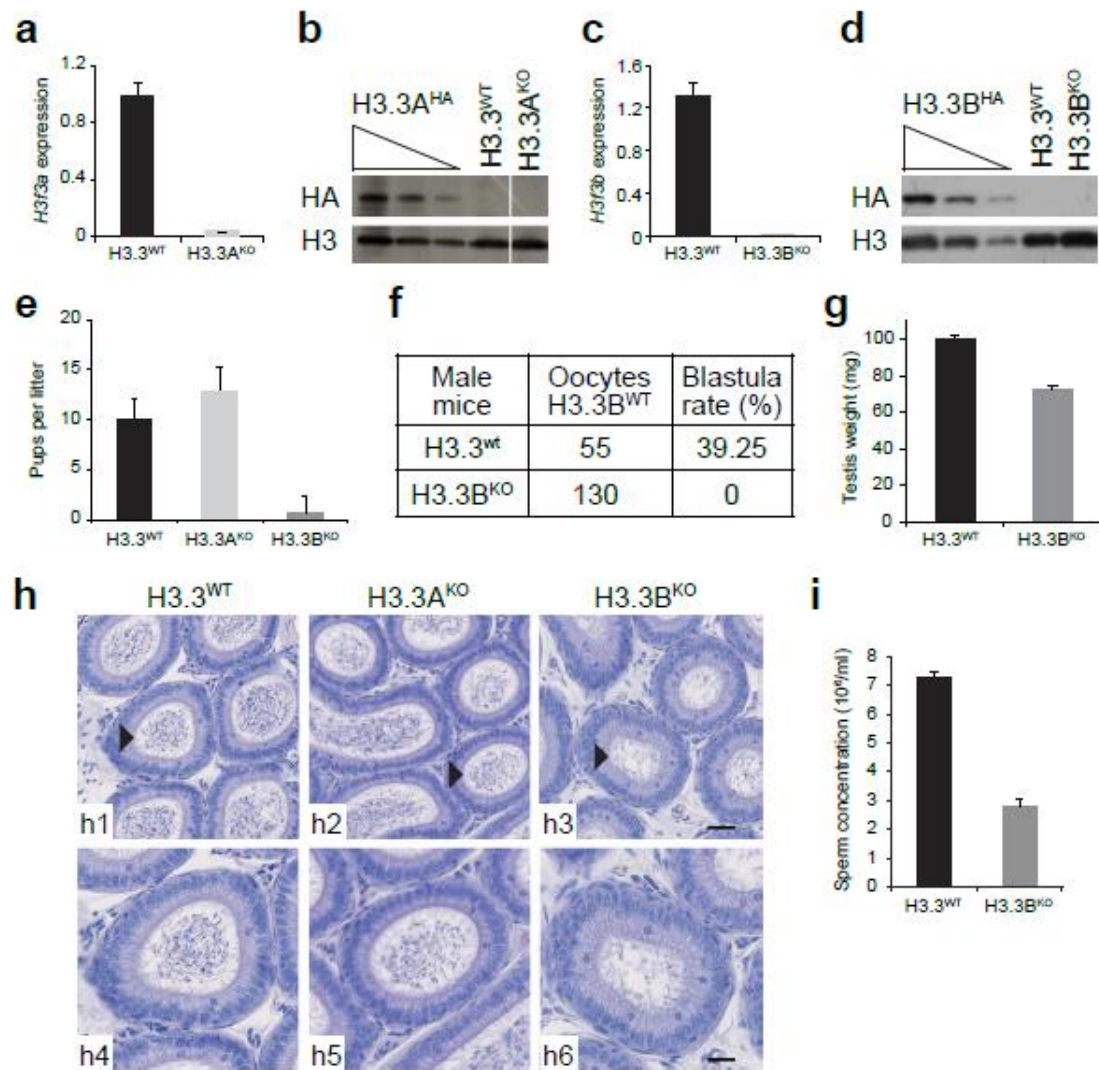


Figure 1. H3.3B^{KO}, but not H3.3A^{KO} mice, exhibit decreased sperm production and severe infertility. (a-d) Efficient depletion of H3.3A and H3.3B in the testis of the indicated knock-out mice. qPCR measurement of the mRNA level (a,c) and Western blot analysis (b,d) of either H3.3A (a,b) or H3.3B (c,d). The average values of the mRNA of three biologically independent experiments are shown. For the Western blot analysis, an anti-HA antibody was used. (e) Numbers of pups per female OF1 mated with either H3.3B^{WT}, H3.3A null or H3.3B null male. The average of 9 litters is presented. (f) Number of 2-cell and blastocysts obtained by in vitro fertilization using sperm from either control or H3.3B null males and oocytes prepared from control H3.3B^{WT} females. (g) Testis weight for control and H3.3B null males. The average of 4 testes of different genotypes was presented. (h) Cross-sections of the epididymis of control (h1, h4) H3.3A^{KO} (h2, h5) and H3.3B^{KO} (h3, h6) mice ; h4-h6 show the enlarged epididymis cross-sections indicated by an arrow head in h1-3 ; bars, 30 μ m and 70 μ m, respectively. (i) Sperm concentration (millions per milliliter) for control H3.3B^{WT} and H3.3B null males.

processes, preservation of an active transcriptional state and its repression.

Results

H3.3B null male mice are infertile

The availability of transgenic conditional knock-out/knock-in (cKO/KI) epitope-tagged H3.3A^{HA} and H3.3B^{HA} mouse lines allowed, by using homologous recombination, to produce either H3.3A or H3.3B null mice (see **Supplementary Figure 1** and **Method section** for the gene targeting strategy). Both RT-qPCR and Western blotting showed that the proteins were absent from the respective mouse line (**Fig. 1a-d**).

The male null H3.3B mice, mated with WT females, exhibited very severe infertility problems in contrast to H3.3A null mice, which were found as fertile as the WT mice (**Fig. 1e**). In agreement, *in vitro* fertilization using null H3.3B mouse spermatozoa failed completely (**Fig. 1f**). The testis weight of the H3.3B null mice were ~30% smaller than this of the control WT ones (**Fig. 1g**). A decrease of the number of spermatozoa in the cauda epididymides of H3.3B null mice was also observed (**Fig. 1h**). Accordingly, the concentration of sperm in the H3.3B^{KO} animals was found to be only ~40% compared to this of the WT animals (**Fig. 1i**). The vitality of the mature spermatozoa from the H3.3B null mice was slightly decreased (**Supplementary Fig. 2a**), but they showed increased level of DNA fragmentation as judged by the TUNEL assay (**Supplementary Fig. 2b**) and markedly altered morphology (**Supplementary Fig. 2c**), including both abnormal tails and heads (**Supplementary Fig. 2d-g**). In addition, strong alterations of DNA compaction in the spermatozoa from H3.3B null mice were observed (**Supplementary Fig. 2h**), that presumably reflects the abnormal exchange of histone to protamines (**Supplementary Fig. 2i**). However, the absence of H3.3B did not affect the expression level of both transition proteins (TPs) (**Supplementary Fig. 2j**) and protamines (**Supplementary Fig. 2k,l**), unveiling that this is not due to a decrease of the expression of these proteins. Taken collectively, these results reveal, in agreement with the reported data¹⁹ (where mice with very similar background to this of our mouse lines were used), that H3.3B is essential for male fertility and, in particular, for functional spermatozoa formation.

The absence of H3.3B is associated with strong decrease of the amount of post-meiotic cells

To shed light on the origins of the alterations in the morphology and in the dramatic decrease of produced spermatozoa in the H3.3B^{KO} animals, we next sought to identify the testis cell types that are affected by the absence of H3.3B. To this end, we analyzed the different testis cell types in WT, H3.3A^{KO} and H3.3B^{KO} mice. For simplicity, in our analysis we grouped the cells in three different classes, namely mitotic, meiotic and post-meiotic cells. What is worthy of note, the very large majority of meiotic cells are pachytene spermatocytes and this of the post-meiotic ones are round spermatids^{27,28}. The absence of H3.3B resulted in dramatic decrease of the round spermatid quantity in the seminiferous tubules, whereas the absence of H3.3A did not affect the production of round spermatids (**Fig. 2a** and **Supplementary Fig. 3a,b**). Quantification of the different cell types in the testis of the H3.3B^{KO} males showed that

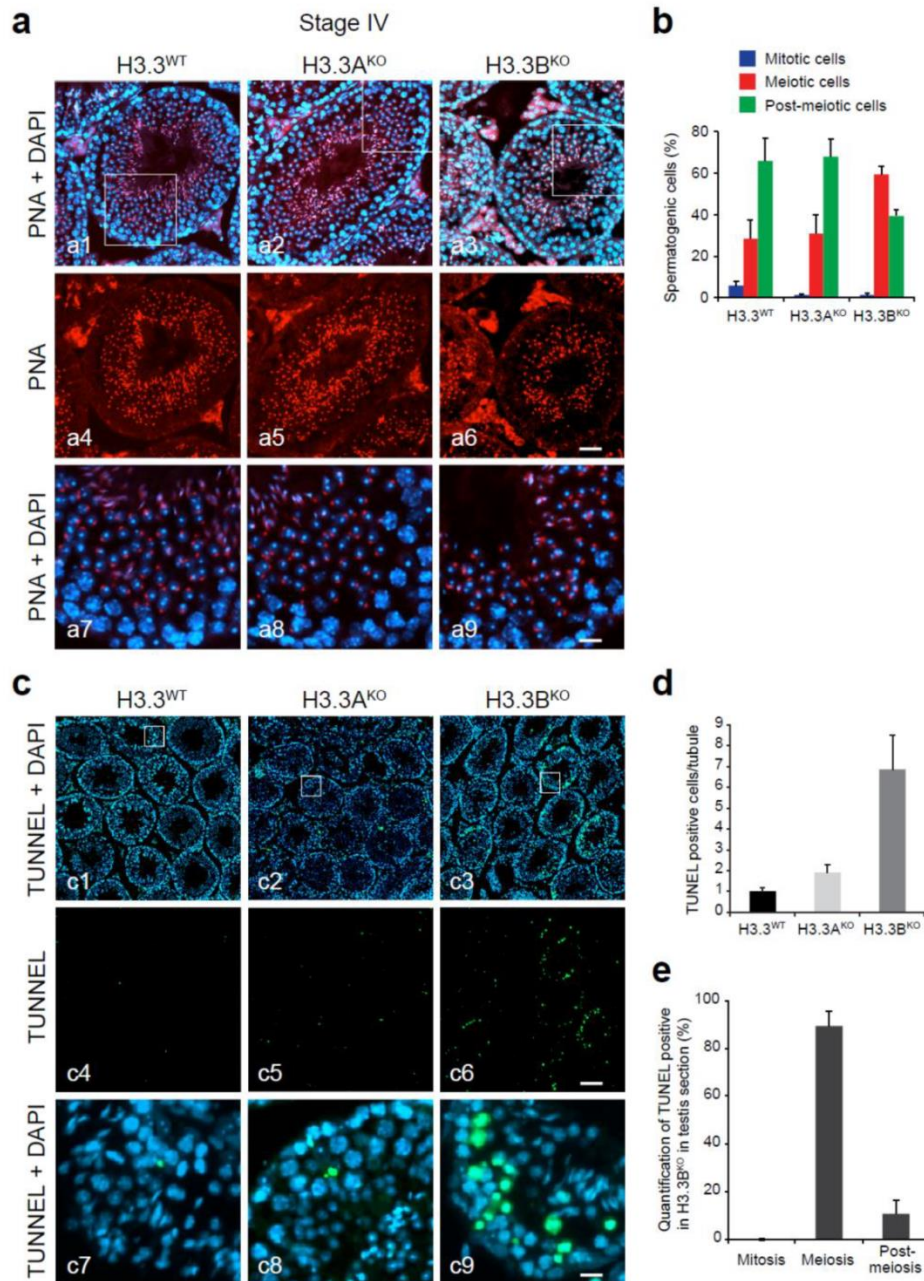


Figure 2. The absence of H3.3B leads to strong alterations in the meiotic/post-meiotic transition. (a) H3.3B^{WT}, H3.3A^{KO} and H3.3B^{KO} stage IV testis sections stained with DAPI (blue) for nucleus detection and with PNA (Peanut Agglutinin, red) for acrosome visualization. a7-a9 correspond to the enlargement of the white square in a1-a3. (b) Quantification of the different types of spermatogenic cells in the indicated genotypes. In post-meiotic cell, quantification were included just round spermatids round but no elongated spermatids and spermatozoa. (Scale bars, 70 μ m and 15 μ m) (c) TUNEL staining (green) of testis sections from control, H3.3A and H3.3B null males ; blue, DAPI staining. (Scale bars, 70 μ m and 10 μ m) (d) Number of TUNEL positive cells normalized per seminiferous tube in the indicated genotypes. (e) Distribution of TUNEL positive spermatogenic cells from H3.3B^{KO} male according to their maturation state.

the ratio meiotic cells/post-meiotic cells is dramatically altered. Indeed, in both control and H3.3A null testis, the amount of meiotic cells is ~ 2.5 fold smaller compared to the amount of post-meiotic cells, while in the H3.3B null testis, this is the opposite with meiotic cells being ~ 1.5 fold more than post-meiotic cells (**Fig. 2b**).

Since H3.3 is involved in cell division¹⁵, the simplest explanation of this phenomenon would be some implication of H3.3B in meiosis. If this is correct, one should expect the absence of H3.3B, but not of H3.3A, to affect the meiotic process and to generate defects that should lead to apoptotic outcomes of the meiotic cells and consequently, to the production of smaller amount of post-meiotic cells. With this in mind, we have used the TUNEL assay to visualize DNA fragmentation in the cells of the seminiferous tubules of the 3 types of mice. As seen (**Fig. 2c**), the amount of TUNEL positive cells in the seminiferous tubules of the H3.3B^{KO} animals is much higher compared to this of both H3.3^{WT} and H3.3A^{KO} animals. The quantification showed that the absence of H3.3B resulted in 7-fold increase of TUNEL positive cells in the seminiferous tubules of the H3.3B^{KO} mice (**Fig. 2d**). Importantly, more than 85% of the TUNEL positive cells belonged to the meiotic pool (**Fig. 2e**). We conclude that H3.3B is, as hypothesized, involved in meiosis and that its absence leads to a depletion of post-meiotic cells.

H3.3B is implicated in transcriptional repression of sex chromosomes

The absence of H3.3B could affect specific genes playing a key role in meiosis and this could in turn lead in severe dysfunction of meiotic cells and consequently to apoptosis and cell death. To test this, we have carried out genome-wide transcriptome studies. The comparative analysis of the meiotic/post-meiotic WT cell transcriptome shows, in agreement with the reported data²⁹, that the meiotic/post-meiotic transition is associated with vast transcriptional reprogramming, including thousands of up- and down-regulated genes, ranging in well defined clusters (**Fig. 3a,b**). The absence of H3.3B affects only slightly the number of affected genes and the types of clusters in the transition meiotic/post-meiotic cells (**Fig. 3c,d**). In the H3.3B null meiotic cells, 214 and 150 genes were significantly up- and down-regulated, respectively (**Fig. 3e and Supplementary Tab. 1**). However, only a single cluster, consisting of significantly up-regulated histone genes located on chromosome 13 was found (**Fig. 3f**). In the case of H3.3B deficient post-meiotic cells, the picture was very similar, but the single observed cluster consisted of genes coding for glycoproteins (**Fig. 3g,h and Supplementary Tab. 2**). Since only one cluster of genes implicated in spermatogenesis was found, this suggests that the H3.3B effect on the meiotic/post-meiotic transition could not be directly associated with alterations of the expression of specific genes, but rather reflects its implication in other process(es). This is in agreement with recent data, showing only a minor role of H3.3 in the control of transcription in both mouse embryonic fibroblast (MEFs) and mouse embryos^{15,16}. It is worth noting that the absence of H3.3B was reported to affect some genes involved in mouse spermatogenesis¹⁹. However, in this latter case the cutoff used was only 1.5 fold¹⁹.

To shed light on the implication of H3.3B in spermatogenesis, we next aimed to determine the genome-wide distribution pattern of H3.3. With this in mind, we carried out both immunofluorescence (IF) and native ChIP-seq experiments using commercially available anti-HA and anti-FLAG antibodies (**Fig. 4**). For the ChIP-seq experiments, we purified by double immunaffinity the native H3.3 mononucleosomes from micrococcal nuclease digested meiotic and

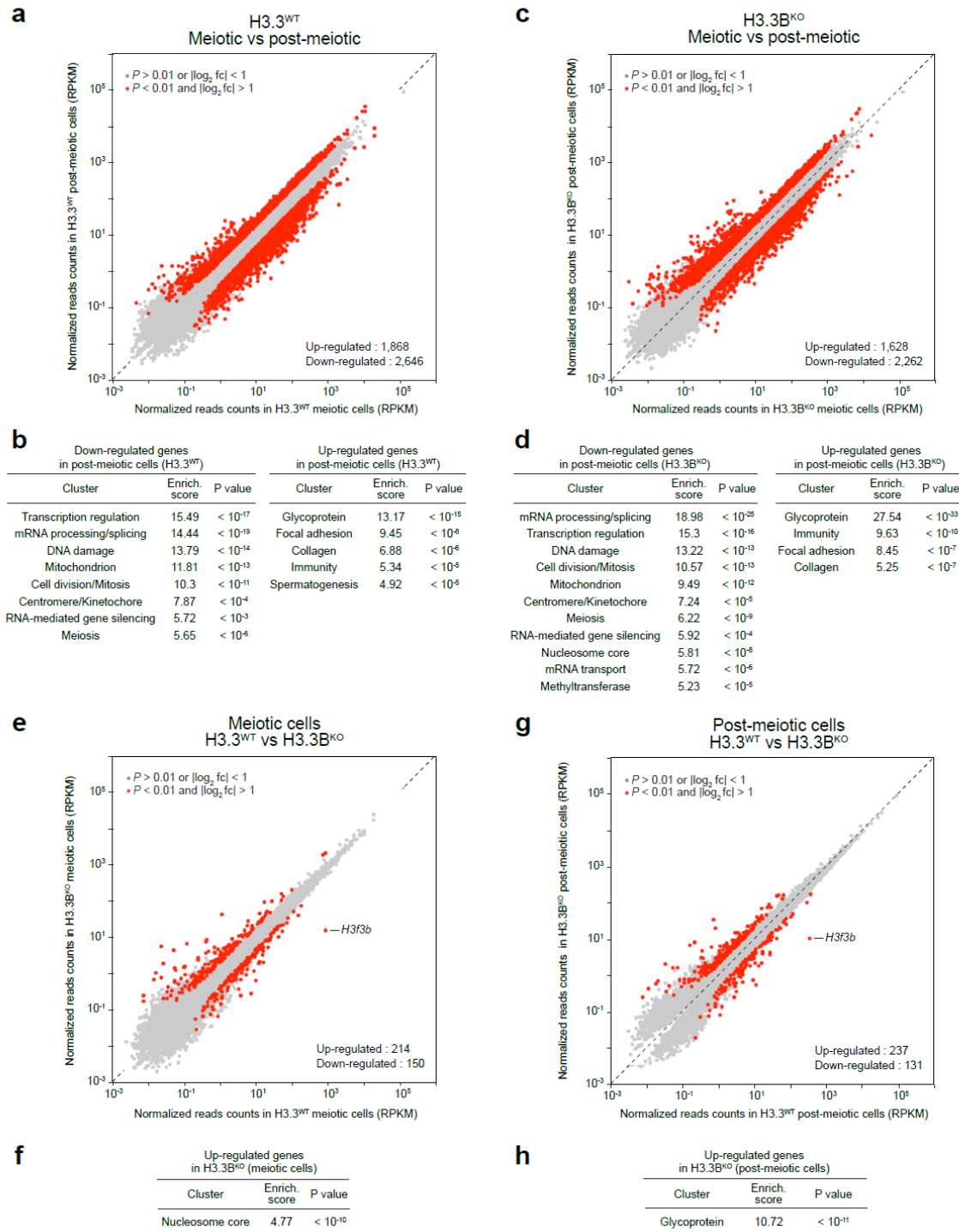


Figure 3. Genome-wide transcriptome analysis of meiotic and post-meiotic cells in the absence of H3.3B. (a,c) Scatter plots comparing gene expression profiles of WT post-meiotic and meiotic cells in the presence (a) or absence (c) of H3.3B. Red dots indicate differentially expressed genes. (b,d) Functional annotation clustering of differentially expressed genes in post-meiotic cells in the presence (b) or absence (d) of H3.3B. (e,g) Scatter plots comparing gene expression profiles of H3.3^{WT} versus H3.3B^{KO} in meiotic (e) and H3.3^{WT} versus H3.3B^{KO} post-meiotic cells (g). Red dots indicate differentially expressed genes. (f,h) Functional annotation clustering of up-regulated genes in meiotic (f) and post-meiotic cells (h) in the absence of H3.3B.

post-meiotic nuclei³⁰. The IF data show a clear enrichment of both H3.3A and H3.3B in the sexual body (consisting of the X and Y chromosomes) of both pachytene spermatocytes and round spermatids (**Fig. 4a,b**). This was further confirmed by the meiotic and post-meiotic cell ChIP-seq data, which show, compared to autosomes, a four-fold enrichment of H3.3 in the sexual chromosomes (**Fig. 4c,d**). Interestingly, the percentage of detected reads for the sexual chromosomes in the input fractions of both meiotic and post-meiotic cells was clearly smaller compared to this of the autosomes (**Fig. 4e,f**). This would reflect lower accessibility of the sexual chromosomes to the micrococcal nuclease and consequently, higher level of compaction of both of them. In the autosomes, H3.3 picked at two sites around the TSS (**Fig. 4g**). The picture is, however, clearly different in the sexual chromosomes in both meiotic and post-meiotic cells. No enrichment of H3.3 is observed on promoters and gene bodies (**Fig. 4h**). In fact, H3.3 shows a completely uniform distribution of H3.3 along the sexual chromosome genes (**Fig. 4h,i**). We attribute this to the transcriptional repressive status of the sexual chromosomes in meiotic cells and in its minor role in the direct control of transcription.

The Manhattan plots, showing the transcription pattern for each individual chromosome, are presented in **Fig. 5a-d**. As expected, the meiotic/post-meiotic transition is associated with both up- and down-regulation of very large number of genes in each individual autosome (**Fig. 5a**). The absence of H3.3B does not affect the general up- and down-regulation pathway of the transcriptional autosome reprogramming (**Fig. 5b**). The meiotic/post-meiotic transition in WT cells is associated with massive up-regulation of the genes of the sexual chromosomes in the post-meiotic cells (**Fig. 5a**), a result in agreement with the reported data²⁹. Again, H3.3 appears not to affect the “directionality” of this process (**Fig. 5b**). The comparison of the gene expression patterns in WT and H3.3B null both meiotic and post-meiotic cells revealed that all autosomes exhibited “two directional” (up and down) alterations in their expression. However, the sexual chromosomes show distinct behavior, since essentially all their genes are found only up-regulated in the absence of H3.3B (**Fig. 5c,d**). We conclude that: (i) the association of H3.3B affects the sexual chromosomes in a distinct manner compared to the autosomes and, (ii) H3.3B behaves as a specific general repressor for the whole sexual chromosomes.

H3.3B and regulation of piRNA expression

piRNA are playing an important role in spermatogenesis^{24,26}. To shed light if H3.3B could be involved in the regulation of their expression, we first analyzed in depth the distribution pattern of H3.3. Interestingly, the results unambiguously show that the piRNA clusters are enriched of H3.3 (**Fig. 6a**, ChIP-seq panel). In addition, the H3.3 density followed piRNA cluster transcription (**Fig. 6b**). The H3.3 enrichment on piRNA clusters is higher in meiotic cells compared to post-meiotic cells that would reflect the smaller level of H3.3 expression in the last ones (**Fig. 6a** RNA-seq panel and **Fig. 6b**). The transition meiotic/post-meiotic cells is associated with massive repression of the piRNA cluster expression (88 of the 101 analyzed piRNA clusters were ~ 10 fold down-regulated, **Fig. 6c**) and their transcription is hardly detected in post-meiotic cells.

Notably, the absence of H3.3B led to substantial transcriptional repression of the piRNA clusters in the meiotic cells (**Fig. 6a**, RNA-seq panel). Quantification shows a ~ 25 % decrease in transcription level for one-third of the piRNA clusters in H3.3B null meiotic cells

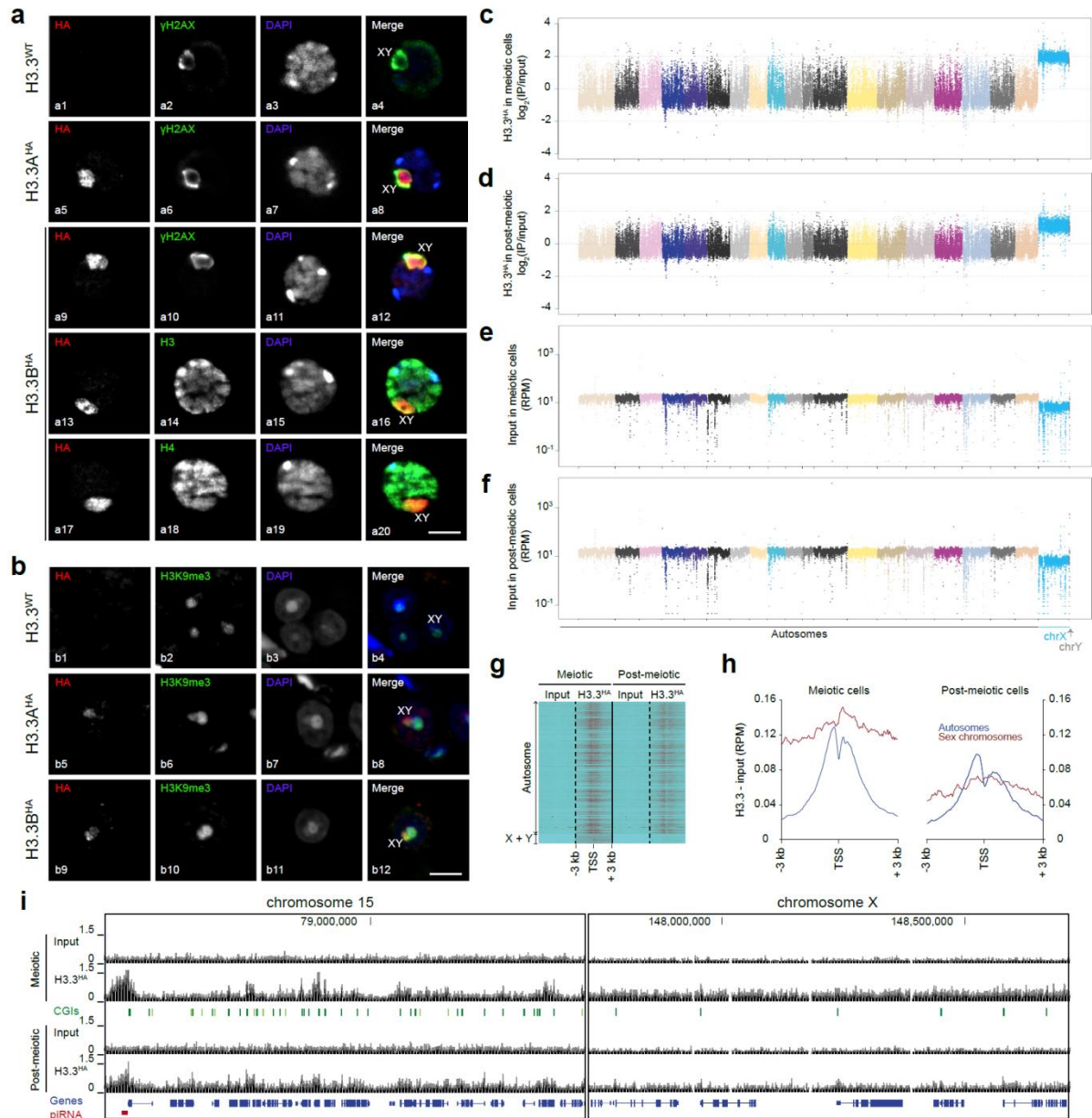


Figure 4. Enrichment and homogenous distribution of H3.3 along the sexual chromosomes in spermatogenic cells. (a,b) The sexual bodies are markedly enriched in H3.3A and H3.3B in pachytene spermatocytes and round spermatids. Costaining of H3.3A^{HA} and H3.3B^{HA} (using anti-HA antibody), with anti-H3 (a14) or γ H2A.X. Anti- γ H2A.X (a2,6,10) and anti-H3K9me3 (b2,6,10) were used to visualize the sexual body in pachytene spermatocytes and round spermatids, respectively. Nuclei were visualized with DAPI. Histone H3 and H4 were detected by anti-H3 and anti-H4 antibodies.(a14,18) (bars, 8 μ m). (c-f) Manhattan plots (built using genome-wide ChIP data) showing the quantification of H3.3 associated with autosomes and sexual chromosomes (c,d) and input samples (e,f) in meiotic (c,e) and post-meiotic cells (d,f). Note that only the sex chromosomes are found enriched with H3.3. (g) Heatmaps of H3.3 relative to the TSS of autosomes and sexual chromosomes in both meiotic and post-meiotic cells. (h) Distribution pattern of H3.3 relative to the TSS for autosomes and sexual chromosomes in meiotic and post-meiotic cells. (i) Genome browser view showing the distribution pattern and enrichment of H3.3 in chromosome 15 and X-chromosome in both meiotic and post-meiotic cells.

(35 of the 101 analyzed are significantly down-regulated, **Fig. 6d**). In summary, the data shows that: (i) piRNA clusters are enriched of H3.3, (ii) higher is the H3.3 density, higher is the transcription of the piRNA clusters and, (iii) the depletion of the H3.3B in meiotic cells led to down-regulation of a large part of the piRNA clusters. We conclude that H3.3B, probably through specific piRNA cluster chromatin organization, assists the efficient expression of the piRNA clusters.

H3.3B is involved in the control of expression of specific LTR retrotransposons

The repression of the transposable element expression is crucial for spermatogenesis. With this in mind, we have initially analyzed genome-wide how does H3.3B affect the transcription patterns of the repetitive elements at the meiotic/post-meiotic transition. Of note, a massive down-regulation of repetitive elements expression is observed in post-meiotic cells compared to meiotic cells (**Supplementary Fig. 4a,c-f**). Whereas the absence of H3.3B does not affect the general pattern of transposable element expression at the meiotic/post-meiotic transition (**Supplementary Fig. 4b,c-f**), we found a specific and significant up-regulation of the RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons in both meiotic and post-meiotic cells (**Supplementary Fig. 4g-j**). ChIP-seq analysis shows that these two retroelement families are enriched in H3.3 (**Supplementary Fig. 4k**). Taken as a whole these results suggest that H3.3B is implicated in the repression of both RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons.

Discussion

In this work we have carried out an in depth study on the role of the histone variant H3.3 in spermatogenesis. The use of transgenic H3.3A and H3.3B conditional knock-out/knock-in (cKO/KI) mouse lines combined with a large number of genome-wide approaches has allowed to demonstrate that H3.3B, but not H3.3A, is a key factor in the spermatogenic process.

The *H3.3B* null mice exhibited very severe infertility, while the *H3.3A* null mice did not show any fertility problem and behaved as the WT mice. The seminiferous tubules of the *H3.3B* null males contained smaller number of spermatozoa. The morphology of their spermatozoa was highly altered and their sperm concentration in the epididymides was strongly decreased. Notably, the ratio meiotic/post-meiotic cells was largely perturbed and the production of post-meiotic cells was heavily reduced in *H3.3B* null males.

Meiotic sex-chromosome inactivation (MSCI) correlates with the presence of the phosphorylated form of the histone variant H2A.X (γ H2AX) in sexual chromosome chromatin³¹. H2AX is phosphorylated by the kinase ATR, which recruitment depends on BRCA1³². After MSCI induction, both removal of conventional H3 and accumulation of H3.3 in the sexual body were observed³³. This led to the hypothesis that both γ H2AX and H3.3 might be involved in sexual body formation, sexual chromosome condensation and their silencing^{31,33}. It is worthwhile to note, however, that these data have correlative character only and no formal demonstration that both H3.3 and γ H2AX are required for MSCI was reported to date. For example, γ H2AX might only mark the induction of MSCI and not to be directly involved in the process sexual chromosome condensation and sexual

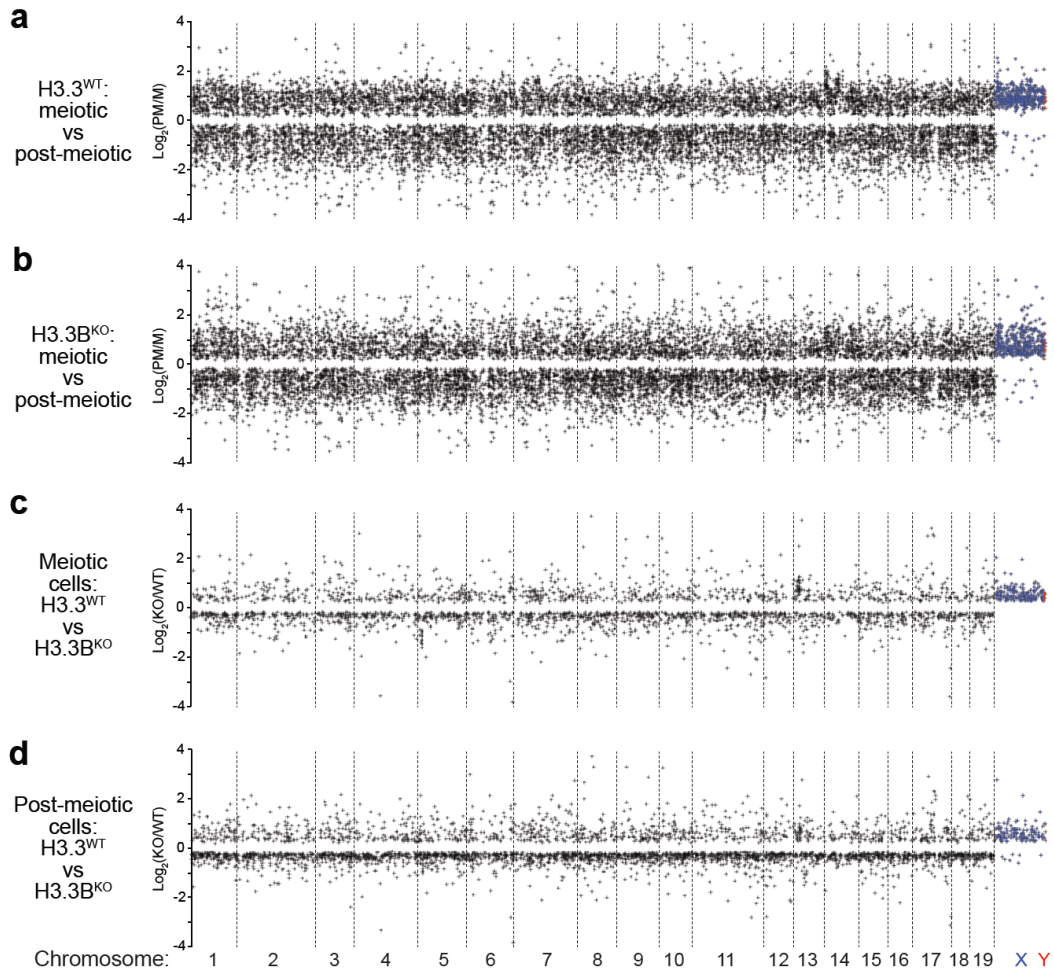


Figure 5. The absence of H3.3 is associated with increased gene expression level of the entire sexual chromosomes. (a-d) Manhattan plots (built on massive RNA-seq data) showing the changes in the expression level of individual chromosomes in the meiotic/post-meiotic transition in the presence (a) or absence (b) of H3.3B. The c and d graphs reveal the alterations in the expression pattern of individual chromosomes in the absence of H3.3B in meiotic and post-meiotic cells, respectively. Note that all chromosomes, except the sexual ones, show both up-regulation and down-regulation of expression in the absence of H3.3B. The genome wide expressions of the sex chromosomes are only up-regulated. Result but no figure explain.

body formation. Indeed, *Xenopus* sperm decompaction (a process opposite of chromosome condensation) in *Xenopus* egg extracts correlates with the recruitment of γ H2AX and γ H2AX is present in both actively dividing, unperturbed embryos in the absence and presence of DNA damage^{34,35}. The claims on the involvement of H3.3 in the chromosome X inactivation could be similarly criticized, since there are no reported data on the casual relationship between the accumulation of H3.3 on the sexual body and the repression of the transcription of the sexual chromosomes in meiosis.

Herein, we used a battery of genome wide methods to analyze in depth the role of H3.3 in spermatogenesis. Transcriptome studies revealed very limited clustering of the affected genes by the absence of H3.3B in both meiotic and post-meiotic cells, suggesting a minor implication of H3.3B in the control of specific genes at the genome-wide scale. Our immunofluorescence and ChIP-seq experiments showed a very strong (exceeding four-fold in meiotic cells) enrichment of the endogenous H3.3 on the whole sexual body, a result in agreement with the past report where transgenic mouse models, expressing exogenous H3.3, were used³³. We demonstrated that H3.3 is localized uniformly along the sexual chromosomes, in contrast to the autosomes, where sites of H3.3 enrichment were observed, in particular at active promoters and enhancers. More importantly, Manhattan plot analysis revealed that the absence of H3.3B is associated with selective up-regulation of the expression of the whole sexual chromosomes. This study therefore demonstrates unequivocally for the first time specific transcriptional repression induced by H3.3 in the sexual chromosomes during spermatogenesis. Since both sexual chromosomes are, compared to the autosomes, less accessible to micrococcal nucleases, this could reflect an H3.3-mediated higher compaction of both X and Y chromosomes associated with the uniform distribution pattern of H3.3 along their length. Xist, a long non-coding RNA, is coating the X-chromosome along its entire length and is a major effector in its inactivation during mammalian development³⁶. Our data show that H3.3 is playing similar to Xist role, but during spermatogenesis. Therefore, Nature has chosen two fundamental different effectors to inactivate the X chromosome: a long RNA (Xist) and the histone variant H3.3 during mammalian embryogenesis and spermatogenesis, respectively. Of note, alterations of sexual chromosomes expression were correlated with male infertility and sperm head anomalies^{37,38} which is in full agreement with our data showing male infertility and strongly altered morphology of the spermatozoa of the H3.3B null mice.

We have also analyzed the expression of the repetitive elements during spermatogenesis. The meiotic/post-meiotic transition was associated with massive repression of the repetitive elements. H3.3 was found enriched only on two families of repetitive elements, the RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons, that are likely implicated in infertility^{25,39}. Depletion of H3.3B led to up-regulation of both retrotransposons in both meiotic and post-meiotic cells. This suggested that H3.3B, as in the case of sexual chromosomes, is playing a repressive role in the regulation of expression of RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons.

Our ChIP-seq data clearly demonstrated that the piRNA clusters are highly enriched of H3.3. The H3.3 enrichment followed the expression level of the clusters. Depletion of H3.3B led, in contrast to the case of sexual chromosomes and RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons, to large diminution of the expression of piRNA, suggesting that the presence of H3.3B assisted piRNA expression. The observed phenotype of infertility of *H3.3B*^{KO} male is therefore due to “convergent” defects: upregulation of genes located in sexual chromosome,

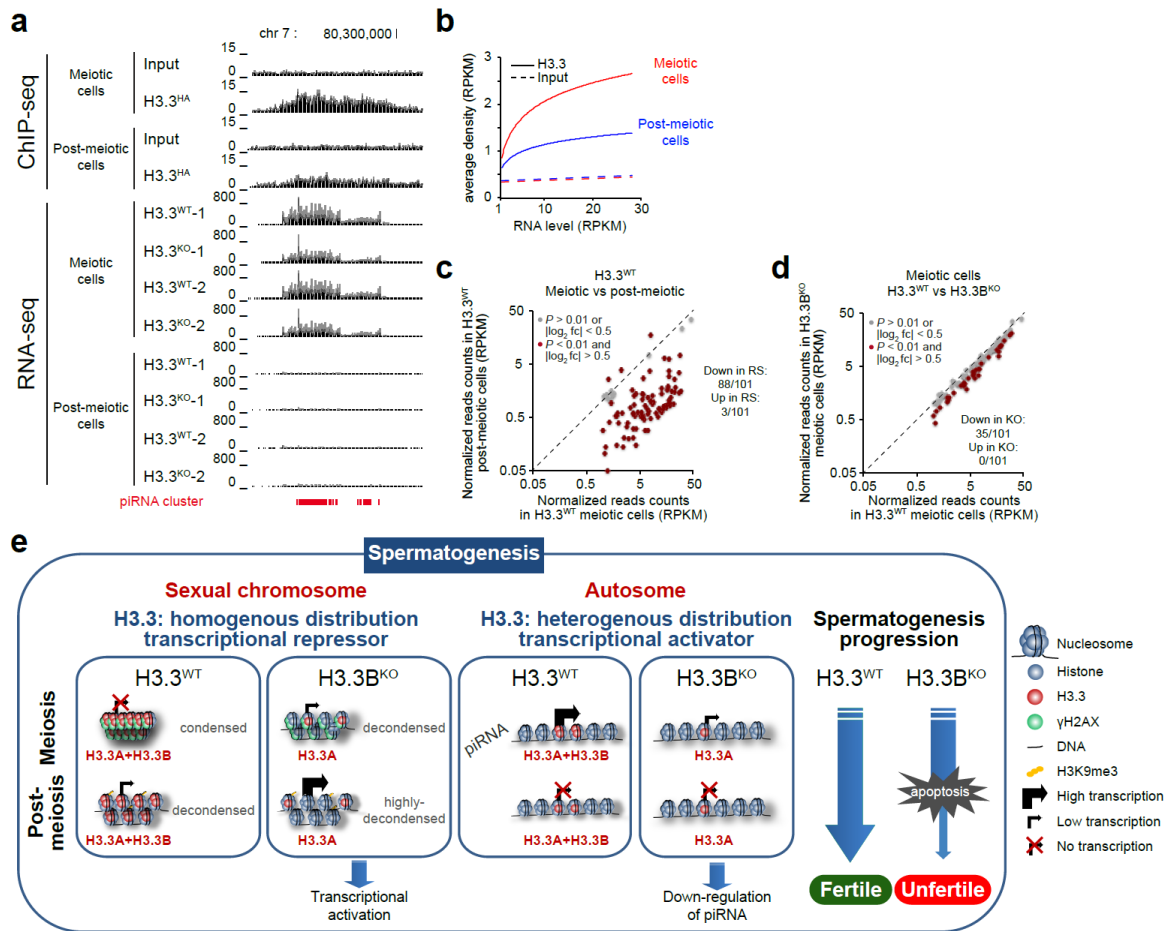


Figure 6. H3.3 regulates the expression of piRNA in meiotic cells. (a) upper part. Example of strong H3.3 enrichment on piRNA cluster located on chromosome 7 in both meiotic and post-meiotic cells. Double immunoaffinity purification of the HA-FLAG-tagged H3.3 mononucleosomes, followed by massive sequencing of “immunopurified” nucleosomal DNA (ChIP-seq) were carried out to determine the genome-wide localization of H3.3; lower part, expression profiles (RNA-seq) of the indicated piRNA cluster (indicated in red) from chromosome 7 in H3.3^{WT} and H3.3^{KO} meiotic and post-meiotic cells. In both cases two biologically independent experiments were presented. (b) The genome-wide expression level of piRNA clusters positively correlates with the amount of associated H3.3 for both meiotic and post-meiotic cells. (c) The meiotic/post-meiotic transition is associated with massive repression of the piRNA clusters. (d) The absence of H3.3B is accompanied with repression of the expression of the piRNA clusters in meiotic cells. (e) Schematics depicting the dual role of H3.3 in spermatogenesis.

upregulation of RLTR10B-RLTR10B2 retrotransposons and down regulation of piRNA pathway. It is worth noting that any of these defects, when occurs alone, leads to infertility³⁷⁻³⁹

In summary, our data show a specific implication of H3.3B in spermatogenesis. Since both H3.3A and H3.3B have identical amino-acid sequence, we speculated that this implication of H3.3B reflects the higher amount of this protein compared to H3.3A during spermatogenesis. Indeed, H3.3B represents roughly 70% (**Supplementary Fig. 5c**) of the total H3.3. In addition, depletion of H3.3B, did not affect the expression level of H3.3A (**Supplementary Fig. 5 a,b**), further supporting our hypothesis.

Notably, our data reveal that H3.3B could play either a repressive role or could assist expression (**Fig. 6e**) in the same cell types. The repressive role of H3.3B is exemplified in the case of the sexual chromosomes and the RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposon families. However, H3.3B assists the expression of the piRNA at genome-wide level. This very interesting phenomenon illustrates the “Janus” (double face) role of H3.3. This suggests that H3.3B might have intrinsic ability to affect in a distinct way chromatin structure depending on its distribution pattern, abundance, post-translational modifications and assembly of specific local nucleosome organization (**Fig. 6e**). Alternatively, H3.3B could be viewed simply as a “replacement” histone, that the spermatogenic cell uses to replace the conventional H3 at specific already distinctly organized chromatin structures. This role could be fulfilled since H3.3, in contrast to H3, is expressed at any phase at the cell cycle and the cell could efficiently use such “replacement piece” at any time.

Materials and Methods

Mouse strains

Both H3.3B^{HA} and H3.3A^{HA} mutant mouse lines were established at the Phenomin-iCS (Phenomin – Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France; <http://www.ics-mci.fr/en/>). For the generation of the H3.3B^{HA} line, a 0.5 kb fragment encompassing exon 2 was amplified by PCR (from 129S2/SvPas ES cells genomic DNA) and subcloned in an iCS proprietary vector. This iCS vector contains a LoxP site as well as a floxed and flipped Neomycin resistance cassette. A DNA element encoding the FLAG–FLAG–HA epitope sequence was inserted in frame with the N-terminus of H3.3B. A 4.5 kb fragment (corresponding to the 5’ homology arm) and 3.5 kb fragment (corresponding to the 3’ homology arms) were amplified by PCR and subcloned. The linearized construct was electroporated in 129S2/SvPas mouse embryonic stem (ES) cells. After selection, targeted clones were identified by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot with 5’ and 3’ external probes. Two positive ES clones were injected into C57BL/6N blastocysts, and the male chimaeras derived gave germline transmission. The H3.3A^{HA} mutant mouse line constructed similarly to the H3.3B^{HA} one. However, for the construction of the targeting vector, a DNA fragment, encompassing exon 4 was used. Mice were housed in the mouse facility of the Plateforme de haute Technologie Animale (PHTA, Grenoble, France; agreement number C 38 516 10001, registered protocol no. 321 at ethical committee C2EA-12). Of note, the mice used in the experiments exhibit C57BL/6 genetic background which does not display a subfertile phenotype.

Genomic DNA, isolated from tails, was used for genotyping with following primers: *H3f3a* (allele HA and WT) 5'-ATATCGGATTCAACTAAAACATAAC-3' and 5'-TTTGCAGACGTTTCTAATTCTACT-3', *H3f3a* (allele KO) 5'-ATATCGGATTCAACTAAAACATAAC-3' and 5'-CAGAGACCTGCCTGCCTGCTG-3', *H3f3b* (allele HA and WT) 5'-TCCTCATTCTACCACATGTTCA-3' and 5'-TCAATCTAGGCCTAAGACCAAA-3', *H3f3b* (allele KO) 5'-TCCTCATTCTACCACATGTTCA-3' and 5'-CTGCCCCGTTCTGCTCGCCGATT-3' at 58°C as annealing temperature.

Mouse *in vitro* fertilization and embryo development

Mouse sperm, obtained by manual trituration of caudae epididymides in M2 (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) for 10 min. Sperm were allowed to swim for 10 min at 37 °C in 1 ml of M2 medium. Sperm were centrifuged at 300 g before washing with M16 medium (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France), and their concentration adjusted for further use. Sperm were then capacitated in M16 medium with 2% fatty acid-free BSA at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 45 min prior IVF.

Oocytes were collected from mature OF1 females, synchronized by exposure to 5 units of pregnant mare serum Gonadotropin (PMSG) and 5 units of human chorionic gonadotropin (hCG). Washed sperm were introduced into droplets containing 25 to 50 oocytes. Oocytes were incubated with: 1.5×10^5 to 5×10^5 capacitated sperm/ml (37 °C, 5% CO₂) in M16 medium, and unbound sperm were washed away after 4 h incubation. The number of 2-cell embryos were scored 24 h after insemination and transferred in KSOM medium for further pre-implantation development. Blastocysts were scored at 3.5 days after fertilization.

Computer-assisted motility analysis (CASA)

10 µl of sperm suspension in M2 was immediately placed onto an analysis chamber (Leja Products B.V., Netherlands) of 100 µm depth and kept at 37 °C for microscopic quantitative study of sperm movement. Sperm motility parameters were measured at 37 °C using a sperm analyzer (Hamilton Thorn Research, Beverley). A minimum of 100 motile spermatozoa was analyzed for each assay. Motile sperm were defined by VAP > 1 and progressive sperm were defined by VAP > 30 and STR > 70.

Measurement of sperm vitality. 40 µl of sperm were mixed with 20 µl of eosin 1% diluted in NaCl 9/1000 and 20 µl of nigrosine 10% diluted in NaCl 9/1000. Sperm were then layered onto glass slide and dried. A minimum of 100 spermatozoa was analyzed for each assay.

Sperm morphology analysis.

10 µl of the semen sample was displayed over a slide and dried at room temperature for 10 min, then fixed in Ether/Ethanol 1:1 and stained with Harris-Schorr stain.

Sperm DNA assessment

Chromomycin A3 staining: semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1X and fixed in a methanol/acetic acid (3:1 v/v) solution at 4 °C for at least 30 min. Cells were spread on

Superfrost© slides and air dried at room temperature overnight. Cells were then labeled using a 0.25 mg/mL chromomycin A3 (CMA3) solution in McIlvaine buffer (pH 7) for 20 min, and washed twice for 2 min with McIlvaine buffer. Sperm nuclei were counterstained with a 0.5 µg/mL Hoechst solution for 3 min, and washed in PBS 1X for 3 min before mounting with DAKO mounting media.

Aniline blue: semen samples were washed twice with 5 ml of PBS 1X, 10 µL were spread on a slide, allowed to air dry and then fixed with a 3% glutaraldehyde solution in PBS 1X for 30 min at room temperature. Slides were then incubated for 5 min in water, 10 min in 5% aniline blue diluted in 4% acetic acid solution, twice for 2 min in water, 2 min in 70%, 90% and 100% ethanol solutions and finally for 2 min in toluene.

Germ cell purification

To prepare germ cells, the seminiferous tubules were initially treated with collagenase (1 mg/ml for 15 min at 35 °C) and 3 times washed with ice-cold DMEM, supplemented with 0.5% BSA, 10 mM sodium butyrate. The pelleted material was re-suspended in the same solution and germs cells were dissociated upon pipetting. After washing in PBS 1X and centrifugation at 2,500g for 5 min, the cells were fixed in formalin overnight at 4 °C and stocked in PBS 1X at 4°C.

Immunohistology

Testes and epididymis were isolated from adult mice and were formalin-fixed overnight, dehydrated and paraffin-embedded. Ten serial paraffin sections (10 µm thick) of fixed mouse tissues were deparaffinized in toluene and hydrated through series of 10 min baths of 100%, 90%, 80%, 50% ethanol solution in PBS 1X. The sections were finally washed in PBS 1X. At this stage the slides were used for staining with hematoxylin eosin (Sigma). For immunostaining, the sections were incubated for 40 min at 95 °C in sodium citrate 10 mM pH 6 (Sigma), 0.05% de Tween 20 (Carlo Erba) and blocked with 5% dried milk in PBS for 1 h at room temperature. The acrosomes were stained in red by incubation during 1 h at 37 °C with lectin PNA alexa 568 (Life Science L32458) diluted 1/500. DNA was counterstained with the Hoechst 33342 (Invitrogen H3570). After washing in PBS 1X, the slides were mounted in fluorescent mounting medium (Dako). The sections were then observed with Zeiss Axio Imager Z1 microscope with a Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objective. Images were acquired with a Hamamatsu Orca Flash the camera with Zeiss Axiovision 4.8.10 software.

Immunostaining of germ cells

Germ cells were spread out on a slide, dried for 2 h at room temperature, rehydrated in PBS 1X for 5 minutes and incubated for 40 min at 95 °C in 10 mM sodium citrate pH 6 (Sigma), 0.05% de Tween 20 (Carlo Erba). Next, they were permeabilized with 0.1% Triton-X at room temperature for 30 min. After blocking in 5% dried milk and washing in PBS 1X, the cells were incubated in 1% dried milk for 1 h at 37 °C in a humidified chamber using the following antibodies: HA 1/800^e (Roche 1867423), H3 1/200^e (Millipore 05-928), H4 1/200^e (Abcam ab10158), γH2AX 1/500^e (Abcam ab81299), H3K9me3 1/600^e (Abcam ab8898), H3.3 1/100^e (Millipore 09-838). After washes in PBS 1X for 30 min at room temperature, a secondary cyanine 2 or cyanine 3 antibodies were applied for 30 min at room temperature in 1% fetal bovine serum, PBS 1X. All samples were incubated for another 5 min in Hoechst 33342 (Invitrogen H3570) to counterstain DNA.

Of note, immunostaining with the 1/100^e CD9 (BD pharmagen 553758) antibody was performed immediately drying the germ cells for 2 h at room temperature and their

rehydration in PBS 1X for 5 min. The slides were then blocked with 10% bovine fetal serum for 1h at room temperature and subsequently incubated in humidified chamber with the antibody for 1 h at 37 °C.

All microscopy visualization of the germ cells was performed using a Zeiss Axio Imager Z1 microscope apotome module. The fixed germ cells were observed with a Plan-Apochromat ×63 objective and the Zeiss Axiocam camera. The meiotic and the post-meiotic cells were identified by their distinct nucleus morphology after DAPI staining^{31,37}. γH2AX staining was used for the identification of sexual chromosomes⁴⁰. Germ stem cells were identified by CD9 antibody⁴¹.

TUNEL test

TUNEL test was carried out on both semen and deparaffinized testis sections. Semen samples were washed twice with 5 mL of PBS 1X and fixed in a methanol/acetic acid (3:1 v/v) solution at 4 °C for at least 30 min. Cells were spread on Superfrost© slides and air dried at room temperature overnight. Cells and sections were permeabilized using 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium citrate in PBS 1X for 2 min and labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxy-UTP nick end labeling (TUNEL) according to the protocol provided with the In Situ Cell Detection Kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Nuclei were counterstained with 0.5 µg/mL Hoechst solution for 3 min, washed in PBS 1X for 3 min and mounted with DAKO mounting media. All testes section image were performed with Zeiss Axio Imager Z1 microscope with a Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 objective. Images were acquired with a Hamamatsu Orca Flash the camera with Zeiss Axiovision 4.8.10 software and analyzed with Zen Office 2.3 lite. Cell type identification and tubule seminiferous stage were performed according to^{42,43} in using serial section labeling with PNA-lectin.

Fractionation of spermatogenic cells

The fractionation of the spermatogenic cells was carried out essentially by using the available protocol^{44,45}. Briefly, male mice were euthanized and testes were recovered. After the removal of albuginae, seminiferous tubules were incubated in a 1 mg/ml collagenase solution for 15 min at 35°C. After centrifugation, collagenase-treated cells were suspended in 0.5% BSA-DMEM medium. The aggregates were dissociated by rapid pipetting for 10 min and filtered through a 100 µm filter. The total germ cell suspension was loaded on the top of a 2%-4% BSA gradient. The cells were let to sediment for 70 min. Cell fractions were collected and processed for examination with a phase contrast microscope. Meiotic and post-meiotic cell fractions (mainly round spermatids) were pooled and used for further analysis. The post-meiotic fraction contains only small contaminations of elongated spermatids.

qPCR

Reverse transcriptase (RT) quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to measure RNA expression levels of the studied genes. Total RNA was isolated from seminiferous tubules of one mouse in 1 ml of TRIzol (Invitrogen) using Nucleospin RNA (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Reverse-transcribed was realized with iScript (Biorad) and random hexamer and poly-dT primer mix. *Rer1* (retention in endoplasmic reticulum 1 protein) was used as the internal reference gene. Supermix SYBR Green iTaq

Universal (BioRad) and C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) real-time system were used. qPCR cycling conditions were as follows: 30s at 95 °C and 40 times 5s 95 °C, 30s 60 °C . The specific primers used were: *Rer1*-F 5'-GCCTTGGAATTTACCACCT, *Rer1*-R 5'-CTTCGAATGAAGGGACGAAA-3' (Thomas et al., 2014), *H3f3a*-F 5'-ACAAAAGCCGCTCGCAAGAG-3', *H3f3a*-R 5'-ATTTCTCGCACCAGACGCTG-3', *H3f3b*-F 5'-TGGCTCTGAGAGAGATCCGTCGTT-3', *H3f3b*-R 5'-GGATGTCTTTGGGCATGATGGTGAC-3' (Ors et al., 2017), *Prm1*-F 5'-ATGCTGCCGCAGCAAAAGCA-3', *Prm1*-R 5'-CACCTTATGGTGTATGAGCG-3', *Prm2*-F 5'-ATGGTTCGCTACCGAATGAG-3', *Prm2*-R 5'-TTAGTGATGGTGCCTCCTAC-3', *Tnp1*-F 5'-ATGTCGACCAGCCGCAAGCT-3', *Tnp1*-R 5'-TCACAAGTGGGATCGGTAAT-3'.

Western blot

Germ cells were isolated from seminiferous tubules and collected in 1 ml TRIzol (Life Technologies). After protein extraction with TRIzol protocol, 20 µl of sample was loaded and separated on 15% SDS-PAGE. Proteins were detected using anti-H3 1:5000^e (Millipore 05-928) and anti-HA 1:2500^e (Abcam ab9110). The Western blot was carried out as described ^{46,47}.

Native ChIP-seq

Micrococcal nuclease preparation and double-immunoaffinity purification of native FLAG-HA tagged mononucleosomes. Meiotic and post-meiotic cells expressing FLAG-HA tagged endogenous H3.3 were lysed in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.65, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl) and disrupted by Dounce homogenizer. The cytosolic fraction was separated from the nuclei by centrifugation at 4°C. Nuclei were re-suspended in sucrose buffer (20 mM Tris-HCl at pH 7.65, 15 mM KCl 60 mM NaCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine) adjusted with high-salt buffer (20 mM Tris-HCl at pH 7.65, 25 % glycerol, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 900 mM NaCl) to get a final NaCl concentration of 300 mM. The nuclear-soluble fraction was recovered by centrifugation at 4°C. The pellet containing chromatin fraction was incubated in sucrose buffer containing 1mM CaCl₂, and MNase (2.5U/g of cells) 10 min at 37°C. Digestion was stopped with 4 mM EDTA and mononucleosomes were recovered by centrifugation at 4°C. Tagged nucleosomes were immunoprecipitated with anti-FLAG M2-agarose (Sigma), eluted with FLAG peptide (0.5 mg/mL), further affinity-purified with anti-HA antibody-conjugated agarose, and eluted with HA peptide (1 mg/mL). The HA and FLAG peptides were first buffered with 50 mM Tris-Cl (pH 8.5), then diluted to 4 mg/mL in TGEN 150 buffer (20 mM Tris at pH 7.65, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.01% NP40), and stored at -20°C until use. Between each step, beads were washed in TGEN 150 buffer. Nucleosomes were submitted to RNase and proteinase K digestion, and DNA was extracted by phenolchloroform.

Library construction and sequencing. Libraries were prepared using the Diagenode MicroPlex Library Preparation kit version v.2 02.15, and sequenced on Illumina Hiseq 4000 sequencer as single-end 50 bp reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Adapter dimer reads were removed using DimerRemover v0.9.2

(<https://sourceforge.net/projects/dimerremover/>). Reads were mapped to the mouse genome (mm9) using Bowtie ⁴⁸ v1.0.0 with the following arguments: -m 1 --strata --best -y -S -l 40 -p 8.

Computational analyses. Heatmaps and quantifications of the ChIP-seq data were performed running seqMINER ⁴⁹, using datasets normalized to 10 million uniquely mapped reads. As reference coordinates, we used the Ensembl 67 database (for coding genes) of the mouse genome (mm9) and the piRNA cluster database generated by the small RNA group Mainz University (<http://www.smallrnagroup.uni-mainz.de/piRNAclusterDB.html>) after having translated mm10 coordinates to mm9 using liftOver (UCSC: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>). For chromosome coverage analysis, the number of reads for each non-overlapping 40Kb windows of the Mouse genome (mm9/NCBI37) was computed for each sample using BEDtools v2.26 ⁵⁰. Then, data were normalized to 10 million reads and plots were generated using custom R scripts.

RNA-seq

Library construction and sequencing. After isolation of total cellular RNA from *H3.3^{WT}* and *H3.3B^{KO}* meiotic and post-meiotic cells, libraries of template molecules suitable for strand specific high throughput DNA sequencing were created using “TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Guide” (PN 15031048). The libraries were sequenced on Illumina HiSeq 4000 sequencer as single-end 50 base reads following Illumina's instructions. Image analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Adapter dimer reads were removed using DimerRemover. (<https://sourceforge.net/projects/dimerremover/>). Reads were mapped onto the mm9 assembly of the mouse genome by using Tophat version: tophat-2.0.14 ⁵⁰ and the bowtie version bowtie-2-2.1.0 ⁴⁸. Only uniquely aligned reads have been retained for further analyses.

Gene expression analysis. Quantification of gene expression has been performed using HTSeq-0.6.1 (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq>) and gene annotations from Ensembl release 67. Read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber ⁵¹. Comparisons of interest were performed using the method proposed by ⁵² implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.14.1). Independent filtering based on the mean of normalized counts was performed in order to filter out those genes that have no or little chance of showing significance evidence of differential expression (without looking at their statistic). Indeed, genes with very low counts are not likely to be significantly differentially expressed typically due to high dispersion. This independent filtering results in increased detection power. Genes with high Cook's distance were also filtered out. Cook's distance is a measure of how much a single sample is influencing the fitted coefficients for a gene, and a large value of Cook's distance is intended to indicate an outlier count. Resulting p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method ⁵³. The following thresholds have been used to select significantly differentially expressed genes:

- p-value adjusted for multiple testing < 0.01
- |log2 Fold-Change| > 1

piRNA cluster expression analysis. Using IntersectBed from BEDTools release v2.26.0, split-mapped reads and reads that overlap genes annotated by Ensembl were removed (IG_C_gene, IG_D_gene, IG_J_gene, IG_V_gene, Mt_rRNA, Mt_tRNA, polymorphic_pseudogene, protein_coding, pseudogene, rRNA). The region corresponding to those genes

was extended to 3kb upstream of the transcription start site and 10 kb downstream of the transcript end site, in order to minimize signal from polymerase read-through from genic transcripts. The overlap was performed on the opposite strand as the library preparation protocol used to construct these RNA-seq libraries leads to sequence the strand generated during first strand cDNA synthesis. Quantification of piRNA cluster expression has been performed using IntersectBed from BEDTools release v2.26.0q. piRNA read counts were added to those of gene expression's and used as follows: read counts were normalized across libraries with the method proposed by Anders and Huber⁵¹. Comparisons of interest were performed using the method proposed by Love et al.⁵² implemented in the DESeq2 Bioconductor library (DESeq2 v1.14.1). The following thresholds have been used to select significantly differentially expressed piRNA clusters:

- p-value adjusted for multiple testing < 0.01
- |log2 Fold-Change| > 0.5

DNA repeat expression analysis. Repeat analysis was performed following the methodology described in Papin et al.²³. Data were normalized based upon library size. Significance of the difference of repeat read counts between RNA samples was assessed using the Bioconductor package DESeq. To avoid over- or underestimating fold enrichments due to low sequence representation, repeat families with less than 5 RPM (reads per million mapped reads) per RNA sample were excluded from further analysis. The following thresholds have been used to select significantly differentially expressed DNA repeats:

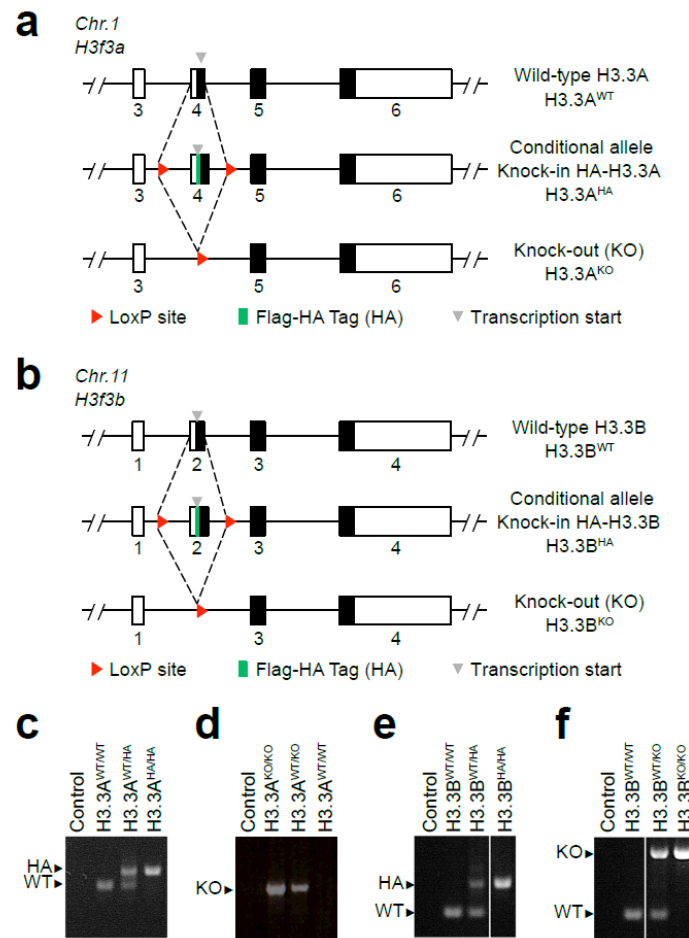
- p-value adjusted for multiple testing < 0.01
- |log2 Fold-Change| > 0.5

Acknowledgments

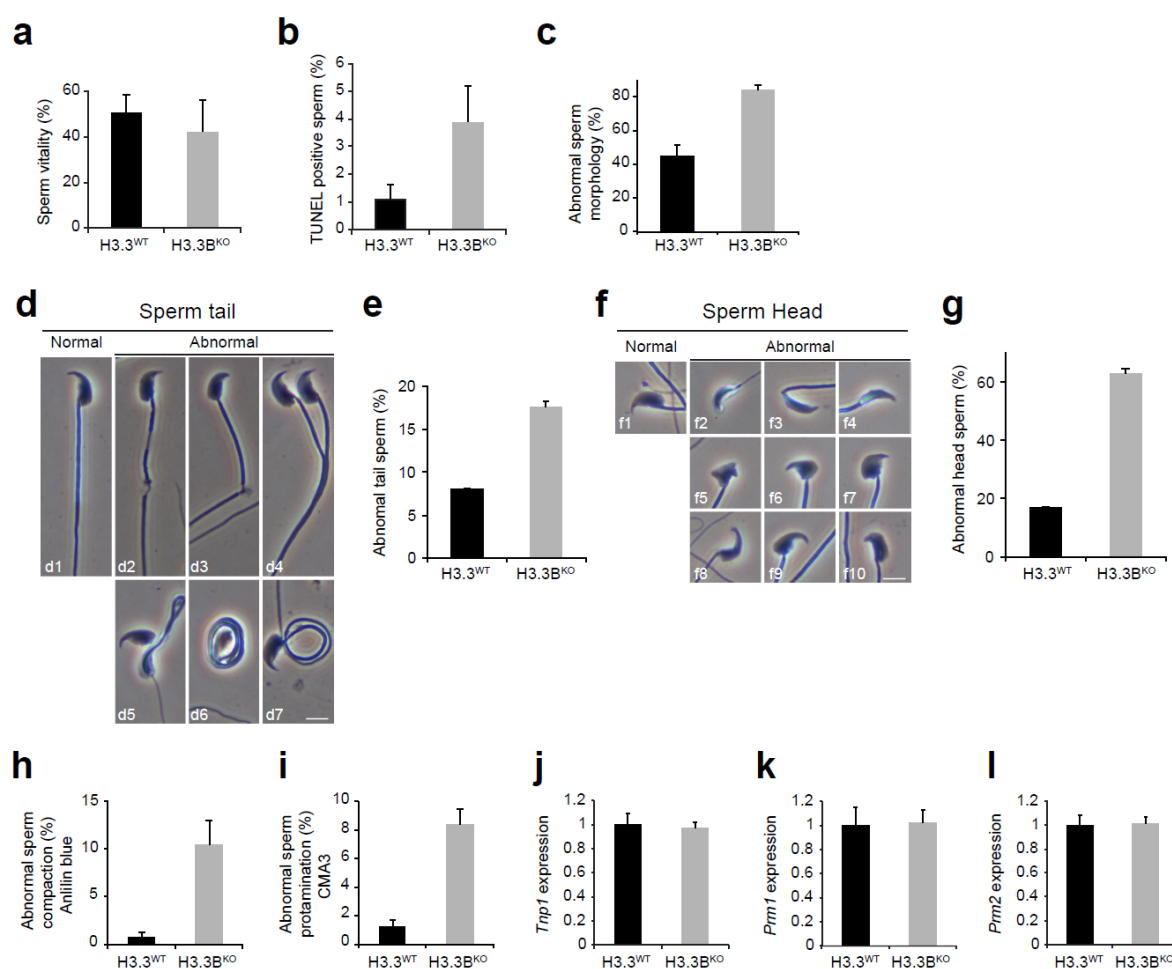
This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (Programme “Epigénétique et Stabilité du Genome”), the Institut National du Cancer, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre National pour la Recherche Scientifique, Université Grenoble Alpes, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Agence Nationale pour la Recherche (Chromcomp, Chrome, Chrom3D and EPIVAR.Z grants) and INCA (PLBIO15-245). Sequencing was performed by the IGBMC Microarray and Sequencing platform, a member of the ‘France Génomique’ consortium (ANR-10-INBS-0009). All fluorescence and hematoxylin-eosin images were taken using the microscopes of the microscopy platform MicroCell of the Institute for Advanced Biosciences.

Data access

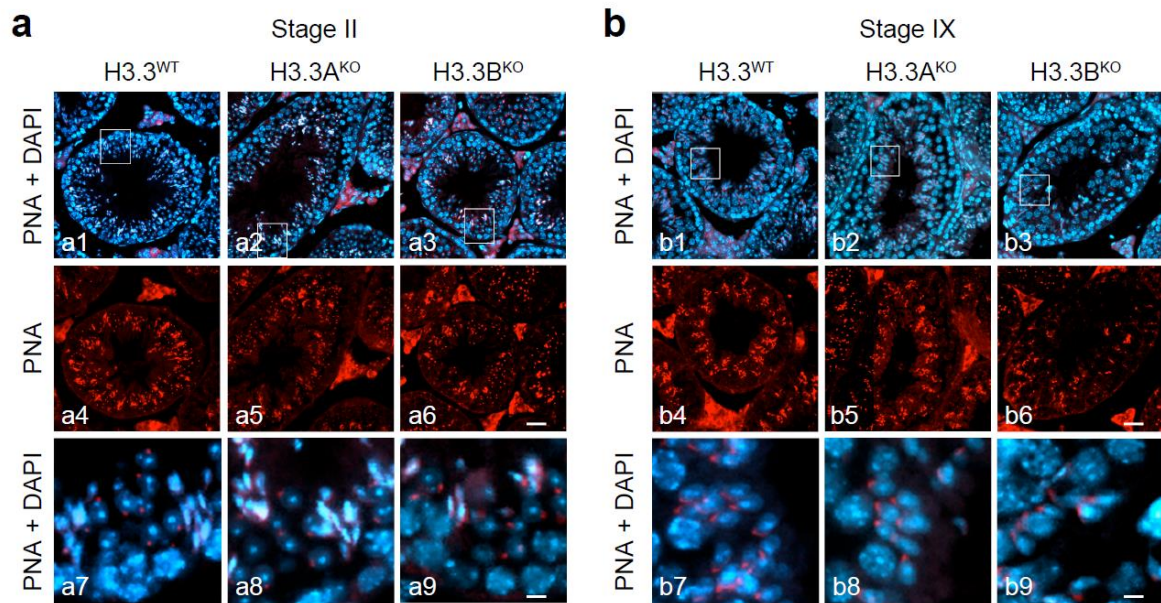
The ChIP-seq and RNA-seq datasets have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number GSE116373.



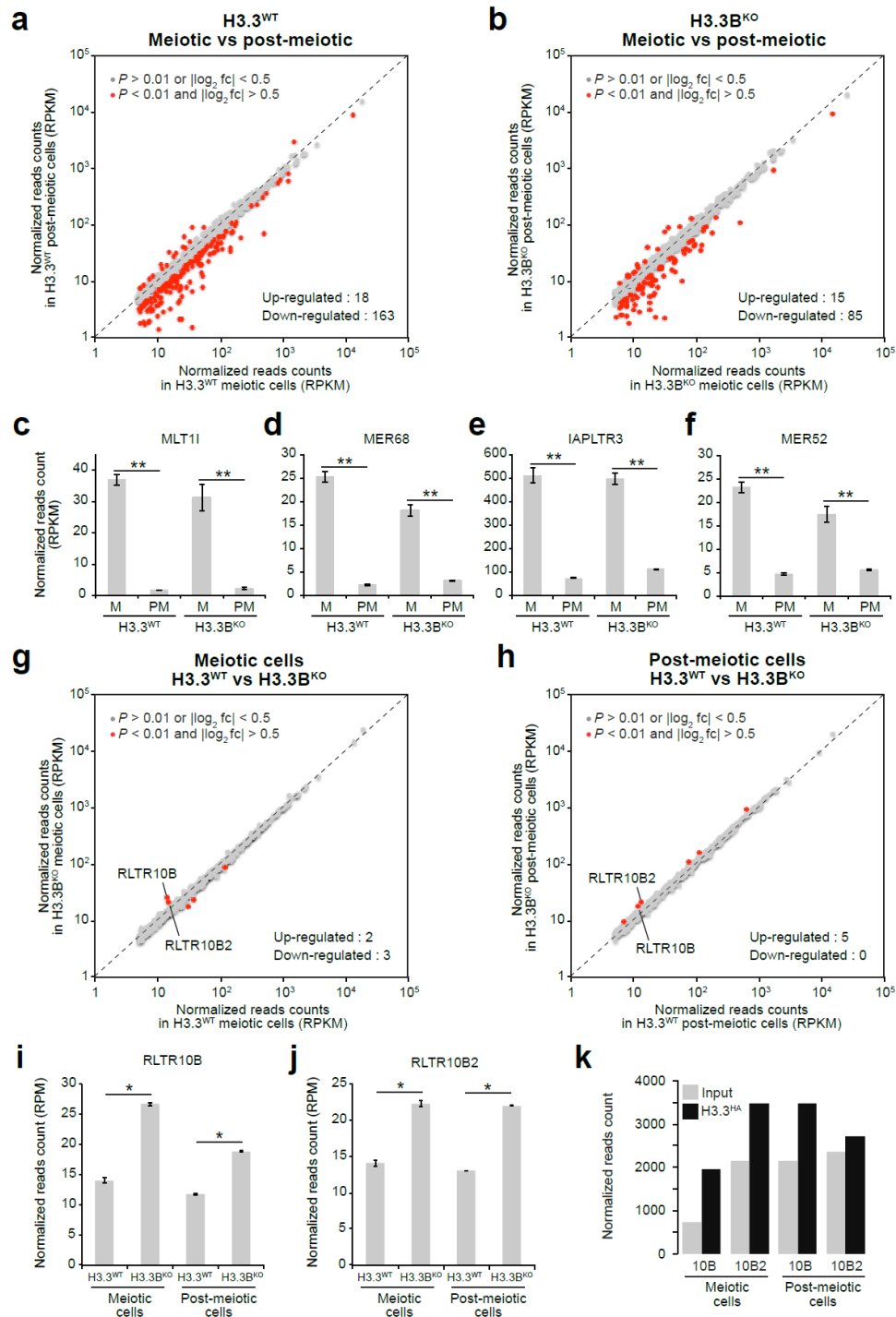
Supplementary Figure 1. Generation of $H3.3A^{KO}$ and $H3.3B^{KO}$ mouse models (a) Generation of H3.3A knock-out mice ; upper panel, wild-type *H3f3a* gene structure. The open reading frame is indicated by black boxes ; middle panel, a DNA element encoding the FLAG–FLAG–HA amino acids was inserted in frame with the N-terminus of H3.3A ($H3.3A^{HA}$). In addition, a loxP site was inserted on both ends of Exon 4 ; lower panel, structure of the H3.3A knock-out ($H3.3A^{KO}$), after Cre recombinase expression, which deleted exon 4 and generated loss of function (KO) allele, $H3f3a^{-/-}$. (b) Generation of H3.3B knock-out mice ; upper panel, structure of the wild-type *H3f3b* gene. The black boxes indicate the open reading frame ; middle panel, a DNA element encoding the FLAG–FLAG–HA amino acids was inserted in frame with the N-terminus of H3.3B ($H3.3B^{HA}$). On both ends of Exon 2 were inserted loxP sites; lower panel, structure of the H3.3B knock-out ($H3.3B^{KO}$), after Cre recombinase expression. The expression of the Cre recombinase led to both deletion of exon 2 and generation of loss of function (KO) allele, $H3f3b^{-/-}$. (c) Genotyping of the indicated mouse lines. The bands corresponding to the PCR-amplified DNA fragment from the various H3.3 genes are indicated.



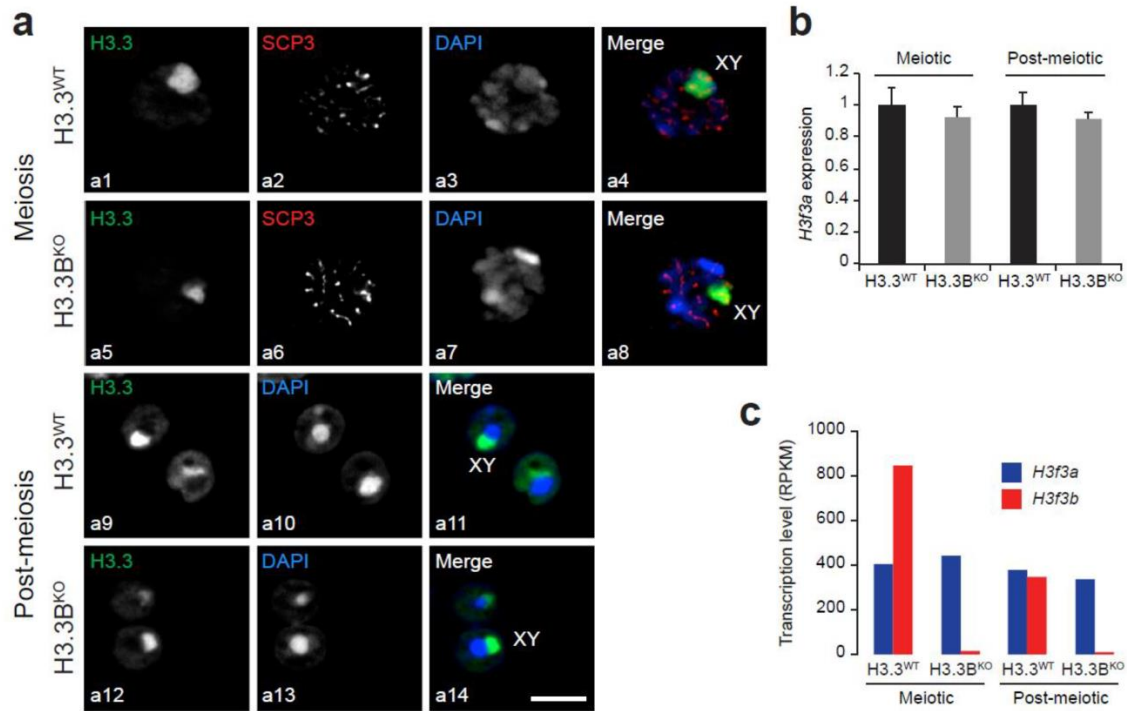
Supplementary Figure 2. (a) H3.3B null males exhibit slightly reduced sperm vitality, (b) increased DNA fragmentation, (c) strongly altered morphology, (d,e) including flagella anomalies, (f,g) head anomalies, (h) impressive (increasing from 1% to 10%) DNA decompaction, and (i) smaller amount of associated protamine. (j) Since the expression of transition protein (*Tnp1*) and both protamine 1 (k) and protamine 2 (l) were not altered, the smaller amount of incorporated protamines could reflect the altered ability of protamines to associate with sperm DNA in the absence of H3.3B. (Scale bars, 5 μ m)



Supplementary Figure 3. The absence of H3.3B results in a decreased number of post-meiotic cells. (a-b) Acrosome visualization by PNA staining (red) in WT, H3.3A and H3.3B null testis sections at stage II (a) and stage IX (b). DNA is stained with DAPI. (Scale bars, 70 μ m and 30 μ m)



Supplementary Figure 4. Genome-wide transcriptome analysis of the repetitive elements in meiotic and post-meiotic cells in the absence of H3.3B. (a,b) Scatter plots comparing repetitive elements expression profiles of H3.3^{WT} meiotic and post-meiotic cells in the presence (a) or absence (b) of H3.3B. Red dots indicate differentially expressed repetitive elements. (c-f) Examples of silencing of retroelements in post-meiotic cells relative to meiotic cells in H3.3^{WT} and H3.3B^{KO} males. The family of the repetitive elements are indicated. ** $P < 10^{-60}$. (g,h) Scatter plots comparing repetitive elements expression profiles of H3.3^{WT} versus H3.3B^{KO} in meiotic (g) and post-meiotic cells (h). Red dots indicate differentially expressed repetitive elements. (i, j) The absence of H3.3B is associated with an increased expression level of both RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposon families in both meiotic and post-meiotic cells. * $P < 10^{-10}$. (k) RLTR10B and RLTR10B2 repetitive elements are enriched in H3.3 in both meiotic and post-meiotic cells.



Supplementary Figure 5. The deletion of H3.3B does not affect the level of expression of H3.3A in both pachytene spermatocytes and round spermatids. (a) Visualization of H3.3 in pachytene spermatocytes and round spermatids from WT and H3.3B^{KO} mice. Commercially available anti-H3.3 antibody was used for the staining of H3.3. Anti-SCP3 antibody was used for the identification of pachytene spermatocytes. The round spermatids were identified by the very compacted chromatin visualized by DAPI staining. (Scale bars, 8 μ m) (b) RT-qPCR of *H3f3a* messenger RNA isolated from control and null H3.3B meiotic (left) and control and null H3.3B post-meiotic cells (right). (c) H3.3B is largely over-expressed compared to H3.3A in both meiotic and post-meiotic cells. Bar-graph representing H3, *H3f3a* and *H3f3b* expression in meiotic and post-meiotic cells.

Ensembl gene id	Gene name	Chromosome name	Start position	End position	log2(KO/WT)	p-value
ENSMUSG00000016559	H3f3b	11	115883226	115889276	-5,719944177	0
ENSMUSG00000085077	1700049E15Rik	6	147638763	147650896	-3,836108005	3,20E-27
ENSMUSG00000024254	Abcg8	17	85075642	85099673	-3,607561634	3,73E-38
ENSMUSG00000066107	Gm12666	4	91857435	91858440	-3,578215658	6,88E-35
ENSMUSG00000030223	Ptpro	6	137200820	137413150	-2,99035445	4,21E-60
ENSMUSG00000087092	4930511A02Rik	12	11445039	11451618	-2,835383348	2,50E-61
ENSMUSG00000055805	Fmn1l	11	103032421	103060215	-2,718820689	2,56E-40
ENSMUSG00000005952	Trpv1	11	73047794	73074744	-2,451276888	1,81E-32
ENSMUSG00000033855	Ston1	17	88997024	89061926	-2,449226886	4,82E-72
ENSMUSG00000055978	Fut2	7	52903965	52921764	-2,204133965	7,41E-07
ENSMUSG00000034427	Myo15b	11	115722926	115753917	-2,091296967	2,43E-35
ENSMUSG00000086135	1700001J04Rik	11	114046753	114048091	-2,080758692	6,04E-06
ENSMUSG00000019936	Epyc	10	97106702	97145088	-2,054869901	1,70E-90
ENSMUSG00000001566	Mnx1	5	29799578	29805059	-1,99241943	7,97E-05
ENSMUSG00000091813	Ces2h	8	107538350	107544310	-1,980959844	9,64E-07
ENSMUSG00000086257	4930548K13Rik	4	26562967	26632596	-1,954543926	1,72E-05
ENSMUSG00000031805	Jak3	8	74200195	74214474	-1,879614179	9,13E-25
ENSMUSG00000061186	Sfmbt2	2	10292137	10516880	-1,873230793	3,41E-106
ENSMUSG00000030093	Wnt7a	6	91313975	91361357	-1,848076894	7,69E-10
ENSMUSG00000044453	Ffar1	7	31645587	31646489	-1,828557905	0,00416509
ENSMUSG00000087339	Gm11586	11	102006863	102007560	-1,813780253	0,00344646
ENSMUSG00000021411	1300014I06Rik	13	34719709	34744550	-1,813226091	2,01E-39
ENSMUSG00000004105	Angptl2	2	33071589	33103237	-1,796690871	1,35E-13
ENSMUSG00000021280	1200009I06Rik	12	112655228	112669393	-1,793086351	5,35E-10
ENSMUSG00000005198	Polr2a	11	69547499	69572139	-1,757673675	1,11E-23
ENSMUSG00000089796	Gm16575	15	79570004	79572228	-1,754972644	0,000523807
ENSMUSG00000078137	Gm1337	2	118524839	118529699	-1,753846049	3,93E-15
ENSMUSG00000067242	Lgi1	19	38339272	38383429	-1,693699921	0,001537769
ENSMUSG00000091721	Gm5549	3	132297689	132307595	-1,658136593	0,001577823
ENSMUSG00000043192	Gm1840	8	5639584	5640996	-1,65085601	1,71E-08
ENSMUSG00000091602	Gm8879	5	11127634	11132487	-1,619040746	2,33E-12
ENSMUSG00000048154	Mll2	15	98662100	98701614	-1,583342065	6,05E-44
ENSMUSG00000044375	BC027072	17	72092897	72102225	-1,573431033	4,17E-26
ENSMUSG00000024354	Slc23a1	18	35774258	35786898	-1,545723172	0,000117748
ENSMUSG00000019893	Ros1	10	51765527	51915050	-1,527259255	1,55E-10
ENSMUSG00000091389	Speer1-ps1	5	11341541	11346286	-1,486548067	1,16E-16
ENSMUSG00000020377	Ltc4s	11	50049971	50052118	-1,478029495	2,01E-07
ENSMUSG00000091720	Gm8890	5	11255933	11260789	-1,460580561	9,21E-05
ENSMUSG00000086786	Gm15908	13	34744792	34758643	-1,45842322	4,95E-59
ENSMUSG00000079053	Gm14010	2	128249390	128250301	-1,433738558	2,82E-06
ENSMUSG00000079654	Prmt4	6	29119232	29129584	-1,43317492	0,003448737
ENSMUSG00000000861	Bcl11a	11	23978056	24074123	-1,430654616	7,75E-28

ENSMUSG00000035104	Fam176a	6	81991037	82043093	-1,417738443	0,002187485
ENSMUSG00000049538	Adamts16	13	70866680	70980689	-1,414869041	0,003419909
ENSMUSG00000073226	Gm10482	5	10236829	10237461	-1,408688063	2,01E-12
ENSMUSG00000085548	Gm11753	11	119045267	119045830	-1,407637161	2,99E-06
ENSMUSG00000048217	Nags	11	102006827	102010791	-1,407578535	1,61E-08
ENSMUSG00000084757	1700057H15Rik	4	124091659	124163202	-1,38951757	0,000229357
ENSMUSG00000033615	Cplx1	5	108947573	108979043	-1,384296561	0,004415843
ENSMUSG00000030996	Art1	7	109250257	109259662	-1,365708394	1,63E-19
ENSMUSG00000036938	Try5	6	41261232	41266840	-1,346994489	1,39E-06
ENSMUSG000000091422	4933402N22Rik	5	11846710	11922821	-1,344611495	4,39E-16
ENSMUSG00000048065	Cyb5r2	7	114891969	114901510	-1,330994075	8,11E-21
ENSMUSG00000058056	Palld	8	63992043	64381487	-1,327091478	1,95E-11
ENSMUSG00000085794	Vax2os1	6	83650151	83660926	-1,325479961	7,96E-06
ENSMUSG00000023169	Slc38a1	15	96401849	96473344	-1,325347569	0,000961143
ENSMUSG00000038077	Kcna6	6	126658347	126690680	-1,319996619	0,00951203
ENSMUSG00000038296	Galntl4	7	118615175	118923491	-1,316666162	3,61E-08
ENSMUSG00000025064	Col17a1	19	47720834	47766584	-1,31036234	3,06E-09
ENSMUSG00000020758	Itgb4	11	115836023	115869726	-1,298034467	0,007610385
ENSMUSG00000089871	Speer7-ps1	5	15186528	15220414	-1,295364607	9,48E-24
ENSMUSG00000040495	Chrm4	2	91762346	91769986	-1,291655661	4,17E-12
ENSMUSG00000037336	Mfsd2b	12	4869246	4881165	-1,280629321	3,98E-06
ENSMUSG00000024579	Pcyox1l	18	61856491	61867289	-1,279112919	6,52E-06
ENSMUSG00000087465	Gm13905	2	101712332	101723413	-1,272412952	0,00175506
ENSMUSG00000049409	Prokr1	6	87528587	87540695	-1,266890944	9,24E-05
ENSMUSG00000022206	Npr3	15	11769651	11835429	-1,264522652	1,01E-09
ENSMUSG00000022849	Hspbap1	16	35770472	35828532	-1,258197534	5,12E-28
ENSMUSG00000021175	Cdca7l	12	119042762	119117179	-1,252921254	2,06E-24
ENSMUSG00000031543	Ank1	8	24085316	24260969	-1,249166869	2,62E-05
ENSMUSG00000086272	BC039966	4	153321742	153324612	-1,248601916	2,85E-13
ENSMUSG00000042250	Pglyrp4	3	90530828	90545439	-1,245621854	0,000124666
ENSMUSG00000034552	Zswim2	2	83755236	83781385	-1,236692789	3,68E-83
ENSMUSG00000032816	Igdcc4	9	64949293	64985747	-1,227145436	5,08E-10
ENSMUSG00000022738	Gsc2	16	17913207	17915152	-1,223805813	3,41E-09
ENSMUSG00000003227	Edar	10	58063537	58138402	-1,221549211	0,00107014
ENSMUSG00000086448	9330162012Rik	13	25029270	25033286	-1,212239414	2,12E-06
ENSMUSG00000022237	Ankrd33b	15	31221234	31297514	-1,196042123	0,000501592
ENSMUSG00000021390	Ogn	13	49703440	49719869	-1,195662723	0,001244884
ENSMUSG00000027230	Creb3l1	2	91822485	91864659	-1,188323015	0,007114086
ENSMUSG00000035576	L3mbtl1	2	162769201	162800258	-1,183357669	1,20E-05
ENSMUSG00000006575	Rundc3a	11	102254717	102263869	-1,180396101	7,78E-34
ENSMUSG00000038048	Cntnap5c	17	57908993	58549765	-1,179535022	3,97E-08
ENSMUSG00000029999	Tgfa	6	86145420	86225151	-1,174303472	1,87E-14
ENSMUSG000000091533	Gm6465	5	11845539	11850352	-1,169951966	0,005935033

ENSMUSG00000038872	Zfhx3	8	111238544	111485536	-1,167074014	1,64E-15
ENSMUSG00000008496	Pou2f2	7	25876928	25917531	-1,164584131	1,18E-06
ENSMUSG00000036053	Fmnl2	2	52716894	52993236	-1,16137309	2,04E-16
ENSMUSG00000018698	Lhx1	11	84331479	84339517	-1,160591245	2,27E-06
ENSMUSG00000073418	C4b	17	34865325	34880827	-1,153076178	4,52E-32
ENSMUSG00000087184	Gm11650	11	107655180	107657296	-1,152124059	1,24E-05
ENSMUSG00000092089	Gm8906	5	11502685	11507417	-1,151604184	9,04E-10
ENSMUSG00000061311	Rag1	2	101478439	101489658	-1,145711059	9,76E-05
ENSMUSG00000040187	Arntl2	6	146744577	146782051	-1,144546215	0,000205404
ENSMUSG00000053141	Ptprt	2	161347726	162486883	-1,14355149	2,49E-19
ENSMUSG00000020357	Flt4	11	49422765	49466241	-1,140830185	6,85E-14
ENSMUSG00000022180	Slc7a8	14	55341053	55400723	-1,140438235	3,38E-11
ENSMUSG00000021010	Npas3	12	54349664	55173162	-1,132622926	1,49E-08
ENSMUSG00000028435	Aqp3	4	41039755	41045216	-1,131368622	0,007426749
ENSMUSG00000030935	Acsn3	7	126904437	126931027	-1,127089715	0,007812777
ENSMUSG00000093668	Pou5f2	13	78162174	78165557	-1,126364062	2,00E-31
ENSMUSG00000015653	Steap2	5	5664831	5694578	-1,124670537	4,25E-19
ENSMUSG00000025792	Slc25a10	11	120353154	120360501	-1,118085264	4,32E-48
ENSMUSG00000086606	Gm13205	4	148321601	148323023	-1,115151184	7,46E-07
ENSMUSG00000059412	Fxyd2	9	45207957	45218361	-1,109438133	2,33E-18
ENSMUSG00000030424	Zfp939	7	46728732	46732703	-1,106264632	4,16E-05
ENSMUSG00000073002	Vamp5	6	72318043	72330462	-1,098924803	6,69E-26
ENSMUSG00000091839	Gm17315	17	79754039	79757362	-1,091079845	2,39E-19
ENSMUSG00000084996	Gm11419	11	81798908	81802271	-1,084871353	1,75E-08
ENSMUSG00000093400	RP23-193A2.2	5	72707593	72759287	-1,079996391	0,000978185
ENSMUSG00000000739	Sult5a1	8	125666747	125682215	-1,073627957	0,001496704
ENSMUSG00000029680	Hyal4	6	24698329	24717662	-1,065664309	1,75E-07
ENSMUSG00000091823	Gm8897	5	11184170	11421235	-1,062360957	7,24E-10
ENSMUSG00000006345	Ggt1	10	75024349	75048945	-1,056849554	0,001783308
ENSMUSG00000014791	Elmo3	8	107829501	107835300	-1,052231532	8,94E-05
ENSMUSG00000024598	Fbn2	18	58168277	58369580	-1,050257377	1,14E-47
ENSMUSG00000087452	Gm11998	11	11457424	11479463	-1,048577471	0,009129626
ENSMUSG00000038604	Fam65a	8	108129129	108146094	-1,044632975	0,001121474
ENSMUSG00000064080	Fbln2	6	91162449	91222534	-1,037385515	0,008327842
ENSMUSG00000045165	Al467606	7	134234950	134237563	-1,033545605	4,87E-09
ENSMUSG00000091603	Gm17346	9	34396111	34396889	-1,030217144	5,71E-06
ENSMUSG00000035783	Acta2	19	34315580	34329826	-1,028989031	0,000219024
ENSMUSG00000083218	Gm16425	8	19535904	19538583	-1,020570999	7,67E-28
ENSMUSG00000074355	Gm10676	7	19574903	19578123	-1,017632329	0,001547471
ENSMUSG00000026483	Fam129a	1	153418316	153569069	-1,013732193	1,12E-25
ENSMUSG00000024851	Pitpnm1	19	4099998	4113965	-1,012183936	3,57E-21
ENSMUSG00000079511	Ccdc142	6	83051611	83059933	-1,003272305	5,49E-21
ENSMUSG00000026825	Dnm1	2	32163991	32208849	-1,001727858	3,16E-15

ENSMUSG00000055489	Ano5	7	58766399	58854079	-1,001289503	5,05E-16
ENSMUSG00000069267	Hist1h3b	13	23844136	23844755	1,000028267	3,00E-08
ENSMUSG00000030760	Acer3	7	105362168	105469718	1,005447963	4,04E-24
ENSMUSG00000004730	Emr1	17	57498109	57622952	1,010120811	3,39E-09
ENSMUSG00000026604	Ptpn14	1	191552147	191700574	1,016920448	6,50E-19
ENSMUSG00000027966	Col11a1	3	113733458	113923636	1,01720598	0,000293103
ENSMUSG00000018865	Sult4a1	15	83906527	83936184	1,018823494	0,000879392
ENSMUSG00000087539	Gm13584	2	38215100	38219500	1,022339569	0,002199246
ENSMUSG00000031841	Cdh13	8	120807633	121848821	1,023203711	3,88E-13
ENSMUSG00000033752	Mnd1	3	83891856	83959708	1,024023567	8,19E-07
ENSMUSG00000019889	Ptprk	10	27794626	28317203	1,026087409	1,72E-09
ENSMUSG00000030834	Abcc6	7	53231750	53285672	1,027009561	0,004394483
ENSMUSG00000027070	Lrp2	2	69262397	69424122	1,035063666	3,80E-09
ENSMUSG00000032712	2810474O19Rik	6	149257936	149284180	1,038463446	3,07E-21
ENSMUSG00000048752	Prss50	9	110760471	110767132	1,039101761	3,51E-20
ENSMUSG00000074003	Gucy2d	7	105591931	105625802	1,03928076	6,25E-09
ENSMUSG00000051065	1600021P15Rik	16	28826262	28929784	1,044639583	0,000322526
ENSMUSG00000055639	Dach1	14	98186066	98568984	1,045230143	1,12E-06
ENSMUSG00000089990	Gm15852	1	171862829	171864379	1,050215888	5,18E-09
ENSMUSG00000047189	Gm9818	17	21945153	21945411	1,052364163	2,30E-05
ENSMUSG00000074872	Ctxn2	2	124962428	124973575	1,052509445	0,000206601
ENSMUSG00000051592	Ccnb3	X	6556778	6618745	1,053819773	2,22E-15
ENSMUSG00000063021	Hist1h2ak	13	21845264	21845776	1,056944195	3,57E-12
ENSMUSG00000031273	Col4a6	X	137599946	137908619	1,070162337	4,89E-10
ENSMUSG00000033981	Gria2	3	80488858	80606713	1,073434544	1,47E-06
ENSMUSG00000060639	Hist1h4i	13	22132685	22133221	1,074335535	1,17E-09
ENSMUSG00000013643	2210415F13Rik	11	58192545	58204230	1,07837526	6,52E-06
ENSMUSG00000068219	Ssxb10	X	7904550	7913363	1,082425562	0,00496794
ENSMUSG00000047246	Hist1h2be	13	23675611	23712993	1,084676393	3,44E-09
ENSMUSG00000040033	Stat2	10	127707629	127729905	1,085487077	1,04E-11
ENSMUSG00000051367	Six1	12	74137916	74154874	1,086827947	5,03E-08
ENSMUSG00000041261	Car8	4	8070514	8166188	1,090808422	0,004660329
ENSMUSG00000027394	Ttl	2	128891678	128922019	1,099443551	0,000345506
ENSMUSG00000015709	Arnt2	7	91394791	91558469	1,100329836	1,38E-08
ENSMUSG00000075020	E530001K10Rik	2	94092036	94104915	1,109019813	5,57E-20
ENSMUSG00000041827	Oasl1	5	115373249	115387924	1,109986994	8,14E-05
ENSMUSG00000038372	Gmds	13	31911448	32430483	1,118465278	9,80E-19
ENSMUSG00000036887	C1qa	4	136451832	136454718	1,124087064	0,000137282
ENSMUSG00000070803	Cited4	4	120339168	120340425	1,125838492	5,84E-15
ENSMUSG00000071551	Akr1c19	13	4227946	4247927	1,128176001	2,14E-05
ENSMUSG00000022935	Grik1	16	87896441	88289947	1,129873507	0,000766648
ENSMUSG00000061482	Hist1h4d	13	23673467	23673859	1,133776431	4,39E-35
ENSMUSG00000069274	Hist1h4f	13	23643127	23643517	1,136015043	3,41E-09

ENSMUSG00000051627	Hist1h1e	13	23713624	23714371	1,139419531	2,15E-15
ENSMUSG00000054892	Txk	5	73087217	73144012	1,140748476	0,001849036
ENSMUSG00000025877	Hk3	13	55107346	55122746	1,141520072	1,15E-05
ENSMUSG00000084372	Gm13988	2	123099660	123099947	1,152861539	2,39E-19
ENSMUSG00000091119	Ccdc152	15	3230627	3253526	1,152869251	3,02E-07
ENSMUSG00000001988	Npas1	7	17041070	17062129	1,152976878	9,35E-10
ENSMUSG00000030917	Tmem159	7	127245890	127264506	1,161340448	2,02E-18
ENSMUSG00000090219	4930516K23Rik	7	111147314	111285919	1,16415676	0,005672597
ENSMUSG00000059689	Zfp637	6	117791198	117795974	1,171792875	2,23E-08
ENSMUSG00000032724	Abtb2	2	103406467	103558580	1,172261707	2,15E-22
ENSMUSG00000024155	4930528F23Rik	17	24941327	24976732	1,172329492	1,90E-33
ENSMUSG00000071042	Rasgrp3	17	75835245	75928383	1,191430684	0,000548571
ENSMUSG00000064247	Plcx1	5	110528988	110534972	1,194729397	5,31E-13
ENSMUSG00000049928	Glp2r	11	67475004	67584655	1,197899173	1,84E-09
ENSMUSG00000033831	Fgb	3	82846169	82853725	1,202770741	0,000538888
ENSMUSG00000029369	Afm	5	90947958	90982569	1,203417983	1,75E-08
ENSMUSG00000053693	Mast1	8	87435802	87461258	1,206046728	0,000321646
ENSMUSG00000074403	Hist2h3b	3	96072577	96073064	1,209759809	0,00606317
ENSMUSG00000074346	1700095B22Rik A930024N18Ri k	3	105244513	105255873	1,211332579	0,000256105
ENSMUSG00000085544		17	15511964	15516439	1,216585306	0,000731206
ENSMUSG00000030630	Fah	7	91733669	91755232	1,223922864	4,35E-05
ENSMUSG00000091996	BC049352	9	44990090	45058103	1,242044085	0,000662739
ENSMUSG00000032500	Dclk3	9	111341585	111392115	1,246481883	0,001162543
ENSMUSG00000058550	Dppa4	16	48283848	48294405	1,252387657	0,001055795
ENSMUSG00000069270	Hist1h2ac	13	23773336	23775817	1,266097921	1,84E-17
ENSMUSG00000074060	Fbxw15	9	109455118	109470776	1,266274673	0,00050522
ENSMUSG00000089948	Gm16583	6	148009377	148016395	1,266750453	0,000136671
ENSMUSG00000060081	Hist1h2aa	13	24026331	24026720	1,269961128	8,44E-72
ENSMUSG00000046178	Nxph1	6	8898431	9199032	1,292610939	2,66E-09
ENSMUSG00000056222	Spock1	13	57524451	58008948	1,294058192	0,005071695
ENSMUSG00000022676	Snai2	16	14705945	14709488	1,294220702	2,40E-16
ENSMUSG00000038368	BC057079	4	87740533	88056915	1,299859487	5,71E-69
ENSMUSG00000036896	C1qc	4	136445719	136448980	1,306361767	4,87E-06
ENSMUSG00000025150	Cbr2	11	120590803	120593428	1,309299167	0,005425283
ENSMUSG00000015652	Steap1	5	5736317	5749326	1,310064994	4,38E-11
ENSMUSG00000069814	E130309D14Rik	11	74433107	74455018	1,323775755	2,74E-07
ENSMUSG00000019900	Rfx6	10	51397562	51450235	1,32729694	3,79E-06
ENSMUSG00000038642	Ctss	3	95330708	95360325	1,333297204	0,000216702
ENSMUSG00000041062	Msl1	17	25872985	25885275	1,344500612	0,001262329
ENSMUSG00000050936	Hist2h2bb	3	96073644	96082924	1,346188285	3,00E-25
ENSMUSG00000071753	C230004F18Rik	X	58369561	58429166	1,352624437	0,002906869
ENSMUSG00000066090	Ins1	4	102690477	102699447	1,360753873	6,03E-07
ENSMUSG00000034829	Nxn1	8	74084455	74090548	1,36251596	0,002883908

ENSMUSG00000091705	H2-Q2	17	35479187	35483707	1,362546028	0,006168103
ENSMUSG00000091006	Vmn2r69	7	92554886	92564186	1,375682705	1,12E-06
ENSMUSG00000025202	Scd3	19	44277759	44318506	1,387119119	3,16E-14
ENSMUSG00000082497	Gm40	X	35728464	35730151	1,397936352	1,72E-05
ENSMUSG00000004707	Ly9	1	173518755	173537541	1,398054798	6,97E-16
ENSMUSG00000072584	Gm7489	15	53716461	53718152	1,402384317	3,73E-06
ENSMUSG00000050600	Zfp831	2	174469035	174536333	1,413623505	0,00115022
ENSMUSG00000027403	Tgm6	2	129938152	129979968	1,416732148	0,000978164
ENSMUSG00000025094	Slc18a2	19	59335368	59370502	1,417746652	1,74E-06
ENSMUSG00000073411	H2-D1	17	35399675	35404444	1,420435952	1,12E-25
ENSMUSG00000059546	Vmn1r40	6	89664197	89665129	1,440553333	4,29E-08
ENSMUSG00000080152	Gm12260	11	58775314	58775724	1,461731264	5,92E-79
ENSMUSG00000071984	Fndc1	17	7931434	8020167	1,462572748	4,25E-20
ENSMUSG00000054986	Sec14l3	11	3964844	3977739	1,468838194	9,50E-12
ENSMUSG00000085190	3010027C24Rik	18	83025286	83039996	1,474019634	0,000150272
ENSMUSG00000086337	Gm11535	11	96038865	96040114	1,479252988	5,54E-11
ENSMUSG00000049109	Themis	10	28388166	28603624	1,485748562	6,12E-05
ENSMUSG00000058621	Olfr643	7	111207170	111208114	1,502226692	0,006593571
ENSMUSG00000029189	Sel1l3	5	53498323	53604691	1,50884087	9,65E-19
ENSMUSG00000025776	Crispld1	1	17717126	17756425	1,524663145	5,78E-22
ENSMUSG00000046491	C1qtnf2	11	43287778	43305027	1,525334213	9,47E-08
ENSMUSG00000069516	Lyz2	10	116714390	116719377	1,554915109	4,49E-05
ENSMUSG00000030525	Chrna7	7	70243578	70357455	1,560137051	2,65E-21
ENSMUSG00000070985	Acnat1	4	49459977	49486784	1,591358784	0,002293965
ENSMUSG00000086376	1700071G01Rik	5	73548253	73549119	1,591919934	3,82E-06
ENSMUSG00000042345	Ubash3a	17	31344818	31379147	1,598460947	6,83E-05
ENSMUSG00000018387	Shroom1	11	53270707	53281268	1,62438788	8,23E-09
ENSMUSG00000016498	Pdcd1lg2	19	29485409	29545647	1,625655752	1,84E-10
ENSMUSG00000086164	Gm13029	4	139698788	139700548	1,656147953	3,24E-05
ENSMUSG00000085081	A430071A18Rik	11	119682126	119695679	1,672004788	3,24E-05
ENSMUSG00000052504	Epha3	16	63543364	63863984	1,679480691	2,79E-20
ENSMUSG00000000409	Lck	4	129225588	129250885	1,680721005	1,89E-14
ENSMUSG00000017314	Mpp2	11	101918329	101949829	1,684436303	7,82E-08
ENSMUSG00000079644	Gm1110	9	26687152	26730666	1,691881641	0,000146806
ENSMUSG00000032456	Nmnat3	9	98187854	98320946	1,702543337	1,25E-112
ENSMUSG00000032494	Tdgf1	9	110842114	110848662	1,705773046	0,005873364
ENSMUSG00000022123	Scel	14	103912558	104012563	1,709162158	4,81E-07
ENSMUSG00000070385	Ampd1	3	102877937	102903637	1,722627389	8,71E-16
ENSMUSG00000090806	Vmn2r70	7	92707213	92717598	1,745255294	0,00774317
ENSMUSG00000053702	Nebi	2	17265536	17653091	1,782256327	8,52E-16
ENSMUSG00000007038	Neu1	17	35068198	35072898	1,791808405	1,22E-19
ENSMUSG00000082050	Gm13989	2	123098882	123099081	1,792350046	2,85E-27
ENSMUSG00000090817	Gm4450	3	98249609	98260954	1,841976179	0,00010679

ENSMUSG00000027750	Postn	3	54165031	54194961	1,844508939	4,42E-69
ENSMUSG00000043165	Lor	3	91884197	91887064	1,876934885	0,001545939
ENSMUSG00000043219	Hoxa6	6	52155430	52161355	1,890519306	6,63E-13
ENSMUSG00000001555	Fkbp10	11	100277011	100286138	1,902663782	3,41E-70
ENSMUSG00000072476	Gm9008	6	76445472	76447778	1,92332976	0,002568775
ENSMUSG00000025002	Cyp2c55	19	39081509	39117183	1,942020689	1,66E-05
ENSMUSG00000083556	Gm9043	X	92825171	92825705	1,955614878	6,46E-06
ENSMUSG00000059058	Gm15431	1	173641219	173641413	1,956361968	0,00048374
ENSMUSG00000048149	Gm12663	11	16534866	16536110	1,99067846	0,000843664
ENSMUSG00000058628	Olf875	9	37580222	37581225	2,001028501	0,000377077
ENSMUSG00000031142	Cacna1f	X	7184209	7212322	2,048264637	2,96E-08
ENSMUSG00000074603	Gm10729	3	51497693	51499012	2,062913397	0,000293976
ENSMUSG00000026043	Col3a1	1	45368383	45406551	2,065487981	1,75E-60
ENSMUSG00000079139	Gm4204	1	137129022	137129801	2,089984053	0,000236502
ENSMUSG00000083773	Gm13394	2	28788950	28790200	2,12342787	0,000647525
ENSMUSG00000021250	Fos	12	86814840	86818223	2,156859398	6,54E-09
ENSMUSG00000047139	Cd24a	10	43298975	43304068	2,247009597	3,97E-86
ENSMUSG00000089957	A830011K09Rik	6	138371626	138378113	2,279808975	1,50E-05
ENSMUSG00000085707	Gm12212	11	53275881	53277115	2,322918896	2,54E-06
ENSMUSG00000060534	Dcc	18	71418392	72510723	2,41071358	1,95E-07
ENSMUSG00000074437	Defa-rs1	8	22465566	22466699	2,438815652	3,80E-05
ENSMUSG00000059309	Hist1h3f	13	23635921	23636924	2,500413248	3,56E-110
ENSMUSG00000063350	Olf874	9	37553721	37554727	2,764678788	9,31E-15
ENSMUSG00000037440	Vnn1	10	23614494	23625149	2,822854214	3,06E-07
ENSMUSG00000057710	9630041A04Rik	9	101840811	101845549	2,870765072	4,64E-08
ENSMUSG00000083840	Gm15459	5	5781530	5783607	2,907510999	1,04E-08
ENSMUSG00000092365	BC023719	17	36169365	36254066	2,918256192	2,71E-07
ENSMUSG00000055202	Zfp811	17	32934351	32937883	2,924494632	8,10E-17
ENSMUSG00000092444	Gm18733	17	35415121	35416359	2,981215677	1,12E-07
ENSMUSG00000050550	Gm11868	4	18771349	18772928	3,000318991	4,63E-11
ENSMUSG00000090877	Hspa1b	17	35093381	35096183	3,217271385	2,64E-31
ENSMUSG00000061330	Gm11361	13	28349496	28350006	3,537124617	2,37E-18
ENSMUSG00000038193	Hand2	8	59799780	59803314	3,726443978	1,05E-15
ENSMUSG00000083833	Gm13841	5	116251568	116252219	4,176281702	6,00E-21
ENSMUSG00000048365	Gm9825	6	7932358	7933386	4,547476442	1,65E-22
ENSMUSG00000081684	Rps2-ps13	X	50251765	50252646	4,779497684	1,23E-26
ENSMUSG00000057657	Gm10260	13	98530042	98530587	5,041494463	8,39E-89

Supplementary Table 1. Listing of the most significantly mis-regulated genes ($|\log_2\text{-ratio KO/WT}| > 1$, $P < 0.01$) in H3.3B^{KO} meiotic cells. The following information are indicated for each gene: Ensemble gene id, gene name, $\log_2$ fold change, p-value adjusted for multi-testing.

Ensembl gene id	Gene name	Chromosome name	Start position	End position	log2(KO/WT)	p-value
ENSMUSG00000016559	H3f3b	11	115883226	115889276	-5,025550583	0
ENSMUSG00000085077	1700049E15Rik	6	147638763	147650896	-3,807247274	9,39E-29
ENSMUSG00000066107	Gm12666	4	91857435	91858440	-3,349102005	2,98E-28
ENSMUSG00000024254	Abcg8	17	85075642	85099673	-3,107475458	1,68E-25
ENSMUSG00000030223	Ptpro	6	137200820	137413150	-2,79582307	1,43E-58
ENSMUSG00000055805	Fmn1	11	103032421	103060215	-2,792804169	1,49E-44
ENSMUSG00000033855	Ston1	17	88997024	89061926	-2,762157422	1,06E-101
ENSMUSG00000087092	4930511A02Rik	12	11445039	11451618	-2,760672475	8,26E-55
ENSMUSG00000091721	Gm5549	3	132297689	132307595	-2,373432752	7,95E-07
ENSMUSG00000086135	1700001J04Rik	11	114046753	114048091	-2,233405432	5,17E-07
ENSMUSG00000022849	Hspbp1	16	35770472	35828532	-2,206361732	7,47E-81
ENSMUSG00000076612	Ighg2c	12	114523536	114527141	-2,178289331	0,000213324
ENSMUSG00000005952	Trpv1	11	73047794	73074744	-2,145945144	5,51E-22
ENSMUSG00000021280	1200009I06Rik	12	112655228	112669393	-2,118507347	1,33E-14
ENSMUSG00000055978	Fut2	7	52903965	52921764	-2,104538843	1,71E-06
ENSMUSG00000031805	Jak3	8	74200195	74214474	-2,091956587	3,05E-29
ENSMUSG00000001076	C1ql4	15	98915117	98918248	-2,030957869	0,000618045
ENSMUSG00000034427	Myo15b	11	115722926	115753917	-2,012592967	6,68E-32
ENSMUSG00000091813	Ces2h	8	107538350	107544310	-2,008949963	2,82E-08
ENSMUSG00000086257	4930548K13Rik	4	26562967	26632596	-1,964204782	3,54E-05
ENSMUSG00000043192	Gm1840	8	5639584	5640996	-1,940936972	1,24E-15
ENSMUSG00000019936	Epyc	10	97106702	97145088	-1,931580855	2,93E-77
ENSMUSG00000079654	Prrt4	6	29119232	29129584	-1,893839094	4,37E-05
ENSMUSG00000019893	Ros1	10	51765527	51915050	-1,863904579	2,06E-16
ENSMUSG00000001566	Mnx1	5	29799578	29805059	-1,840380223	0,000197802
ENSMUSG00000089796	Gm16575	15	79570004	79572228	-1,83044119	0,000726558
ENSMUSG00000020377	Ltc4s	11	50049971	50052118	-1,795975326	2,11E-13
ENSMUSG00000004105	Angptl2	2	33071589	33103237	-1,770153991	2,93E-17
ENSMUSG00000058056	Palld	8	63992043	64381487	-1,737615219	5,62E-18
ENSMUSG00000025450	Gm9752	13	120262611	120265568	-1,716117237	0,006505154
ENSMUSG00000035104	Fam176a	6	81991037	82043093	-1,71466465	4,82E-05
ENSMUSG00000030996	Art1	7	109250257	109259662	-1,604070199	1,76E-26
ENSMUSG00000067242	Lgi1	19	38339272	38383429	-1,599919735	0,00275432
ENSMUSG00000009097	Tbx1	16	18581806	18588113	-1,587289127	2,74E-18
ENSMUSG00000067813	Xkr9	1	13658852	13691804	-1,569055448	0,000545435
ENSMUSG00000048217	Nags	11	102006827	102010791	-1,564383584	2,85E-12
ENSMUSG00000079510	Mdga2	12	67571623	67572045	-1,549422259	7,44E-06
ENSMUSG00000047730	Fcgbp	7	28856255	28905881	-1,548228508	8,17E-06
ENSMUSG00000020591	Ntsr2	12	16660276	16667042	-1,547503161	0,005484951
ENSMUSG00000037336	Mfsd2b	12	4869246	4881165	-1,523153263	3,08E-09
ENSMUSG00000038009	Dnajc22	15	98923601	98935168	-1,519654992	0,00020888
ENSMUSG00000086786	Gm15908	13	34744792	34758643	-1,511987566	3,99E-61

ENSMUSG00000056797	Gm4889	8	35390964	35391407	-1,511136177	0,008716731
ENSMUSG00000034552	Zswim2	2	83755236	83781385	-1,505279735	2,48E-125
ENSMUSG00000033615	Cplx1	5	108947573	108979043	-1,481569379	0,001161771
ENSMUSG000000087465	Gm13905	2	101712332	101723413	-1,455799679	0,000422627
ENSMUSG00000044375	BC027072	17	72092897	72102225	-1,451392712	2,41E-16
ENSMUSG00000022237	Ankrd33b	15	31221234	31297514	-1,449064962	1,01E-05
ENSMUSG00000029360	Gm9754	5	118515369	118519719	-1,443528208	0,003755873
ENSMUSG000000085147	Gm12609	4	89048648	89066571	-1,432972468	0,009458997
ENSMUSG000000086296	D030055H07Rik	9	106051018	106062532	-1,431461744	0,000141118
ENSMUSG00000049538	Adamts16	13	70866680	70980689	-1,429392637	0,001514275
ENSMUSG000000086764	4930527A07Rik	2	105316658	105317514	-1,422430743	0,000827632
ENSMUSG00000040495	Chrm4	2	91762346	91769986	-1,400245663	1,51E-15
ENSMUSG00000020357	Flt4	11	49422765	49466241	-1,379194337	5,56E-24
ENSMUSG000000085106	Gm16000	3	80841330	80844359	-1,37084467	0,001436357
ENSMUSG00000034471	Caskin2	11	115660497	115674953	-1,367775277	2,53E-14
ENSMUSG00000047986	Palm3	8	86545370	86554194	-1,36619096	0,000126553
ENSMUSG000000090586	Gm17260	13	41455340	41466277	-1,362180045	1,52E-05
ENSMUSG00000021175	Cdca7l	12	119042762	119117179	-1,357644984	2,40E-26
ENSMUSG00000020017	Hal	10	92951513	92982049	-1,344920697	0,000341832
ENSMUSG00000026961	Lrrc26	2	25145435	25146700	-1,341563357	0,000113803
ENSMUSG00000024851	Pitpnm1	19	4099998	4113965	-1,331398821	4,08E-36
ENSMUSG00000035576	L3mbtl1	2	162769201	162800258	-1,329480043	5,93E-07
ENSMUSG000000084996	Gm11419	11	81798908	81802271	-1,320487173	1,31E-14
ENSMUSG000000086594	4930505H01Rik	17	59135674	59164404	-1,318805402	6,31E-14
ENSMUSG00000048065	Cyb5r2	7	114891969	114901510	-1,315125377	1,79E-20
ENSMUSG00000021278	Amn	12	112509322	112514637	-1,293906439	1,64E-14
ENSMUSG00000010175	Prox1	1	191941917	191994559	-1,281620007	5,85E-11
ENSMUSG000000091603	Gm17346	9	34396111	34396889	-1,280390922	3,51E-10
ENSMUSG000000061186	Sfmbt2	2	10292137	10516880	-1,267661401	4,42E-47
ENSMUSG000000086516	4930461G14Rik	9	58302980	58317430	-1,253074095	1,00E-29
ENSMUSG00000036938	Try5	6	41261232	41266840	-1,245994684	1,86E-06
ENSMUSG00000042250	Pglyrp4	3	90530828	90545439	-1,244186906	6,29E-05
ENSMUSG000000086529	4930471I20Rik	2	155372776	155382666	-1,2346934	0,005710804
ENSMUSG00000079053	Gm14010	2	128249390	128250301	-1,225257545	0,000156611
ENSMUSG00000031543	Ank1	8	24085316	24260969	-1,225050951	7,03E-06
ENSMUSG00000051198	4930548G14Rik	15	46457002	46457319	-1,218578288	2,21E-06
ENSMUSG00000021411	1300014I06Rik	13	34719709	34744550	-1,216658812	1,91E-15
ENSMUSG00000036231	Agr3	12	36652207	36676323	-1,196793277	7,22E-07
ENSMUSG000000089968	4921518J05Rik	15	99258132	99265744	-1,195586567	0,002110019
ENSMUSG000000085548	Gm11753	11	119045267	119045830	-1,191060597	6,99E-06
ENSMUSG000000084757	1700057H15Rik	4	124091659	124163202	-1,186105188	0,000808749
ENSMUSG00000038296	Galntl4	7	118615175	118923491	-1,183405179	2,66E-06
ENSMUSG00000006587	Snai3	8	124978106	124984592	-1,181258457	0,000220866

ENSMUSG00000086645	Gm15743	16	31427962	31428377	-1,17683779	8,45E-06
ENSMUSG00000030513	Pcsk6	7	73006620	73195226	-1,172521915	7,96E-08
ENSMUSG00000006575	Rundc3a	11	102254717	102263869	-1,171040558	2,04E-37
ENSMUSG00000034040	Wbscr17	5	131347952	131783948	-1,165941331	2,62E-10
ENSMUSG00000036744	Olfr701	7	113957643	113964223	-1,163474128	6,10E-31
ENSMUSG00000034595	Ppp1r18	17	36002538	36012541	-1,159281439	1,39E-16
ENSMUSG00000038048	Cntnap5c	17	57908993	58549765	-1,157349784	5,43E-09
ENSMUSG00000087311	Gm16988	10	37057292	37099458	-1,157290017	0,008208137
ENSMUSG00000059412	Fxyd2	9	45207957	45218361	-1,151341295	1,32E-22
ENSMUSG00000020638	Cmpk2	12	27154069	27164700	-1,15084557	1,32E-12
ENSMUSG00000005892	Trh	6	92192055	92194644	-1,150212214	1,22E-06
ENSMUSG00000044034	Npb	11	120469791	120470407	-1,149506676	1,55E-06
ENSMUSG00000085327	Gm16104	10	80872320	80874324	-1,139993929	2,01E-05
ENSMUSG00000000159	Igsf5	16	96583275	96747187	-1,136637479	0,000520673
ENSMUSG00000086129	Gm13558	2	58558180	58587807	-1,131129323	0,003070593
ENSMUSG00000089645	Gm5766	16	4229230	4231206	-1,125712319	9,37E-14
ENSMUSG00000028246	6230409E13Rik	4	21858476	21923986	-1,114081914	1,14E-06
ENSMUSG00000022738	Gsc2	16	17913207	17915152	-1,112754959	8,35E-08
ENSMUSG00000006221	Hspb7	4	140976694	140981226	-1,108326751	8,72E-16
ENSMUSG00000033233	Trim45	3	100726125	100740848	-1,10387704	7,42E-43
ENSMUSG00000087184	Gm11650	11	107655180	107657296	-1,103161321	2,29E-06
ENSMUSG00000046598	Bdh1	16	31422366	31458987	-1,098662316	4,32E-10
ENSMUSG00000039717	Raly1	3	13776848	14182287	-1,095247652	0,002932763
ENSMUSG00000000861	Bcl11a	11	23978056	24074123	-1,09392986	1,74E-15
ENSMUSG00000021365	Nedd9	13	41405285	41582689	-1,080966516	1,68E-14
ENSMUSG00000004415	Emid2	5	137217629	137359079	-1,073906527	3,71E-09
ENSMUSG00000086272	BC039966	4	153321742	153324612	-1,072337633	2,68E-07
ENSMUSG00000038246	Fam50b	13	34826719	34839482	-1,068937357	2,59E-54
ENSMUSG00000063765	Chadl	15	81508726	81527717	-1,067763301	3,45E-07
ENSMUSG00000017204	Gsdma	11	98525665	98539022	-1,061846415	3,80E-11
ENSMUSG00000074813	Gm14005	2	128021729	128255085	-1,059916676	0,003259599
ENSMUSG00000033688	1300017J02Rik	9	103152852	103207412	-1,059238457	5,66E-21
ENSMUSG00000086976	Gm12316	11	70424714	70426713	-1,048540018	0,00283414
ENSMUSG00000049576	Zfa	10	52262124	52265545	-1,042861402	7,15E-07
ENSMUSG00000059277	R74862	7	150207689	150239591	-1,04182896	8,43E-06
ENSMUSG00000030093	Wnt7a	6	91313975	91361357	-1,031373072	0,005867764
ENSMUSG00000087452	Gm11998	11	11457424	11479463	-1,031281783	0,002483141
ENSMUSG00000049409	Prokr1	6	87528587	87540695	-1,027971669	0,000338931
ENSMUSG00000033707	Lrrc24	15	76545706	76552603	-1,027468255	2,54E-09
ENSMUSG00000041729	Coro2b	9	62267299	62384851	-1,026099248	0,008498078
ENSMUSG00000017400	Stac2	11	97897937	97914776	-1,023821033	0,002480615
ENSMUSG00000025064	Col17a1	19	47720834	47766584	-1,023447115	9,10E-06
ENSMUSG00000073418	C4b	17	34865325	34880827	-1,019427314	3,50E-24

ENSMUSG00000044164	Rnf182	13	43711079	43766314	-1,014976005	0,006164521
ENSMUSG00000064141	Zfp69	4	120602742	120624304	-1,009629822	0,000206125
ENSMUSG00000069720	4930572O03Rik	5	15158104	15162877	-1,005586345	1,16E-06
ENSMUSG00000041117	Ccdc8	7	17578057	17582864	1,001900052	6,70E-05
ENSMUSG00000090219	4930516K23Rik	7	111147314	111285919	1,002935532	0,009086634
ENSMUSG00000051065	1600021P15Rik	16	28826262	28929784	1,004427581	0,000433747
ENSMUSG00000026430	Rassf5	1	133072987	133141835	1,00713633	0,005822286
ENSMUSG00000029608	Rph3a	5	121390511	121459527	1,010768251	0,000116172
ENSMUSG00000087056	Gm14004	2	124950092	124960063	1,012167853	0,003395958
ENSMUSG00000073716	Gm13241	4	145721928	145722710	1,013993285	0,001482644
ENSMUSG00000050936	Hist2h2bb	3	96073644	96082924	1,016772459	1,47E-09
ENSMUSG00000059689	Zfp637	6	117791198	117795974	1,016873775	1,61E-06
ENSMUSG00000017057	Il13ra1	X	33652105	33711254	1,020254132	2,02E-05
ENSMUSG00000007872	Id3	4	135699412	135701670	1,025489073	0,000591718
ENSMUSG00000015340	Cybb	X	9012378	9064897	1,027480706	0,001189574
ENSMUSG00000027820	Mme	3	63099794	63186153	1,029180119	3,40E-08
ENSMUSG00000022894	Adamts5	16	85858415	85901370	1,02956126	0,008281046
ENSMUSG00000090124	Ugt1a7c	1	89991637	90116577	1,032858382	0,001774159
ENSMUSG00000004707	Ly9	1	173518755	173537541	1,035301664	1,07E-09
ENSMUSG00000028479	Gne	4	44046947	44097049	1,037978061	0,000118326
ENSMUSG00000066090	InsI5	4	102690477	102699447	1,038303669	4,47E-05
ENSMUSG00000007827	Ankrd26	6	118452582	118512274	1,04017308	2,21E-10
ENSMUSG00000062980	A430107O13Rik	6	21935916	22206404	1,041223014	1,34E-06
ENSMUSG00000031825	Crispld2	8	122516338	122576693	1,043570779	2,25E-07
ENSMUSG00000041261	Car8	4	8070514	8166188	1,045806373	0,003010495
ENSMUSG00000004558	Ndrp2	14	52524946	52533163	1,046992467	1,32E-12
ENSMUSG00000029661	Col1a2	6	4454814	4491543	1,053328793	0,000233135
ENSMUSG00000051367	Six1	12	74137916	74154874	1,054505636	1,11E-07
ENSMUSG00000042436	Mfap4	11	61298933	61302402	1,056260737	0,002813446
ENSMUSG00000021876	Rnase4	14	51710752	51725826	1,057134647	0,000120814
ENSMUSG00000055639	Dach1	14	98186066	98568984	1,060196266	3,78E-06
ENSMUSG00000091006	Vmn2r69	7	92554886	92564186	1,061871479	0,000130262
ENSMUSG00000024678	Ms4a4d	19	11611291	11632957	1,06192326	0,003049791
ENSMUSG00000006344	Ggt5	10	75052126	75079713	1,065848723	0,007084996
ENSMUSG00000024131	Slc3a1	17	85427687	85463583	1,067275038	0,000126359
ENSMUSG00000021390	Ogn	13	49703440	49719869	1,068647296	0,002934408
ENSMUSG00000038642	Ctss	3	95330708	95360325	1,069961556	5,39E-05
ENSMUSG00000036594	H2-Aa	17	34406276	34424772	1,071098966	3,14E-09
ENSMUSG00000021268	Meg3	12	110779211	110809936	1,07622134	0,002311026
ENSMUSG00000054986	Sec14l3	11	3964844	3977739	1,07837931	6,53E-08
ENSMUSG00000078954	Arhgap8	15	84550482	84602637	1,079258223	3,40E-07
ENSMUSG00000016494	Cd34	1	196765015	196787486	1,079958762	5,17E-10
ENSMUSG00000046971	Pla2g4f	2	120125693	120139901	1,082084744	0,004306116

ENSMUSG00000031103	Elf4	X	45764223	45816309	1,08233699	1,92E-07
ENSMUSG00000031375	Bgn	X	70728941	70741272	1,086367724	4,30E-07
ENSMUSG00000031659	Adcy7	8	90796302	90853861	1,087672628	7,50E-12
ENSMUSG00000001663	Gstt1	10	75246558	75261329	1,088212564	0,00409123
ENSMUSG00000056737	Capg	6	72494385	72512977	1,090694103	0,000340898
ENSMUSG00000022665	Ccdc80	16	45093515	45128037	1,092920364	0,000199617
ENSMUSG00000058897	Col25a1	3	129883809	130302795	1,093023186	1,19E-08
ENSMUSG00000022715	Cldn26	16	8409369	8425229	1,096049446	0,00280861
ENSMUSG00000045680	Tcf21	10	22537085	22539934	1,098047413	0,00175392
ENSMUSG00000084971	4930579D09Rik	6	143482485	143484028	1,100446762	1,84E-17
ENSMUSG00000035226	Rims4	2	163685487	163744419	1,110577392	2,04E-06
ENSMUSG00000052957	Gas1	13	60275766	60278726	1,111187428	0,005484951
ENSMUSG00000060962	Dmkn	7	31548775	31566085	1,112449447	6,30E-10
ENSMUSG00000039004	Bmp6	13	38436995	38592183	1,113928296	1,86E-07
ENSMUSG00000070803	Cited4	4	120339168	120340425	1,117192927	6,80E-15
ENSMUSG00000032014	Oaf	9	43029361	43047899	1,117946927	0,005888993
ENSMUSG00000031273	Col4a6	X	137599946	137908619	1,121552841	1,81E-14
ENSMUSG00000030579	Tyrobp	7	31198807	31202596	1,127981701	0,003885195
ENSMUSG00000032894	1700031F05Rik	X	100054526	100063310	1,129017286	0,000318139
ENSMUSG00000031200	Mtcp1	X	72655783	72661927	1,138650403	0,000712332
ENSMUSG00000049109	Themis	10	28388166	28603624	1,139381182	0,000775091
ENSMUSG00000025877	Hk3	13	55107346	55122746	1,14026912	6,42E-06
ENSMUSG00000003279	Dlgap1	17	70318413	71170753	1,14303851	6,18E-08
ENSMUSG00000055409	Nell1	7	57230234	58120625	1,145314818	4,03E-08
ENSMUSG00000030834	Abcc6	7	53231750	53285672	1,149555695	9,37E-05
ENSMUSG00000039058	Ak5	3	152125779	152331104	1,150508095	6,71E-09
ENSMUSG00000054892	Txk	5	73087217	73144012	1,153111179	0,001760113
ENSMUSG00000040170	Fmo2	1	164804448	164828857	1,15496813	0,000549607
ENSMUSG00000016024	Lbp	2	158132229	158158588	1,156494833	5,15E-05
ENSMUSG00000053693	Mast1	8	87435802	87461258	1,156768787	0,000203731
ENSMUSG00000074003	Gucy2d	7	105591931	105625802	1,159353452	1,35E-12
ENSMUSG00000010609	Psen2	1	182157135	182193569	1,163780833	0,000164075
ENSMUSG00000007034	Slc44a4	17	35051411	35067381	1,165101339	0,00865593
ENSMUSG00000038473	Nos1ap	1	172232799	172519992	1,167063017	0,001125703
ENSMUSG00000032109	Nlr1	9	44060796	44076682	1,177152605	8,01E-05
ENSMUSG00000056481	Cd248	19	5068078	5070637	1,178578979	0,000795166
ENSMUSG00000072584	Gm7489	15	53716461	53718152	1,183421976	7,68E-05
ENSMUSG00000059022	Kcp	6	29423162	29457952	1,187067029	0,000696415
ENSMUSG00000085171	D830026I12Rik	6	17147751	17160152	1,187372541	0,000394269
ENSMUSG00000031119	Gpc4	X	49406198	49518429	1,188297071	2,51E-06
ENSMUSG00000029231	Pdgfra	5	75548316	75594229	1,188533331	9,51E-19
ENSMUSG00000041120	Nbl1	4	138638199	138648908	1,192231414	0,000228618
ENSMUSG00000015709	Arnt2	7	91394791	91558469	1,193393743	1,15E-11

ENSMUSG00000061535	C1qtnf7	5	43906808	44010056	1,196526061	0,001200591
ENSMUSG00000032609	Klhdc8b	9	108349989	108354708	1,200021348	2,02E-09
ENSMUSG00000068874	Selenbp1	3	94736978	94748680	1,200264932	3,35E-07
ENSMUSG00000053560	Ier2	8	87185230	87186751	1,200605599	0,003012369
ENSMUSG00000009281	Rarres2	6	48519697	48522669	1,20258659	0,000293865
ENSMUSG00000016498	Pdcd1lg2	19	29485409	29545647	1,207511246	2,72E-07
ENSMUSG00000028885	Smpdl3b	4	132288881	132313167	1,208569492	0,000143708
ENSMUSG00000048078	Odz4	7	103319754	104059603	1,212473952	3,05E-25
ENSMUSG00000001025	S100a6	3	90416816	90418336	1,21260626	1,57E-06
ENSMUSG00000030220	Arhgdib	6	136872044	136890420	1,215180994	0,000219936
ENSMUSG00000043631	Ecm2	13	49600179	49628158	1,215811657	1,31E-05
ENSMUSG00000064247	Plcxd1	5	110528988	110534972	1,231406018	1,37E-13
ENSMUSG00000018865	Sult4a1	15	83906527	83936184	1,234482328	4,37E-05
ENSMUSG00000000753	Serpinf1	11	75223271	75236203	1,2398985	1,57E-05
ENSMUSG00000036083	Slc17a3	13	23931303	23952583	1,242672274	0,008802194
ENSMUSG00000033981	Gria2	3	80488858	80606713	1,247435384	1,37E-10
ENSMUSG00000074872	Ctnx2	2	124962428	124973575	1,248907583	2,08E-07
ENSMUSG00000018387	Shroom1	11	53270707	53281268	1,250561482	7,41E-06
ENSMUSG00000026170	Cyp27a1	1	74760148	74784464	1,252677912	4,05E-10
ENSMUSG00000025002	Cyp2c55	19	39081509	39117183	1,252706528	0,008550926
ENSMUSG00000008136	Fhl2	1	43179919	43220806	1,263541665	1,29E-10
ENSMUSG00000038521	C1s	6	124480363	124586998	1,270857551	2,51E-11
ENSMUSG00000030525	Chrna7	7	70243578	70357455	1,271901958	4,82E-15
ENSMUSG00000026676	Ccdc3	2	5058822	5151924	1,272828256	0,000637313
ENSMUSG00000086766	Gm15969	4	148287620	148288433	1,276480594	0,00091409
ENSMUSG00000018919	Tm4sf5	11	70318746	70324680	1,279026685	0,007304458
ENSMUSG00000015652	Steap1	5	5736317	5749326	1,279579123	7,20E-11
ENSMUSG00000028583	Pdpn	4	142857334	142889467	1,280153945	0,000271675
ENSMUSG00000059546	Vmn1r40	6	89664197	89665129	1,284936876	3,45E-07
ENSMUSG00000023046	Igfbp6	15	101974793	101979942	1,291445266	2,53E-05
ENSMUSG00000018819	Lsp1	7	149646714	149680772	1,292043191	4,42E-05
ENSMUSG00000048387	Osr1	12	9581248	9588305	1,295412715	0,007196587
ENSMUSG00000024610	Cd74	18	60963502	60972300	1,296574437	0,000775091
ENSMUSG00000046440	Gm5564	5	138946066	138947174	1,297188018	0,008489549
ENSMUSG00000033227	Wnt6	1	74818466	74831893	1,299596104	7,30E-10
ENSMUSG00000021032	Ngb	12	88438481	88443489	1,309553188	1,71E-12
ENSMUSG00000029096	Htra3	5	35994682	36022431	1,30964872	8,56E-10
ENSMUSG00000086337	Gm11535	11	96038865	96040114	1,316334342	2,46E-10
ENSMUSG00000069919	Hba-a1	11	32183511	32184465	1,32071639	2,94E-05
ENSMUSG000000091705	H2-Q2	17	35479187	35483707	1,322600027	0,008065215
ENSMUSG00000022464	Slc38a4	15	96825254	96886387	1,322739946	0,000718682
ENSMUSG00000025776	Crispld1	1	17717126	17756425	1,331977151	1,01E-18
ENSMUSG00000033208	S100b	10	75716598	75723904	1,342022406	0,006664623

ENSMUSG00000074743	Thbd	2	148230207	148233924	1,350260764	7,77E-11
ENSMUSG00000038368	BC057079	4	87740533	88056915	1,357386253	6,59E-76
ENSMUSG00000031740	Mmp2	8	95351227	95377316	1,36228089	0,001284541
ENSMUSG00000086596	Susd5	9	113966472	114007851	1,362973996	4,71E-30
ENSMUSG00000020601	Trib2	12	15798533	15823683	1,366849198	7,52E-07
ENSMUSG00000030780	BC017158	7	135414893	135441684	1,367589919	8,66E-18
ENSMUSG00000019889	Ptprk	10	27794626	28317203	1,368351431	6,08E-16
ENSMUSG00000060586	H2-Eb1	17	34442828	34453144	1,373539409	5,57E-18
ENSMUSG00000027966	Col11a1	3	113733458	113923636	1,384761264	5,35E-07
ENSMUSG00000015134	Aldh1a3	7	73535778	73572403	1,388768364	1,38E-06
ENSMUSG00000025202	Scd3	19	44277759	44318506	1,392930077	6,44E-15
ENSMUSG00000066516	Klk1b21	7	51357662	51361944	1,393543315	0,000515745
ENSMUSG00000052504	Epha3	16	63543364	63863984	1,402503871	2,15E-15
ENSMUSG00000071984	Fndc1	17	7931434	8020167	1,405752701	5,42E-21
ENSMUSG00000041959	S100a10	3	93359002	93368565	1,40907355	7,44E-08
ENSMUSG00000073411	H2-D1	17	35399675	35404444	1,410930293	2,40E-26
ENSMUSG00000030707	Coro1a	7	133843287	133851301	1,421901445	3,53E-05
ENSMUSG00000020123	Avpr1a	10	121885555	121890509	1,422207277	3,51E-05
ENSMUSG00000055172	C1ra	6	124462423	124473458	1,424343571	1,35E-07
ENSMUSG00000051439	Cd14	18	36884728	36886390	1,431945957	4,35E-05
ENSMUSG00000078600	1700092K14Rik	11	114059572	114060513	1,433849242	4,96E-05
ENSMUSG00000042345	Ubash3a	17	31344818	31379147	1,436848662	0,000287101
ENSMUSG00000000682	Cd52	4	133638363	133650997	1,448191408	0,00016273
ENSMUSG00000069792	Gm11428	11	83517493	83519770	1,462014601	0,005128669
ENSMUSG00000006522	Itih3	14	31721759	31736946	1,462637576	1,57E-06
ENSMUSG00000070985	Acnat1	4	49459977	49486784	1,465221176	0,004201219
ENSMUSG00000085982	9530051G07Rik	X	149472172	149507458	1,476658082	8,69E-09
ENSMUSG00000023224	Serping1	2	84605544	84615601	1,477690731	2,32E-22
ENSMUSG00000017314	Mpp2	11	101918329	101949829	1,479330412	2,74E-07
ENSMUSG00000086376	1700071G01Rik	5	73548253	73549119	1,479946537	8,74E-06
ENSMUSG00000026043	Col3a1	1	45368383	45406551	1,490842299	6,11E-40
ENSMUSG00000020467	Efemp1	11	28753204	28826743	1,49180504	7,09E-08
ENSMUSG00000079644	Gm1110	9	26687152	26730666	1,507948038	0,000834585
ENSMUSG00000043219	Hoxa6	6	52155430	52161355	1,517715243	2,75E-09
ENSMUSG00000051457	Spn	7	134275746	134281337	1,521029489	0,000100963
ENSMUSG00000040950	Mgl2	11	69943831	69951052	1,522349735	1,75E-05
ENSMUSG00000026692	Fmo4	1	164724014	164744103	1,540694358	0,006557059
ENSMUSG00000053729	Spinkl	18	44326012	44334727	1,542946433	0,006710345
ENSMUSG00000030917	Tmem159	7	127245890	127264506	1,551742683	4,22E-20
ENSMUSG00000070385	Ampd1	3	102877937	102903637	1,553486215	5,05E-15
ENSMUSG00000040065	Pfpl	19	12502395	12506600	1,563053139	0,009197004
ENSMUSG00000091996	BC049352	9	44990090	45058103	1,574136629	1,57E-06
ENSMUSG00000089957	A830011K09Rik	6	138371626	138378113	1,591550305	0,002333031

ENSMUSG00000041062	Mslnl	17	25872985	25885275	1,601315694	8,84E-06
ENSMUSG00000048521	Cxcr6	9	123715595	123720872	1,604840733	0,001301325
ENSMUSG00000085081	A430071A18Rik	11	119682126	119695679	1,617120081	3,17E-05
ENSMUSG00000052305	Hbb-b1	7	110975048	110976610	1,637851906	1,50E-30
ENSMUSG00000019929	Dcn	10	96942245	96980777	1,642721576	1,15E-07
ENSMUSG00000015085	Entpd2	2	25251394	25256843	1,654248276	4,10E-06
ENSMUSG00000027394	Ttl	2	128891678	128922019	1,656932584	1,21E-07
ENSMUSG00000074968	Ano3	2	110495358	110791080	1,660179221	7,15E-07
ENSMUSG00000063713	Klk1b24	7	51443606	51447822	1,66022932	2,41E-05
ENSMUSG00000029697	Fezf1	6	23195047	23198264	1,669593641	0,004256504
ENSMUSG00000029189	Sel1l3	5	53498323	53604691	1,693644194	3,77E-31
ENSMUSG00000030218	Mgp	6	136820957	136824326	1,703316528	1,87E-12
ENSMUSG00000086164	Gm13029	4	139698788	139700548	1,715460781	8,20E-06
ENSMUSG00000059309	Hist1h3f	13	23635921	23636924	1,719162154	1,44E-29
ENSMUSG00000073940	Hbb-b2	7	110961038	110962510	1,719827477	2,62E-07
ENSMUSG00000046491	C1qtnf2	11	43287778	43305027	1,725860057	4,44E-10
ENSMUSG00000021091	Serpina3n	12	105644939	105652539	1,738535102	2,56E-05
ENSMUSG00000027750	Postn	3	54165031	54194961	1,741611687	5,85E-62
ENSMUSG00000050370	Ch25h	19	34548276	34549625	1,744586598	0,005019543
ENSMUSG00000085707	Gm12212	11	53275881	53277115	1,748556188	0,000299728
ENSMUSG00000001020	S100a4	3	90407692	90409967	1,759714756	9,01E-06
ENSMUSG00000013643	2210415F13Rik	11	58192545	58204230	1,771491537	9,37E-13
ENSMUSG00000032456	Nmnat3	9	98187854	98320946	1,780275655	7,73E-122
ENSMUSG00000050550	Gm11868	4	18771349	18772928	1,782428242	9,03E-05
ENSMUSG00000069806	Cacng7	7	3333055	3367810	1,793222357	0,000135968
ENSMUSG00000030789	Itgax	7	135273061	135294171	1,803005605	1,42E-08
ENSMUSG00000059058	Gm15431	1	173641219	173641413	1,803414436	0,001003993
ENSMUSG00000026879	Gsn	2	35111927	35163420	1,806763734	6,42E-17
ENSMUSG00000084844	Hoxb3os	11	96206795	96216005	1,807456879	0,003303919
ENSMUSG00000047139	Cd24a	10	43298975	43304068	1,809882318	7,45E-63
ENSMUSG00000007038	Neu1	17	35068198	35072898	1,851676059	2,98E-18
ENSMUSG00000058628	Olfr875	9	37580222	37581225	1,858838905	0,000626914
ENSMUSG00000074603	Gm10729	3	51497693	51499012	1,884242816	0,000849016
ENSMUSG00000069917	Hba-a2	11	32196489	32197301	1,93687176	1,88E-05
ENSMUSG00000053702	Nebi	2	17265536	17653091	1,972958942	1,77E-18
ENSMUSG00000030630	Fah	7	91733669	91755232	1,974646315	1,36E-10
ENSMUSG00000073405	C920025E04Rik	17	36245531	36248633	1,976878366	0,001275259
ENSMUSG00000085190	3010027C24Rik	18	83025286	83039996	1,97997349	1,72E-06
ENSMUSG00000084377	Gm15302	8	22470626	22473255	2,004437949	0,000968464
ENSMUSG00000021250	Fos	12	86814840	86818223	2,004673631	3,36E-09
ENSMUSG00000000409	Lck	4	129225588	129250885	2,004973607	2,55E-18
ENSMUSG00000022123	Scel	14	103912558	104012563	2,104350237	6,65E-11
ENSMUSG00000060534	Dcc	18	71418392	72510723	2,104986556	5,62E-07

ENSMUSG00000001555	Fkbp10	11	100277011	100286138	2,121262707	3,50E-92
ENSMUSG000000090806	Vmn2r70	7	92707213	92717598	2,123872523	0,000437992
ENSMUSG000000072476	Gm9008	6	76445472	76447778	2,128420271	0,000430681
ENSMUSG000000083840	Gm15459	5	5781530	5783607	2,138702619	6,38E-05
ENSMUSG000000073403	Gm10499	17	36278703	36282868	2,139104584	0,000383843
ENSMUSG000000083773	Gm13394	2	28788950	28790200	2,146842291	0,000381182
ENSMUSG000000083556	Gm9043	X	92825171	92825705	2,152366748	3,37E-09
ENSMUSG000000090817	Gm4450	3	98249609	98260954	2,191865467	4,56E-07
ENSMUSG000000092365	BC023719	17	36169365	36254066	2,277814752	9,97E-05
ENSMUSG000000092444	Gm18733	17	35415121	35416359	2,322988597	6,83E-05
ENSMUSG000000074437	Defa-rs1	8	22465566	22466699	2,658520633	3,68E-06
ENSMUSG000000025461	Cd163l1	7	147404166	147417044	2,752349301	5,93E-07
ENSMUSG000000031142	Cacna1f	X	7184209	7212322	2,766290539	5,62E-18
ENSMUSG000000061330	Gm11361	13	28349496	28350006	2,775965769	1,11E-11
ENSMUSG000000057710	9630041A04Rik	9	101840811	101845549	2,878469791	3,36E-08
ENSMUSG000000055202	Zfp811	17	32934351	32937883	2,927973943	6,68E-18
ENSMUSG000000048365	Gm9825	6	7932358	7933386	2,984278596	6,11E-09
ENSMUSG000000037440	Vnn1	10	23614494	23625149	3,247628873	1,85E-09
ENSMUSG000000063350	Olfr874	9	37553721	37554727	3,28678237	1,31E-18
ENSMUSG000000048967	Yjefn3	8	72411687	72414866	3,303211357	5,72E-11
ENSMUSG000000038193	Hand2	8	59799780	59803314	3,71797079	5,53E-17
ENSMUSG000000083833	Gm13841	5	116251568	116252219	4,200019667	4,99E-19
ENSMUSG000000081684	Rps2-ps13	X	50251765	50252646	4,489223698	2,12E-22
ENSMUSG000000090877	Hspa1b	17	35093381	35096183	4,848819644	1,62E-68
ENSMUSG000000057657	Gm10260	13	98530042	98530587	5,024058802	1,76E-72

Supplementary Table 2. Listing of the most significantly mis-regulated ($|\log_2\text{-ratio KO/WT}| > 1$, $P < 0.01$) in H3.3B^{KO} post-meiotic cells. The following informations are indicated for each gene: Ensemble gene id, gene name, log2 fold, p-value adjusted for multi-testing.

Publication

1. Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260 (1997).
2. Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T.K. & Dimitrov, S. Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell Biochem* **41**, 71-89 (2007).
3. Talbert, P.B. & Henikoff, S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 264-75 (2010).
4. van Holde, K. Chromatin. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. (1988).
5. Latrick, C.M. *et al.* Molecular basis and specificity of H2A.Z-H2B recognition and deposition by the histone chaperone YL1. *Nat Struct Mol Biol* (2016).
6. Obri, A. *et al.* ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature* **505**, 648-53 (2014).
7. Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S. & Hamiche, A. HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1349-54 (2010).
8. Dunleavy, E.M., Almouzni, G. & Karpen, G.H. H3.3 is deposited at centromeres in S phase as a placeholder for newly assembled CENP-A in G(1) phase. *Nucleus* **2**, 146-57 (2011).
9. Goldberg, A.D. *et al.* Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* **140**, 678-91 (2010).
10. Drane, P., Ouararhni, K., Depaux, A., Shuaib, M. & Hamiche, A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes & development* **24**, 1253-65 (2010).
11. Krimer, D.B., Cheng, G. & Skoultchi, A.I. Induction of H3.3 replacement histone mRNAs during the precommitment period of murine erythroleukemia cell differentiation. *Nucleic Acids Res* **21**, 2873-9 (1993).
12. Szenker, E., Ray-Gallet, D. & Almouzni, G. The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res* **21**, 421-34 (2011).
13. Ricketts, M.D. *et al.* Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex. *Nat Commun* **6**, 7711 (2015).
14. Jin, C. & Felsenfeld, G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* **21**, 1519-29 (2007).
15. Ors, A. *et al.* Histone H3.3 regulates mitotic progression in mouse embryonic fibroblasts. *Biochem Cell Biol* **95**, 491-499 (2017).
16. Jang, C.W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D. & Magnuson, T. Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. *Genes Dev* **29**, 1377-92 (2015).
17. Huang, C. & Zhu, B. H3.3 turnover: a mechanism to poise chromatin for transcription, or a response to open chromatin? *Bioessays* **36**, 579-84 (2014).
18. Sakai, A., Schwartz, B.E., Goldstein, S. & Ahmad, K. Transcriptional and developmental functions of the H3.3 histone variant in *Drosophila*. *Curr Biol* **19**, 1816-20 (2009).
19. Yuen, B.T., Bush, K.M., Barrilleaux, B.L., Cotterman, R. & Knoepfler, P.S. Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development* **141**, 3483-94 (2014).

20. Daniel Ricketts, M. *et al.* Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex. *Nat Commun* **6**, 7711 (2015).
21. Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H. & Evans, M.J. A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum Mol Genet* **8**, 2489-95 (1999).
22. de Koning, A.P., Gu, W., Castoe, T.A., Batzer, M.A. & Pollock, D.D. Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet* **7**, e1002384 (2011).
23. Papin, C. *et al.* Combinatorial DNA methylation codes at repetitive elements. *Genome Res* **27**, 934-946 (2017).
24. Slotkin, R.K. & Martienssen, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* **8**, 272-85 (2007).
25. Isbel, L. *et al.* Trim33 Binds and Silences a Class of Young Endogenous Retroviruses in the Mouse Testis; a Novel Component of the Arms Race between Retrotransposons and the Host Genome. *PLoS Genet* **11**, e1005693 (2015).
26. Chuma, S. & Nakano, T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**, 20110338 (2013).
27. Barral, S. *et al.* Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol Cell* **66**, 89-101 e8 (2017).
28. Govin, J. *et al.* Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J Cell Biol* **176**, 283-94 (2007).
29. Moretti, C., Vaiman, D., Tores, F. & Cocquet, J. Expression and epigenomic landscape of the sex chromosomes in mouse post-meiotic male germ cells. *Epigenetics Chromatin* **9**, 47 (2016).
31. Mahadevaiah, S.K. *et al.* Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**, 271-6 (2001).
32. Turner, J.M. *et al.* BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr Biol* **14**, 2135-42 (2004).
33. van der Heijden, G.W. *et al.* Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat Genet* **39**, 251-8 (2007).
34. Dimitrov, S., Dasso, M.C. & Wolffe, A.P. Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. *J. Cell Biol.* **126**, 591-601 (1994).
35. Shechter, D. *et al.* A distinct H2A.X isoform is enriched in *Xenopus laevis* eggs and early embryos and is phosphorylated in the absence of a checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 749-54 (2009).
36. da Rocha, S.T. & Heard, E. Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 197-204 (2017).
37. Ellis, P.J. *et al.* Deletions on mouse Yq lead to upregulation of multiple X- and Y-linked transcripts in spermatids. *Hum Mol Genet* **14**, 2705-15 (2005).
38. Reynard, L.N. & Turner, J.M. Increased sex chromosome expression and epigenetic abnormalities in spermatids from male mice with Y chromosome deletions. *J Cell Sci* **122**, 4239-48 (2009).
39. Tarabay, Y. *et al.* Tex19 paralogs are new members of the piRNA pathway controlling retrotransposon suppression. *J Cell Sci* **130**, 1463-1474 (2017).

40. Greaves, I.K., Rangasamy, D., Ridgway, P. & Tremethick, D.J. H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 525-30 (2007).
41. Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S. & Shinohara, T. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells in vivo. *Biol Reprod* **71**, 1202-7 (2004).
42. Hess, R.A. & Renato de Franca, L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* **636**, 1-15 (2008).
43. Meistrich, M.L. & Hess, R.A. Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules. *Methods Mol Biol* **927**, 299-307 (2013).
44. Bellve, A.R. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* **225**, 84-113 (1993).
45. Buchou, T. *et al.* Purification and Analysis of Male Germ Cells from Adult Mouse Testis. *Methods Mol Biol* **1510**, 159-168 (2017).
46. Goutte-Gattat, D. *et al.* Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8579-84 (2013).
47. Roulland, Y. *et al.* The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity. *Mol Cell* (2016).
48. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S.L. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25 (2009).
49. Ye, T. *et al.* seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic Acids Res* **39**, e35 (2011).
50. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105-11 (2009).
51. Anders, S. & Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106 (2010).
52. Love, M.I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
53. Hochberg, Y. & Benjamini, Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* **9**, 811-8 (1990).

CHAPITRE V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'importance fonctionnelle du variant d'histone H3.3 dans la fertilité masculine chez la souris. Lorsque mes travaux ont commencé quelques articles, parfois contradictoires, avaient observé que l'absence de H3.3 provoquait une chute de la fertilité. Seulement, le rôle exact de ce variant ainsi que les processus sous-jacents auxquels il appartient, n'ont pas été abordés dans ces études. C'est dans ce contexte que j'ai commencé mes travaux de thèse.

L'objectif premier de mon travail a été de déterminer si le variant H3.3 possède bien un rôle dans la fertilité. Pour cela, des modèles de souris transgéniques ont été utilisés. La double délétion des deux isoformes de H3.3, H3.3A et H3.3B, n'étant pas viable, notre étude utilise donc des souris transgéniques dépourvues de l'un ou de l'autre de ces isoformes. Nos résultats ont permis de confirmer que l'absence de H3.3B perturbe la fonction reproductrice masculine à tel point que les souris présentent une subfertilité sévère.

Contrairement à la publication, les souris dépourvues en H3.3A sont viables et fertiles (Couldrey et al., 1999). L'une des explications les plus probables serait que H3.3A représente une faible partie des protéines H3.3 totale au sein de la spermatogenèse. Deux équipes ont montrées que la quantité de H3.3A dans la spermatogenèse est plus faible que la quantité de H3.3B (Bramlage et al., 1997; Yuen et al., 2014). La diminution de la quantité totale des protéines H3.3, engendrée par l'absence de H3.3A, serait donc trop faible pour induire un phénotype visible. En parallèle, nous avons montré que la transcription du gène de la protéine H3.3A n'était pas modifiée en l'absence de H3.3B. Les cellules germinales ne cherchent donc pas à compenser la perte en H3.3B par une surproduction de H3.3A. Néanmoins, nous savons que de nombreuses régulations peuvent encore avoir lieu après la transcription. Pour statuer sur cette hypothèse, la réalisation d'un western blot sur les cellules en méioses et en post-méioses devra être effectuée avec l'anticorps H3.3 sur des souris dépourvues en H3.3B, en H3.3A et sauvage.

Pour comprendre l'origine de l'infertilité chez ces souris, nos travaux se sont orientés vers la recherche de l'étape clé, altérée par l'absence de H3.3B. Trois origines étaient alors possibles : soit lors de la spermatogenèse, soit lors de la fécondation de l'ovule et en dernier lieu lors de l'embryogénèse. Nos résultats prouvent que les anomalies surviennent lors de la spermatogenèse. En effet, le spermogramme ainsi que les coupes histologiques indiquent clairement une chute du nombre de spermatozoïdes (oligozoospermie). Ces derniers ont également la particularité d'être pour la grande majorité, anormaux. On trouve jusqu'à 80% de spermatozoïdes morphologiquement anormaux (térazoospermie). *In fine*, ces spermatozoïdes sont très peu féconds comme le montrent les résultats de fécondation *in vitro*. Ces résultats ont été confirmés par une autre équipe qui a publié pendant ma thèse (Yuen et al., 2014). Notre étude est allée plus loin en démontrant que l'origine de tous ces défauts trouvait sa source en méiose mais aussi lors du passage méiose/post-méiose dans nos souris modèles. En effet, on observe une entrée massive en apoptose des cellules méiotiques conduisant à une chute dramatique du nombre de cellules post-méiotiques, spermatides rondes et spermatozoïdes. L'adjonction de l'ensemble de ces défauts conduit inéluctablement à l'infertilité des souris mâles transgéniques H3.3B^{KO}.

Que se passe-t-il en méiose et lors de la transition méiose/post-méiose ? Quels sont les mécanismes mis en jeu par le variant d'histone H3.3B dans ces étapes de la vie ? Pour répondre à tous ces questionnements, il était primordial de définir la localisation de H3.3A et H3.3B tant en méiose qu'en post-méiose. Mes résultats mettent en exergue un enrichissement de H3.3A comme de H3.3B spécifique sur les chromosomes sexuels tant en méiose (pachytène) qu'en post-méiose (spermatide ronde) confirmant ainsi les données décrites en 2007 (van der Heijden et al., 2007). De manière surprenante, nos résultats de ChIP-seq indiquent la présence de manière uniforme de H3.3 sur tout le long des chromosomes sexuels. Cette répartition uniforme, sans enrichissement local ou diminution d'une histone le long de chromosomes entiers est un phénomène atypique.

Le variant d'histone H3.3 a de nombreuses fois été cité comme acteur dans la régulation de la transcription (Mito et al., 2005; Schwartz, 2005) dans des cellules somatiques.

L'un de nos objectifs a ensuite naturellement été d'explorer l'état transcriptionnel des cellules en méiose et en post-méiose par RNAseq. Nos données ont montré une régulation importante mais proportionnée entre les gènes sur-exprimés et sous-exprimés lors du passage méiose/post-méiose sur les autosomes. En l'absence de H3.3B, des dérégulations sont présentes mais n'altèrent pas une voie de régulation génique en particulier. Ces données laissent supposer que H3.3 ne participe pas à la régulation de gènes spécifiques tant en méiose qu'en post-méiose.

En revanche, sur les chromosomes sexuels, nos résultats indiquent une forte répression de transcription en méiose suivie par une réactivation partielle en post-méiose (spermatides rondes) chez les souris sauvages. Ces données confirment celles publiées par l'équipe de Julie Cocquet en 2016 (Moretti et al., 2016). Chez les souris dépourvues en H3.3B, on observe le même phénomène de répression transcriptionnelle en méiose et une levée partielle de cette répression en post-méiose. Or en l'absence de H3.3B, la répression des chromosomes sexuels est défectueuse. Les deux chromosomes X et Y présentent une transcription anormale comparée aux souris sauvages. Ce phénomène est conservé entre la méiose et la post-méiose. Or de nombreuses études ont démontré que la présence d'une transcription inappropriée des chromosomes sexuels durant la spermatogenèse était liée à des anomalies sur les spermatozoïdes ainsi qu'à l'infertilité des mâles (Ellis et al., 2005; Reynard and Turner, 2009). Par conséquent, nos résultats montrent que H3.3 est enrichie sur les chromosomes sexuels et que l'absence de H3.3B provoque des défauts d'extinction transcriptionnelle sur ces mêmes chromosomes. H3.3 semble donc être le garant d'une répression transcriptionnelle efficace. En outre, nous pouvons nous demander comment H3.3 structure la fibre de chromatine sur les chromosomes X et Y ? Nos résultats indiquent que la chromatine est naturellement moins accessible à la nucléase micrococcale nucléase sur les chromosomes sexuels que sur les autosomes en méiose mais aussi en post-méiose (spermatides rondes) dans les souris contrôles. La fibre de chromatine est donc résolument différente et plus compacte entre les chromosomes sexuels et les autosomes en méiose et en post-méiose.

Dans une autre mesure, nous avons également analysé si H3.3 possédait un rôle particulier face aux séquences répétées ou d'autres séquences sur les autosomes. Les

séquences répétées ont été investiguées car de nombreuses études font état d'un enrichissement par H3.3 et d'une régulation de certaines de ces séquences dans les cellules somatiques hors spermatogenèse. Nous n'avons pas observé d'enrichissement de H3.3 sur les séquences répétées dans les cellules germinales. H3.3 ne possède pas de rôle essentiel dans la régulation des rétrotransposons de manière générale. Seule la famille des endorétrovirus de type 2 à LTR (Longues régions Terminales Répétées), RLTR10B et RLTR10B2 présente un enrichissement de H3.3. Nous avons montré que paradoxalement c'est la seule famille à ne pas être fortement réprimée lors de l'entrée en post-méiose des cellules. De plus, en l'absence de H3.3B, ces deux familles sont surexprimées. Ces données laissent penser que, comme avec les chromosomes sexuels, H3.3 possède un rôle répresseur dans la transcription des familles RLTR10B et RLTR10B2. On ne connaît pas aujourd'hui pourquoi les rétrotransposons sont extrêmement transcrits en méiose et fortement réprimés en post-méiose, ni même le rôle des deux familles RLTR10B et RLTR10B2 (Isbel et al., 2015; Tarabay et al., 2017).

Les données générées par RNAseq et ChIP-seq ont permis d'identifier une régulation épigénétique d'ordre supérieure dépendante de H3.3 dans la spermatogenèse. En effet, nos résultats montrent pour la première fois que H3.3 régule une voie de production des ARN interférents spécifiques de la spermatogenèse. Non seulement le variant d'histone H3.3 est présent sur une centaine de clusters de piARN mais sa présence est directement corrélée à une activité transcriptionnelle intense en méiose comme en post-méiose. Lorsque H3.3B est absent, on observe à l'inverse une chute d'expression d'une trentaine de ces clusters de piARN. En parallèle, nous avons confirmé des données publiées dans la littérature faisant état d'une très forte régulation des piARN lors du passage méiose/post-méiose de la spermatogenèse. Les piARN constituent une voie de régulation épigénétique encore mal connue même si elle semble fortement liée à la régulation des rétrotransposons mais aussi à d'autres régions géniques.

V.1 LES CHROMOSOMES SEXUELS : QUEL RÔLE POUR H3.3 ?

V.1.1 Rôle de H3.3 dans l'établissement de l'inactivation des chromosomes sexuels en méiose.

Les chromosomes sexuels sont recouverts d'une chromatine atypique durant la spermatogenèse constituée d'hétérochromatine facultative. Cette dernière réalise une pression épigénétique pour inhiber toute transcription (Greaves et al., 2006) en méiose. Elle est composée de plusieurs marques épigénétiques typiques de l'hétérochromatine (H3K9me3, macroH2A) mais aussi et de manière surprenante, de l'euchromatine (H3K27ac).

La formation de cette chromatine atypique sur les chromosomes sexuels est un processus qui reste encore mal compris de nos jours. De nombreuses publications récentes tentent d'élucider l'ordre d'apparition et les mécanismes qui régissent l'établissement de l'inactivation de la transcription des chromosomes sexuels (MSCI) (Adams et al., 2018; Jiang et al., 2018). Néanmoins, on possède aujourd'hui quelques données. Le MSCI se met en place au stade pachytène. De manière surprenante, ce phénomène est extrêmement lié à des protéines de la réparation de l'ADN tel que BRCA1, γ H2AX, MDC1, ATR (Becherel et al., 2013). La protéine BRCA1 est notamment la première à rejoindre les chromosomes sexuels. Localisée sur les points de cassures de l'ADN en zygotène, elle se fixe sur l'élément axial des chromosomes sexuels en pachytène. De là, la machinerie de réponse aux dommages à l'ADN se met en place et ATR phosphoryle H2AX (γ H2AX). Cette marque épigénétique se répand ensuite sur la totalité des chromosomes sexuels. L'histone γ H2AX se lie alors au partenaire MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint 1) pour former le MSCI. Ce dernier recrute RNF8 et SCM2, deux acteurs qui vont agir de concert dans la régulation de l'ubiquitination de protéines et de l'histone H2A sur sa lysine 119.

Dans ce contexte, nos résultats ont mis en exergue deux évènements. Le premier indique que la marque γ H2AX se met en place malgré l'absence de H3.3B. Le variant H3.3 ne possède donc aucun rôle décisif avant l'établissement de la marque γ H2AX. En revanche, l'absence de H3.3B provoque une extinction transcriptionnelle insuffisante. La structure régissant l'inactivation de la transcription des chromosomes sexuels n'est donc pas parfaitement formée. Désormais, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur comment les protéines impliquées dans la constitution de la répression transcriptionnelle réagissent en l'absence de H3.3B. Pour cela, une étude par immunofluorescence avec les anticorps anti-MDC1, anti-RNF8, anti-SCML2, anti-H2A119ub peut être réalisée pour étudier les étapes juste après l'expansion de γ H2AX le long des chromosomes sexuels.

Toutes ces analyses permettraient d'apporter de nouvelles connaissances dans la mise en place du MSCI mais aussi dans l'infertilité. En effet, l'extinction partielle du MSCI a été décrit comme source d'infertilité (Becherel et al., 2013).

V.1.2 Dépôt de H3.3 sur les chromosomes sexuels en pachytène.

Nous avons montré dans ce manuscrit que l'histone variante H3.3 est massivement déposée sur les chromosomes sexuels en pachytène. Aujourd'hui, il reste de nombreuses questions sur, comment H3.3 est dirigé massivement et spécifiquement sur les chromosomes sexuels ? Et qui sont ces partenaires dans ce processus ? L'identification de la chaperonne responsable de son dépôt sera une étape importante pour comprendre ce processus. Or, si l'on se réfère à la littérature, non seulement la chaperonne de H3.3 nommée HIRA a été décrite enrichie sur les chromosomes sexuels en pachytène mais aussi sa seconde chaperonne DAXX (van der Heijden et al., 2007; Rogers et al., 2004). Il serait intéressant de déterminer laquelle de ces deux chaperonnes dépose H3.3. Dans une autre mesure et compte tenu que de très nombreuses protéines de réparation sont impliquées dans la constitution du MSCI, nous pouvons nous demander si le dépôt de H3.3 est lié à un mécanisme de réparation.

Pour répondre à ces questions, une étude de spectroscopie de masse sur des mononucléosomes isolés grâce à l'utilisation successivement de deux anticorps anti- γ H2AX puis anti-H3.3 pourrait être réalisée. Grace à cette technique, nous pourrions identifier les partenaires directs de H3.3 tant pour son dépôt au sein de la chromatine que pour ces fonctions ultérieures au sein du MSCI.

V.1.3 H3.3, marque épigénétique mémoire durant la spermatogenèse ?

Nos résultats montrent que les chromosomes sexuels sont recouverts en H3.3 à partir de la méiose, au stade pachytène, et jusqu'en post-méiose, dans les spermatides rondes. H3.3 semble être une marque mémoire qui se transmet d'une étape à l'autre afin de garantir ce statut si particulier qui caractérise les chromosomes sexuels en méiose et en post-méiose. La présence de H3.3 est corrélée à une chromatine répressive face à la transcription. Lorsque H3.3B est absent, on observe une activation de la transcription inadaptée sur ces chromosomes. Cette pression répressive intense est aussi assurée par plusieurs marques de l'hétérochromatine telles que H3K9me3 ou HP1 (Baarends et al., 1999, 2005; Khalil et al., 2004; Motzkus et al., 1999).

Récemment, deux autres marques épigénétiques H3K27ac et H3K4me2 ont été identifiées conservées, elles aussi, de la méiose à la post-méiose sur les chromosomes sexuels. Ces marques épigénétiques sont liées à des régions actives de la chromatine. Elles sont incorporées à la chromatine en fin de pachytène sur certains promoteurs et perdurent dans les spermatides rondes (Adams et al., 2018). L'équipe de Adams suggère que ces marques constituent une mémoire entre la méiose et la post-méiose pour une activation rapide de ces promoteurs dès l'entrée en spermatides rondes. Quel impact H3.3 a-t-il sur ce phénomène de réactivation locale de certains promoteurs? Pour répondre à cette question, nous pourrions analyser si ces marques épigénétiques sont altérées par l'absence de H3.3B dans les pachytènes et les spermatides rondes par western blot et par immunofluorescence.

Comme nous venons de l'aborder, en post-méiose, la pression de l'hétérochromatine se fait moins forte localement ce qui permet à certains gènes porteurs de marques épigénétiques particulières d'être exprimés. Ceci est d'autant plus important que les chromosomes sexuels sont particulièrement riches en gènes nécessaires à la spermiogenèse. Or il a été montré que H2AZ, un variant de l'histone H2A est fortement incorporé à la chromatine des chromosomes sexuels en post-méiose. Des études ont montrées que la présence du variant H3.3 à la place de H3 au sein du nucléosome le rendait moins stable. Le plus intéressant est que l'association du double variant H3.3-H2A.Z au sein du nucléosome présente une instabilité encore plus importante que le nucléosome contenant H3.3-H2A (Jin and Felsenfeld, 2007; Jin et al., 2009). Cette instabilité peut être un atout pour faciliter les échanges rapides sur la chromatine. On peut supposer que ces nucléosomes doubles variants H3.3-H2A.Z en post-méiose jouent un rôle dans la levée de la répression transcriptionnelle localement. Probablement moins stables, ces nucléosomes permettraient de lever par endroit la forte pression exercée par les marques d'hétérochromatine. Il serait intéressant de regarder par ChIP-Seq où H2A.Z se localise le long des chromosomes sexuels et de comparer avec les gènes actifs dans les spermatides rondes. De même, en l'absence de H3.3B, nous pourrions analyser si H2AZ présente une incorporation à la chromatine identique par rapport aux échantillons sauvages dans les spermatides rondes.

En conclusion, il serait intéressant d'analyser si le caractère instable de H3.3 fait de cette histone, une actrice de choix, dans la constitution d'une chromatine flexible et réactive tantôt fortement répressive et tantôt localement active.

V.2 ÉTAT DE LA CHROMATINE SUR LES CHROMOSOMES SEXUELS.

V.2.1 Structure de la chromatine par H3.3 sur les chromosomes sexuels.

Le variant H3.3 ne possède que respectivement 4 et 3 acides aminés différents avec ses deux histones canoniques H3.1 et H3.2. Ces différences modifient en profondeur leurs fonctions mais aussi leurs localisations. Les résultats de notre étude font état d'une accumulation de H3.3 sur les chromosomes sexuels mais pas des deux histones canoniques H3.1 et H3.2. Cet enrichissement est d'un facteur 4 par rapport aux autosomes en méiose et de 2 dans les spermatides rondes en post-méiose.

Nos résultats indiquent après digestion de la chromatine par la nucléase micrococcale (MNase) et séquençage, une chute du nombre de séquence de ~200 pb (taille correspondant à 1 nucléosome) sur les chromosomes sexuels par rapport aux autosomes. La MNase est une enzyme qui coupe l'ADN si ce dernier n'est pas directement en contact avec des protéines telles que les histones. La diminution de la quantité de fragment d'ADN de 200 pb est donc le reflet d'une diminution de l'accessibilité de la MNase à l'ADN sur les chromosomes sexuels. Ce phénomène a lieu en méiose mais aussi en post-méiose. Il est classiquement admis que la diminution de l'accessibilité de la MNase est le signe d'une chromatine hautement compactée. De plus, ce type de chromatine est connue pour être répressive face à la transcription ce que nous constatons également dans nos expériences.

Le modèle que nous proposons va dans ce sens (Figure 41). Ainsi, lors de la méiose, une structure chromatinienne hautement compactée se met en place uniquement sur les chromosomes sexuels participant à l'extinction de la transcription. En post-méiose, des régions sont décompactées localement afin de permettre la réactivation transcriptionnelle de

nombreux gènes nécessaires à la spermiogenèse. Nous avons choisi ce modèle car au vu des données dont nous disposons aujourd'hui, il est le plus cohérent.

Il n'est resté pas moins que d'autres interprétations peuvent être possibles. En effet, lorsque l'on compare l'intensité du DAPI entre les autosomes et les chromosomes sexuels dans les cellules en pachytène, on ne constate pas d'intensification du signal. De manière surprenante, l'ADN ne semble pas localement plus condensé sur les chromosomes sexuels que sur les autosomes en méiose. Les raisons expliquant ce phénomène peuvent être multiples. Le marquage au DAPI est peut-être un marquage trop peu résolutif pour voir une ultracompression de la chromatine en méiose ou alors d'autres agents peuvent participer à gêner la digestion de la MNase. Il faut considérer que les chromosomes sexuels sont fortement enrichis en protéines de réparation. Cet encombrement peut-il altérer l'accessibilité de la MNase ? Ou est-ce lié à une conformation spécifique de l'ADN sur les chromosomes sexuels ?

V.2.2 Composition de la chromatine en l'absence de H3.3B sur les chromosomes sexuels ?

Le modèle que nous présentons montre une chromatine décompactée chez les souris dépourvues en H3.3B par rapport aux souris sauvages sur les chromosomes sexuels. Nous n'avons pas prouvé cette décompaction mais nous supposons qu'elle existe puisque les chromosomes sexuels sont transcriptionnellement plus actifs. Pour vérifier notre hypothèse, il faudrait analyser l'accessibilité de la MNase des chromosomes sexuels en comparaison avec les autosomes. Cette analyse doit être réalisée dans les pachytènes et les spermatides rondes chez les souris dépourvues en H3.3B par rapport aux souris contrôles. À travers ce test, nous pourrions également discerner la présence de nucléosomes incomplets ou un manque de nucléosomes formés sur les chromosomes sexuels. Le premier phénomène est visible car l'ADN enroulé autour d'un octamère est plus long que celui enroulé autour d'un tétramère. Le second phénomène est facilement détectable car le nombre de séquences résistant à la

digestion par la MNase diminue. En effet, en l'absence de H3.3B, qui prend la place de l'histone H3 au sein du nucléosome ? Est-il seulement remplacé ?

Cinq protéines peuvent remplacer H3.3B grâce à leur structure proche : H3.3A, H3.1, H3.2, H3t et CENP-A (Figure 41) La première candidate est l'histone variante H3.3A. Nous avons montré que la transcription du gène *H3f3a* n'était pas modifiée en l'absence de H3.3B. Les cellules germinales ne cherchent donc pas à compenser la perte en H3.3B par une surproduction de H3.3A. Egalement, nos résultats d'immunomarquages montrent que H3.3A reste enrichie sur les chromosomes sexuels mais sa présence ne suffit pas à assurer la fonction des deux H3.3 puisque nous avons observé un phénotype altéré. Les trois autres candidates sont les histones canoniques H3.1 et H3.2 et l'histone variante H3t. Il a été montré en 2007 que H3.1 et H3.2 les deux histones canoniques ne pouvaient pas être déposées sur les chromosomes sexuels ainsi que H3t en 2017 (van der Heijden et al., 2007; Ueda et al., 2017). CENP-A est la dernière candidate à posséder l'histone fold de H3 mais elle possède une composition générale assez éloignée de H3.3. Sa présence peut engendrer la formation de néocentromère le long des chromosomes sexuels. Un pseudo-kinétochore se formerait alors sur ces enplacements ce qui serait extrêmement délétaire lors des divisions méiotiques. Des immunomarquages contre ces différentes protéines pourraient nous renseigner si l'une ou l'autre des ces protéines se délocalisent pour compenser la perte de H3.3B. De même, l'augmentation d'une de ces protéine candidate peut être rapidement visible par western blot.

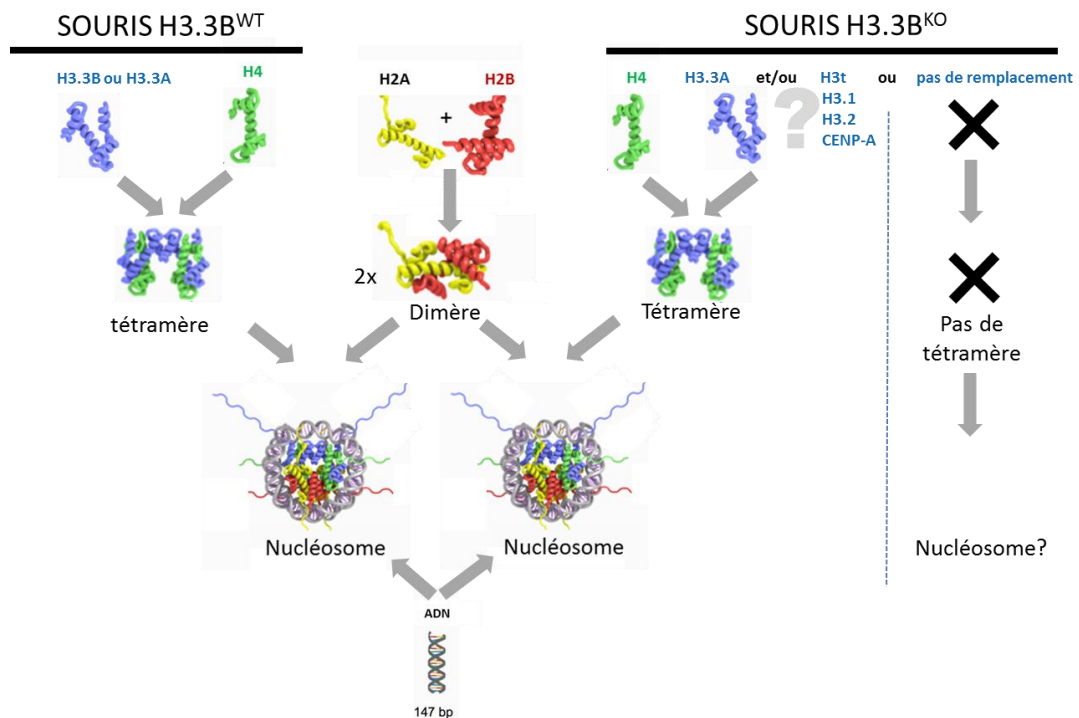


Figure 41 : Illustration représentant la formation d'un nucléosome contenant le variant d'histone H3.3 en présence ou en absence de la forme H3.3B sur les chromosomes sexuels dans la spermatogenèse. Il est admis que le nucléosome se forme à partir d'un tétramère composé de deux histones de la famille de H3 liées à deux histones H4. Ce tétramère est rejoint par deux dimères d'histones H2A-H2B pour former le nucléosome sur un fragment d'ADN. Dans la spermatogenèse, les nucléosomes formés sur chromosomes sexuels sont riches en histones variants H3.3 soit de la forme H3.3A, soit de la forme H3.3B. En l'absence de H3.3B, le variant H3.3A est présent mais ne suffit pas pour composer chacun des nucléosomes. D'autres variants de la famille des histones H3 peuvent remplacer H3.3B absent tels que H3t, H3.1, H3.2 ou CENP-A. Si aucun de ces variants n'est en capacités d'être déposés sur les chromosomes sexuels en méiose et en post-méiose alors le tétramère (H3-H4)₂ ne peut pas se former.

Si aucune d'entre elles cherche à compenser le manque de H3.3 alors l'histone H4 ne peut pas former de dimère et par voie de conséquence le nucléosome ne peut probablement pas être constitué. En effet, il est classiquement admis que l'initiation de la formation d'un nucléosome est le résultat de la dimérisation d'une histone de la famille H3 avec une histone H4. Les deux dimères H3-H4 s'associent ensuite pour former un tétramère. En dernier lieu, ce tétramère est rejoint par deux dimères H2A-H2B pour former le nucléosome complet autour duquel l'ADN s'enroule sur 147 pb (Alberts et al., 2002; Bönisch and Hake, 2012). L'histone H4 est en capacité de s'associer par dimérisation uniquement avec des histones de la famille des H3. Sans la présence d'une histone de la famille des H3, H4 n'est donc pas en mesure d'initier un nucléosome. Dans ce cadre, il est fort probable que la chromatine sur les chromosomes sexuels ogure un manque de nucléosome. La compaction de la chromatine est donc plus relachée et la transcription plus permissive. Afin d'analyser cette hypothèse, un

marquage des cellules avec un anticorps H4, H2A et/ou H2B et une analyse d'image comparant les autosomes et les chromosomes sexuels dans le cas de souris sauvages ou dépourvues en H3.3B permettrait probablement d'apporter quelques éléments de réponses à cette question.

Au vu de l'ensemble de ces données, nous pouvons légitimement nous demander : quelle est la structure exacte de la fibre de chromatine sur les chromosomes sexuels ? Et plus précisément quelle est la contribution de H3.3 dans cette structure ? Fait marquant, H3.3 est répartie uniformément tout le long du génome des deux chromosomes sexuels X et Y. Ce phénomène est rarissime dans le domaine de l'épigénétique. Seul l'ARN Xist a été décrit recouvrir un chromosome. De manière surprenante, ce phénomène a lieu pour inactiver l'un des deux chromosomes sexuels X dans les cellules somatiques et dans l'embryogénèse précoce. Dans notre cas, H3.3 est capable d'inactiver les deux chromosomes sexuels X et Y en même temps.

Aujourd'hui avec les données dont nous disposons, il nous est impossible d'expliquer pourquoi H3.3 se localise ainsi et les conséquences que cela provoque sur la structure tridimensionnelle de la chromatine. Dans ce cadre, nous pourrions analyser par microscopie à force atomique ou par microscopie électronique, la structure de la fibre de chromatine reconstituée *in vitro* avec des nucléosomes contenant γ H2AX, H3.3 et/ou les histones canoniques H3.1 et H3.2.

V.3 LA RÉGULATION DES piARN PAR H3.3.

Les piARN sont des ARN interférents gardiens de l'intégrité génétique lors de la spermatogenèse. Ils sont exprimés dans les spermatogonies et les cellules méiotiques dans la spermatogenèse. Certains auteurs les ont organisés en trois groupes : pré-pachytène, pachytène et hybride (Gan et al., 2011; Modzelewski et al., 2012). Dans ce cadre, il serait intéressant d'analyser si H3.3 est déposé plus favorablement sur les piARN de l'un de ces 3 groupes. De même, si les 35 piARN altérés par l'absence de H3.3B font majoritairement

partie de l'un ou l'autre de ces groupes. Dans une autre mesure, on peut se demander si H3.3 est déjà présent sur les piARN dès le stade des spermatogonies.

Nos résultats indiquent que H3.3 est un acteur favorisant l'expression des piARN. Aujourd'hui nous pouvons nous demander si son action est générale sur les piARN ou ciblée plus particulièrement sur les promoteurs ? Or la régulation des promoteurs de piARN n'a pas encore été exactement déterminée. Il a été démontré que le facteur de transcription A-MYB était un régulateur essentiel dans la régulation l'expression des piARN en pachytène (Bolcun-Filas et al., 2011; Li et al., 2013b; Trauth et al., 1994). Ce facteur possède la capacité d'intervenir au niveau des promoteurs. Sa particularité est d'agir non seulement sur les sites d'initiation de la transcription des piARN mais aussi de nombreux partenaires des piARN (TDRD1, TDRD3, PIWIL1). À lui seul A-MYB semble orchestrer la régulation d'expression des piARN. Le site de reconnaissance de A-MYB est situé au niveau des promoteurs des clusters de piARN en pachytène. Il serait intéressant d'analyser plus en détail la répartition de H3.3 sur les piARN en prenant en compte la localisation de A-MYB. Le but *in fine* serait d'analyser si un enrichissement du variant H3.3 est présent sur le promoteur des piARN.

En 2017, BTBD16 a été identifiée comme acteur de la régulation des piARN pachytène. Cette protéine est impliquée dans de nombreux processus incluant la dégradation de protéines, la transcription ou la tumorigénèse (Perez-Torrado et al., 2006). L'absence de BTBD16 dans les souris provoque une réduction significative de la moitié des clusters de piARN pachytènes (Zhou et al., 2017). Ce phénomène s'accompagne d'une stérilité de la souris mâle par apoptose des cellules en méiose uniquement au stade XII et I (stade fin de pachytène-division méiotique) sans pour autant engendrer une augmentation des éléments transposables. Les auteurs émettent l'hypothèse que la nature chromatinienne des clusters de piARN de pachytène (acétylation des lysines et crotonylation) serait un facteur lié à la dépendance de BTBD16 pour leur régulation (Zhou et al., 2017). Il serait intéressant de replacer le variant H3.3 dans ce contexte afin d'analyser si H3.3 possède un lien avec la régulation des piARN dépendante de BTBD16. De plus, l'analyse d'interaction directe ou indirecte entre H3.3 et BTBD16 permettrait peut-être d'apporter une nouvelle vision quant à la régulation des piARN.

V.4 RÉGULATION DES RÉTROTRANSPOSONS DURANT LA SPERMATOGENÈSE ET IMPACT DE H3.3.

La régulation des rétrotransposons est un mécanisme qui fait largement intervenir la méthylation de l'ADN et les piARN dans les cellules germinales. Nos résultats ont montré une forte répression des rétrotransposons lors du passage méiose/post-méiose qui est indépendant de la présence de H3.3.

La famille de rétrotransposons, RLTR10B et RLTR10B2 suit un autre destin. En effet, ces rétrotransposons restent autant transcrits en méiose qu'en post-méiose. Ces deux rétrotransposons font partie de la classe des LTR, sous famille ERV2. La séquence RLTR10B est composée de 333 pb et RLTR10B2 de 380 pb selon la RepBase du Genetic Information Research Institute (GIRI). Nos données montrent que H3.3 est présent sur les séquences RLTR10B et RLTR10B2 tant en méiose qu'en post-méiose. De plus, en l'absence de H3.3B, une augmentation de l'expression de ces deux familles est décelée. Au vu de ces résultats, nous pouvons supposer que H3.3 possède un rôle répresseur dans l'expression de ces deux types de séquences répétées.

Cette augmentation est significative mais reste néanmoins modérée, ne dépassant pas le facteur 2 ce qui peut être le signe d'une régulation différente entre les séquences répétées dans une même famille. H3.3 régulerait certaines séquences mais pas toutes. Ce phénomène est très probable compte tenu de la grande diversité de localisation de ces séquences dans le génome. En effet, elles ne sont pas uniques mais au contraire répétées dans tout le génome (Figure 42). D'après la base de données Dfam, les répétitions de RLTR10B sont détectées 990 fois et 750 fois pour RLTR10B2 sur le génome de *Mus musculus* (Hubley et al., 2016). Chaque chromosome de la souris est porteur de plusieurs séquences RLTR10B et RLTR10B2. Dans ce contexte, il est tout à fait probable que certaines séquences possèdent des régulations différentes influencées par leur localisation. Il serait intéressant de déterminer où se situent les rétrotransposons régulés par H3.3 mais comme ces séquences sont identiques nous ne pouvons pas les différencier les unes des autres.

D'après nos résultats, H3.3 est fortement présent sur les chromosomes sexuels. Or sur la figure 42, nous pouvons observer que ces chromosomes sont porteurs de nombreuses séquences répétées RLTR10B et RLTR10B2. Dans ce contexte, l'augmentation de transcription de ces deux familles, en l'absence de H3.3B, peut être directement liée à leur localisation sur les chromosomes sexuels et au rôle si particulier de H3.3 sur ces derniers.

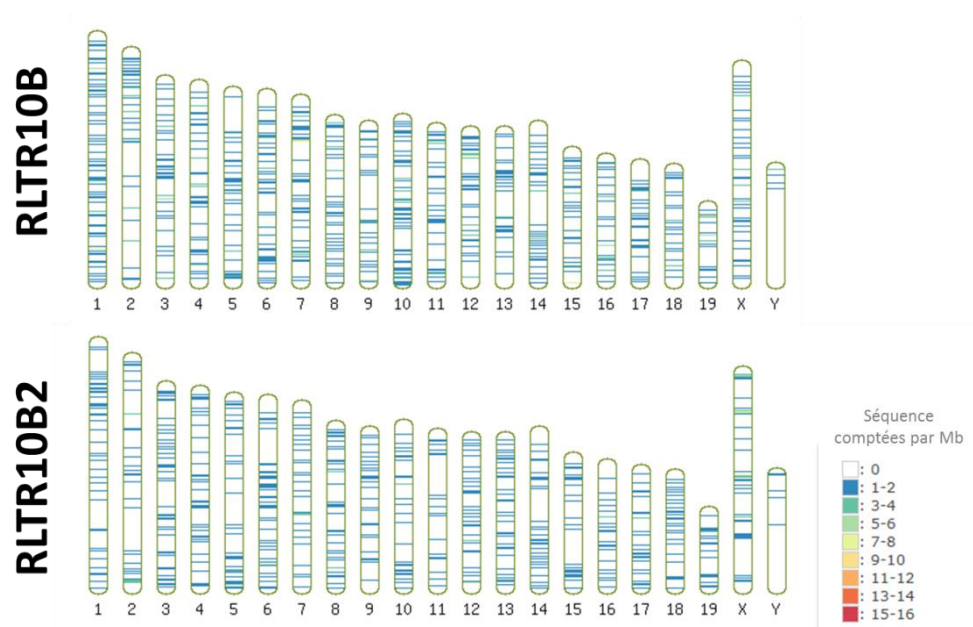


Figure 42 : Distribution des séquences répétées RLTR10B et RLTR10B2 sur un caryotype de souris. Les séquences répétées RLTR10B (en haut) et RLTR10B2 (en bas) sont représentées en couleurs le long des chromosomes de souris. L'échelle de couleur est dépendante du nombre de séquences détectées par Mbase (échelle des couleurs allant du bleu, pour 1 à 2 séquences au rouge pour 15 à 16 séquences détectées). RLTR10B et RLTR10B2 se trouvent présent sur chacun des chromosomes. Pour la séquence répétées RLTR10B, il a été détecté 990 positions et 750 pour la séquence RLTR10B2. Image recueillis auprès de la base de donnée Dfam (Hubley et al., 2016)

Il n'en reste pas moins que nous ne connaissons pas les partenaires de H3.3 sur ces rétrotransposons, ni même si, ceux portés par les chromosomes sexuels sont de nouveaux transcrits en post-méiose comme plusieurs gènes important dans cette étape. Compte tenu que ces deux familles ont été décrites comme impliquées dans l'infertilité masculine (Isbel et al., 2015; Tarabay et al., 2017), il serait intéressant d'apporter des réponses à ces questions. Pour cela, nous pourrions analyser les liens éventuels entre A-MYB, Trim33 et H3.3. En effet, en 2015, une étude a montré que l'expression de RLTR10B et RLTR10B2 est régulée par A-MYB et Trim33 (Isbel et al., 2015). Notons, que la séquence de reconnaissance de Trim33 contient la séquence de reconnaissance de A-MYB. En revanche, A-MYB est décrit comme étant un activateur de la transcription de ces deux familles, à l'inverse, Trim33 joue un rôle

répresseur. De fait, Trim33 a-t-il une affinité particulière avec H3.3 ? En l'absence de H3.3B, Trim33 est-il capable de réguler l'expression de RLTR10B et RLTR10B2 ? Pour cela, nous pourrions réaliser une ChIP avec un anticorps anti-Trim33 puis l'anticorps anti-H3.3.

V.5 LE PARADOXE H3.3.

Nos résultats mettent en exergue un paradoxe intéressant. D'une part, nos résultats montrent le rôle répresseur de H3.3 sur les chromosomes sexuels mais aussi sur deux familles de rétrotransposons RLRT10B et RLTR10B2. D'autre part, H3.3 a la capacité d'être activateur de l'expression de piARN. Ce paradoxe se retrouve dans les cellules somatiques hors spermatogenèse. Notamment, en fonction de la chaperonne qui prend en charge H3.3, cette dernière est soit déposée sur des régions d'hétérochromatine ou alors d'euchromatine. Cette particularité lui a valu le surnom d'histone à « double visage » par l'équipe de Geneviève Almouzni (Szenker et al., 2011). Malgré de nombreuses études, il reste encore beaucoup à découvrir sur le rôle ou les rôles exacts de H3.3 au sein de la chromatine.

V.6 H3.3 ACTEUR ESSENTIEL DE LA SPERMATOGENÈSE ET DE LA MÉIOSE.

Dans ce manuscrit, nous avons pu apprécier l'importance de H3.3 dans le processus de spermatogenèse. On observe notamment une entrée en apoptose des cellules en prophase I de méiose ainsi que dans la transition méiose/post-méiose en absence de H3.3B. Cette transition est le moment où les deux divisions méiotiques surviennent successivement et extrêmement rapidement. Or la ségrégation des chromosomes est un élément clé dans l'aboutissement d'une division réussie.

Quelques études font un lien entre H3.3 et la ségrégation des chromosomes lors de divisions cellulaires en mitose comme en méiose. En effet, dans les cellules souches ou dans les fibroblastes de souris, l'absence de H3.3 provoque des anomalies de ségrégation des chromosomes en mitose (Jang et al., 2015; Ors et al., 2017). Il est vrai que la mitose et la méiose présentent de très nombreuses différences. Néanmoins, certaines organisations

générales restent conservées. De manière intéressante, une étude effectuée chez la *Drosophile*, montre que l'absence de H3.3 induit aussi des défauts importants de ségrégation des chromosomes mais cette fois-ci lors de la méiose des gamètes mâles. Les cellules post-méiotiques résultant de cette division présentent de très nombreuses anomalies telles que des noyaux trop volumineux ou à l'inverse particulièrement petits mais aussi polynucléés (Sakai et al., 2009). Ces données montrent que les cellules post-méiotiques ont acquis ou au contraire perdu du matériel génétique. Pour le mâle dépourvu de H3.3, la conséquence finale est une perte totale de fertilité.

Au vu de ces données et compte tenu de nos observations, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur l'alignement des chromosomes en métaphase ainsi que leur ségrégation lors de la division méiotique. De même, on est en droit de se demander si les spermatozoïdes possèdent le nombre adéquat de chromosome en l'absence de H3.3B chez la souris. En effet, si des anomalies chromosomiques sont présentes en post-méiose, cela pourrait expliquer deux phénomènes observés. Le premier est la multitude d'anomalies observées au niveau des spermatozoïdes qui seraient le résultat d'une multitude d'altérations chromosomiques différentes. Le second phénomène, la mort précoce des souriceaux issus d'un accouplement avec un mâle H3.3B^{KO}, pourrait être causée par la présence d'anomalies génétiques.

V.7 INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE

L'avènement des techniques tel que la fécondation *in vitro* classique ou l'injection spermatique ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) ou ROSI (ROund Spermatids Injection) ont permis d'apporter une solution thérapeutique pour de nombreux couples stérils désireux de réaliser un projet parental. Néanmoins pour une partie des couples, consultant dans les services de procréation médicalement assistée, ces solutions ne sont malheureusement pas applicables notamment lorsque l'anomalie survient en amont de la méiose. Pour pallier à cela, de nombreuses équipes ont tentées depuis plusieurs dizaines d'années, de développer des méthodes alternatives pour mimer la spermatogenèse de manière *in vitro*, soit par culture d'organe, soit à partir de culture de cellules souches germinales. Seulement, la spermatogenèse est un phénomène extrêmement complexe tant dans le processus de différenciation cellulaire que dans l'organisation en trois dimensions du tubule séminifère

(Griswold, 2016; Johnston et al., 2008; Meistrich and Hess, 2013). Malgré de nombreux progrès significatifs, ces dernières années, la spermatogenèse *in vitro* est restée sans succès. Seul deux articles paru en 2011 de Takuya Sato relatent l'obtention de spermatozoïdes fertiles mais seulement à partir d'une culture d'organe de souris (Sato et al., 2011a, 2011b). La maîtrise de cette technologie sur le long terme ainsi que sa mise en place en routine chez l'homme reste encore de nos jours un défi. Ce dernier pourra être relevé seulement si les mécanismes régissant une spermatogenèse réussie sont connus. Dans ce cadre, notre étude prend tout son sens. En effet, elle participe à la compréhension des phénomènes nécessaires au bon déroulement de la spermatogenèse tant dans la régulation des chromosomes sexuels, des piARN que des rétrotransposons.

V.8 CONCLUSION GÉNÉRALE

Le variant d'histone H3.3 est indéniablement essentiel au processus de formation du spermatozoïde et plus largement à la fertilité masculine. Son absence provoque un blocage par entrée en apoptose des cellules méiotiques provoquant une chute dramatique de cellules en post-méiose. L'une des caractéristiques des cellules méiotiques mais aussi post-méiotiques est le destin particulier des chromosomes sexuels. Ces derniers sont exclus des autosomes et placés sous un contrôle répressif intense face à la transcription. Nos données ont permis de mettre en lumière le rôle important de H3.3 dans le maintien d'une chromatine répressive dans le MSCI en méiose et en post-méiose. Si la quantité de H3.3 diminue fortement par l'absence de H3.3B, les chromosomes sexuels ne sont pas suffisamment réprimés. Ce phénomène a été décrit comme impliqué dans l'infertilité masculine. Dans une autre mesure, le caractère répressif de H3.3 face à la transcription a été détecté dans deux familles de rétrotransposons, RLTR10B et RLTR10B2. L'expression de ces deux familles a, elle aussi, été décrite comme altérée dans le cas d'infertilité. À l'inverse, H3.3 possède aussi la capacité opposée de favoriser la transcription en particulier celle des piARN. Les piARN sont des ARN interférents spécifiques des cellules germinales. La modification de leurs expressions ainsi que celles de leurs partenaires a un effet immédiat sur l'altération de la spermatogenèse. En l'absence de H3.3B, l'infertilité observée est probablement due à un effet cumulatif de chacun de ces défauts.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'histone variante H3.3 joue un rôle central mais aussi multiple dans le déroulement de la spermatogenèse.

CHAPITRE VI. RÉFÉRENCES

- Adam, S., Polo, S.E., and Almouzni, G. (2013). Transcription recovery after DNA damage requires chromatin priming by the H3.3 histone chaperone HIRA. *Cell* 155, 94–106.
- Adams, S.R., Maezawa, S., Alavattam, K.G., Abe, H., Sakashita, A., Shroder, M., Broering, T.J., Sroga Rios, J., Thomas, M.A., Lin, X., et al. (2018). RNF8 and SCML2 cooperate to regulate ubiquitination and H3K27 acetylation for escape gene activation on the sex chromosomes. *PLoS Genet.* 14.
- Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200.
- Ahmed, E.A., and de Rooij, D.G. (2009). Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 558, 263–277.
- Aihara, K., Mukasa, A., Gotoh, K., Saito, K., Nagae, G., Tsuji, S., Tatsuno, K., Yamamoto, S., Takayanagi, S., Narita, Y., et al. (2014). H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro-Oncol.* 16, 140–146.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). Chromosomal DNA and Its Packaging in the Chromatin Fiber. *Mol. Biol. Cell* 4th Ed.
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., Rooij, D.G. de, Pelt, A.M.M. van, and Page, D.C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14976–14980.
- Angelov, D., Molla, A., Perche, P.-Y., Hans, F., Côté, J., Khochbin, S., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2003). The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol. Cell* 11, 1033–1041.
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., et al. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 442, 203–207.
- Aravin, A.A., Naumova, N.M., Tulin, A.V., Vagin, V.V., Rozovsky, Y.M., and Gvozdev, V.A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr. Biol.* 11, 1017–1027.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 5, 337–350.
- Arnheim, N., and Calabrese, P. (2009). Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations. *Nat. Rev. Genet.* 10, 478–488.

- Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2010). Histone H4 Acetylation is Essential to Proceed from a Histone- to a Protamine-based Chromatin Structure in Spermatid Nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56, 44–61.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H., and Grootegoed, J.A. (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* 207, 322–333.
- Baarends, W.M., Wassenaar, E., van der Laan, R., Hoogerbrugge, J., Sleddens-Linkels, E., Hoeijmakers, J.H.J., de Boer, P., and Grootegoed, J.A. (2005). Silencing of Unpaired Chromatin and Histone H2A Ubiquitination in Mammalian Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1041–1053.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22, 2773–2785.
- Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.-M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., et al. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat. Genet.* 13, 336–342.
- Balhorn, R., Gledhill, B., and Wyrobek, A. (1977). Mouse Sperm Chromatin Proteins - Quantitative Isolation and Partial Characterization. *Biochemistry* 16, 4074–4080.
- Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381.
- Bao, J., and Bedford, M.T. (2016). Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* 151, R55–R70.
- Barral, S., Morozumi, Y., Tanaka, H., Montellier, E., Govin, J., de Dieuleveult, M., Charbonnier, G., Couté, Y., Puthier, D., Buchou, T., et al. (2017). Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells. *Mol. Cell* 66, 89-101.e8.
- Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C., and Alt, F.W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell* 114, 359–370.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and de Massy, B. (2010). PRDM9 Is a Major Determinant of Meiotic Recombination Hotspots in Humans and Mice. *Science* 327, 836–840.
- Becherel, O.J., Yeo, A.J., Stellati, A., Heng, E.Y.H., Luff, J., Suraweera, A.M., Woods, R., Fleming, J., Carrie, D., McKinney, K., et al. (2013). Senataxin Plays an Essential Role with DNA Damage Response Proteins in Meiotic Recombination and Gene Silencing. *PLoS Genet.* 9, e1003435.
- Beck, C.R., Garcia-Perez, J.L., Badge, R.M., and Moran, J.V. (2011). LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 12, 187–215.

- Becker, P.B., and Hörz, W. (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 247–273.
- Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., Cutter, A.R., Papai, G., Reymer, A., Syed, S.H., Lone, I.N., Tonchev, O., Crucifix, C., et al. (2017). Structure and dynamics of a 197 base-pair nucleosome in complex with linker histone H1. *Mol. Cell* *66*, 384–397.e8.
- Behjati, S., Tarpey, P.S., Presneau, N., Scheipl, S., Pillay, N., Van Loo, P., Wedge, D.C., Cooke, S.L., Gundem, G., Davies, H., et al. (2013). Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat. Genet.* *45*, 1479–1482.
- Bellani, M.A. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J. Cell Sci.* *118*, 3233–3245.
- Bellvé, A.R. (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol.* *225*, 84–113.
- Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2007). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J. Cell Biol.* *178*, 925–936.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., et al. (2005). Genomic Maps and Comparative Analysis of Histone Modifications in Human and Mouse. *Cell* *120*, 169–181.
- Billon, P., and Côté, J. (2013). Precise deposition of histone H2A.Z in chromatin for genome expression and maintenance. *Biochim. Biophys. Acta* *1819*, 290–302.
- Bisig, C.G., Guiraldelli, M.F., Kouznetsova, A., Scherthan, H., Höög, C., Dawson, D.S., and Pezza, R.J. (2012). Synaptonemal Complex Components Persist at Centromeres and Are Required for Homologous Centromere Pairing in Mouse Spermatocytes. *PLoS Genet.* *8*, e1002701.
- Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., Bax, D.A., Carvalho, D., Taylor, K.R., Vinci, M., et al. (2013). Histone H3.3 Mutations Drive Pediatric Glioblastoma through Upregulation of MYCN. *Cancer Discov.* *3*, 512–519.
- Bolcun-Filas, E., Bannister, L.A., Barash, A., Schimenti, K.J., Hartford, S.A., Eppig, J.J., Handel, M.A., Shen, L., and Schimenti, J.C. (2011). A-MYB (MYBL1) transcription factor is a master regulator of male meiosis. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 3319–3330.
- Bönisch, C., and Hake, S.B. (2012). Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable? *Nucleic Acids Res.* *40*, 10719–10741.
- Bosch, A., and Suau, P. (1995). Changes in core histone variant composition in differentiating neurons: the roles of differential turnover and synthesis rates. *Eur. J. Cell Biol.* *68*, 220–225.
- Bramlage, B., Kosciessa, U., and Doenecke, D. (1997). Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* *62*, 13–20.

- Brown, D.T., Izard, T., and Misteli, T. (2006). Mapping the interaction surface of linker histone H1^o with the nucleosome of native chromatin in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 250–255.
- Buaas, F.W., Kirsh, A.L., Sharma, M., McLean, D.J., Morris, J.L., Griswold, M.D., de Rooij, D.G., and Braun, R.E. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* *36*, 647–652.
- Buchou, T., Tan, M., Barral, S., Vitte, A.-L., Rousseaux, S., Arechaga, J., and Khochbin, S. (2017). Purification and Analysis of Male Germ Cells from Adult Mouse Testis. In *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development*, (Humana Press, New York, NY), pp. 159–168.
- Bush, K.M., Yuen, B.T., Barrilleaux, B.L., Riggs, J.W., O’Geen, H., Cotterman, R.F., and Knoepfler, P.S. (2013). Endogenous mammalian histone H3. 3 exhibits chromatin-related functions during development. *Epigenetics Chromatin* *6*, 7.
- Capy, P. (2005). Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet. Genome Res.* *110*, 457–461.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc’his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Dev. Cell* *12*, 503–514.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat. Cell Biol.* *5*, 675.
- Chadwick, B.P., and Willard, H.F. (2001). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.* *152*, 375–384.
- Chuma, S., and Nakano, T. (2013). piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *368*.
- Chuma, S., Hosokawa, M., Kitamura, K., Kasai, S., Fujioka, M., Hiyoshi, M., Takamune, K., Noce, T., and Nakatsuji, N. (2006). Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 15894–15899.
- Churikov, D., Siino, J., Svetlova, M., Zhang, K., Gineitis, A., Morton Bradbury, E., and Zalensky, A. (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics* *84*, 745–756.
- Clark, D.J., and Kimura, T. (1990). Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J. Mol. Biol.* *211*, 883–896.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* *52*, 198–236.

- Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M., Sukumaran, D.K., and Zarbock, J. (1987). The polypeptide fold of the globular domain of histone H5 in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO J.* 6, 1833–1842.
- Couldrey, C., Carlton, M.B., Nolan, P.M., Colledge, W.H., and Evans, M.J. (1999). A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3 A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2489–2495.
- Czech, B., and Hannon, G.J. (2016). One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem. Sci.* 41, 324–337.
- Daniel Ricketts, M., Frederick, B., Hoff, H., Tang, Y., Schultz, D.C., Singh Rai, T., Grazia Vizioli, M., Adams, P.D., and Marmorstein, R. (2015). Ubinuclein-1 confers histone H3.3-specific-binding by the HIRA histone chaperone complex. *Nat. Commun.* 6, 7711.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819–830.
- Dhar, S., Thota, A., and Rao, M.R.S. (2012). Insights into Role of Bromodomain, Testis-specific (Brdt) in Acetylated Histone H4-dependent Chromatin Remodeling in Mammalian Spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 6387–6405.
- Dhayalan, A., Tamas, R., Bock, I., Tattermusch, A., Dimitrova, E., Kudithipudi, S., Ragozin, S., and Jeltsch, A. (2011). The ATRX-ADD domain binds to H3 tail peptides and reads the combined methylation state of K4 and K9. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2195–2203.
- Di Giacomo, M., Comazzetto, S., Saini, H., De Fazio, S., Carrieri, C., Morgan, M., Vasiliauskaite, L., Benes, V., Enright, A.J., and O’Carroll, D. (2013). Multiple Epigenetic Mechanisms and the piRNA Pathway Enforce LINE1 Silencing during Adult Spermatogenesis. *Mol. Cell* 50, 601–608.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2007). SUN1 is required for telomere attachment to nuclear envelope and gametogenesis in mice. *Dev. Cell* 12, 863–872.
- Dottermusch-Heidel, C., Klaus, E.S., Gonzalez, N.H., Bhushan, S., Meinhardt, A., Bergmann, M., Renkawitz-Pohl, R., Rathke, C., and Steger, K. (2014). H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections. *Andrology* 2, 655–665.
- Doyen, C.-M., An, W., Angelov, D., Bondarenko, V., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Roeder, R.G., Bouvet, P., and Dimitrov, S. (2006). Mechanism of Polymerase II Transcription Repression by the Histone Variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1156–1164.
- Drane, P., Ouarrhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 24, 1253–1265.

- Dunleavy, E.M., Roche, D., Tagami, H., Lacoste, N., Ray-Gallet, D., Nakamura, Y., Daigo, Y., Nakatani, Y., and Almouzni-Pettinotti, G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell* 137, 485–497.
- Earnshaw, W.C., and Rothfield, N. (1985). Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* 91, 313–321.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E., and Heyting, C. (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1B and SMC3. *J. Cell Biol.* 160, 657–670.
- Ellis, P.J.I., Clemente, E.J., Ball, P., Touré, A., Ferguson, L., Turner, J.M.A., Loveland, K.L., Affara, N.A., and Burgoyne, P.S. (2005). Deletions on mouse Yq lead to upregulation of multiple X- and Y-linked transcripts in spermatids. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2705–2715.
- Elsaesser, S.J., and Allis, C.D. (2010). HIRA and Daxx constitute two independent histone H3.3-containing predisposition complexes. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press), p. sqb–2009.
- Elsässer, S.J., Huang, H., Lewis, P.W., Chin, J.W., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2012). DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* 491, 560–565.
- Elsässer, S.J., Noh, K.-M., Diaz, N., Allis, C.D., and Banaszynski, L.A. (2015). Histone H3.3 is required for endogenous retroviral element silencing in embryonic stem cells. *Nature* 522, 240–244.
- Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 868–875.
- Eustermann, S., Yang, J.-C., Law, M.J., Amos, R., Chapman, L.M., Jelinska, C., Garrick, D., Clynes, D., Gibbons, R.J., Rhodes, D., et al. (2011). Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 777–782.
- Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T.J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E.E., Stein, A., Woodcock, C.L., and Skoultchi, A.I. (2005). Histone H1 Depletion in Mammals Alters Global Chromatin Structure but Causes Specific Changes in Gene Regulation. *Cell* 123, 1199–1212.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev. Cell* 4, 497–508.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, kern und zelltheilung.* (Leipzig, F. C. W. Vogel).

- Flemr, M., Malik, R., Franke, V., Nejepinska, J., Sedlacek, R., Vlahovicek, K., and Svoboda, P. (2013). A Retrotransposon-Driven Dicer Isoform Directs Endogenous Small Interfering RNA Production in Mouse Oocytes. *Cell* 155, 807–816.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E.T., Bailey, A.O., Yates, J.R., Bassett, E.A., Wood, S., Black, B.E., and Cleveland, D.W. (2009). Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell* 137, 472–484.
- Frank, D., Doenecke, D., and Albig, W. (2003a). Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. *Gene* 312, 135–143.
- Frank, D., Doenecke, D., and Albig, W. (2003b). Differential expression of human replacement and cell cycle dependent H3 histone genes. *Gene* 312, 135–143.
- Franklin, S.G., and Zweidler, A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266, 273–275.
- Frey, A., Listovsky, T., Guilbaud, G., Sarkies, P., and Sale, J.E. (2014). Histone H3.3 Is Required to Maintain Replication Fork Progression after UV Damage. *Curr. Biol.* 24, 2195–2201.
- Friedli, M., and Trono, D. (2015). The developmental control of transposable elements and the evolution of higher species. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 429–451.
- Fuchs, N.V., Kraft, M., Tondera, C., Hanschmann, K.-M., Löwer, J., and Löwer, R. (2011). Expression of the Human Endogenous Retrovirus (HERV) Group HML-2/HERV-K Does Not Depend on Canonical Promoter Elements but Is Regulated by Transcription Factors Sp1 and Sp3. *J. Virol.* 85, 3436–3448.
- Gan, H., Lin, X., Zhang, Z., Zhang, W., Liao, S., Wang, L., and Han, C. (2011). piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *RNA* 17, 1191–1203.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., and Carmell, M.A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442, 199–202.
- Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010). Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell* 140, 678–691.
- Gómez, R., Felipe-Medina, N., Ruiz-Torres, M., Berenguer, I., Viera, A., Pérez, S., Barbero, J.L., Llano, E., Fukuda, T., Alsheimer, M., et al. (2016). Sororin loads to the synaptonemal complex central region independently of meiotic cohesin complexes. *EMBO Rep.* 17, 695–707.
- Goudarzi, A., Zhang, D., Huang, H., Barral, S., Kwon, O.K., Qi, S., Tang, Z., Buchou, T., Vitte, A.-L., He, T., et al. (2016). Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters. *Mol. Cell* 62, 169–180.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur. J. Biochem.* 271, 3459–3469.

- Govin, J., Escoffier, E., Rousseaux, S., Kuhn, L., Ferro, M., Thévenon, J., Catena, R., Davidson, I., Garin, J., Khochbin, S., et al. (2007). Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *J. Cell Biol.* 176, 283–294.
- Grandjean, V., Fourré, S., De Abreu, D.A.F., Derieppe, M.-A., Remy, J.-J., and Rassoulzadegan, M. (2015). RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci. Rep.* 5.
- Greaves, I.K., Rangasamy, D., Devoy, M., Marshall Graves, J.A., and Tremethick, D.J. (2006). The X and Y Chromosomes Assemble into H2A.Z, Containing Facultative Heterochromatin, following Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5394–5405.
- Grewal, S.I.S., and Elgin, S.C.R. (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399–406.
- Griswold, M.D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol. Rev.* 96, 1–17.
- Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349.
- Hada, M., Masuda, K., Yamaguchi, K., Shirahige, K., and Okada, Y. (2017). Identification of a variant-specific phosphorylation of TH2A during spermiogenesis. *Sci. Rep.* 7, 46228.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Kauer, M., Baker, S.P., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Allis, C.D. (2005). Serine 31 phosphorylation of histone variant H3. 3 is specific to regions bordering centromeres in metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6344–6349.
- Hake, S.B., Garcia, B.A., Duncan, E.M., Kauer, M., Dellaire, G., Shabanowitz, J., Bazett-Jones, D.P., Allis, C.D., and Hunt, D.F. (2006). Expression Patterns and Post-translational Modifications Associated with Mammalian Histone H3 Variants. *J. Biol. Chem.* 281, 559–568.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive Chromatin in Human Sperm Packages Genes for Embryo Development. *Nature* 460, 473–478.
- Hasegawa, K., and Saga, Y. (2012). Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development* 139, 4347–4355.
- Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Jiao, Y., Klein, A.P., Edil, B.H., Shi, C., Bettegowda, C., Rodriguez, F.J., Eberhart, C.G., Hebbar, S., et al. (2011). Altered Telomeres in Tumors with ATRX and DAXX Mutations. *Science* 333, 425–425.
- van der Heijden, G.W., Derijck, A.A.H.A., Pósfai, E., Giele, M., Pelczar, P., Ramos, L., Wansink, D.G., van der Vlag, J., Peters, A.H.F.M., and de Boer, P. (2007). Chromosome-wide nucleosome replacement and H3.3 incorporation during mammalian meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* 39, 251–258.

- Hess, R.A., and Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 1–15.
- Hödl, M., and Basler, K. (2009). Transcription in the Absence of Histone H3.3. *Curr. Biol.* 19, 1221–1226.
- Hopkins, J., Hwang, G., Jacob, J., Sapp, N., Bedigian, R., Oka, K., Overbeek, P., Murray, S., and Jordan, P.W. (2014). Meiosis-Specific Cohesin Component, Stag3 Is Essential for Maintaining Centromere Chromatid Cohesion, and Required for DNA Repair and Synapsis between Homologous Chromosomes. *PLOS Genet.* 10, e1004413.
- Horwich, M.D., Li, C., Matranga, C., Vagin, V., Farley, G., Wang, P., and Zamore, P.D. (2007). The *Drosophila* RNA Methyltransferase, DmHen1, Modifies Germline piRNAs and Single-Stranded siRNAs in RISC. *Curr. Biol.* 17, 1265–1272.
- Hoyer-Fender, S. (2003). Molecular aspects of XY body formation. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 245–255.
- Hubley, R., Finn, R.D., Clements, J., Eddy, S.R., Jones, T.A., Bao, W., Smit, A.F.A., and Wheeler, T.J. (2016). The Dfam database of repetitive DNA families. *Nucleic Acids Res.* 44, D81–D89.
- Ipsaro, J.J., Haase, A.D., Knott, S.R., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2012). The structural biochemistry of Zucchini implicates it as a nuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 279–283.
- Isbel, L., Srivastava, R., Oey, H., Spurling, A., Daxinger, L., Puthalakath, H., and Whitelaw, E. (2015). Trim33 Binds and Silences a Class of Young Endogenous Retroviruses in the Mouse Testis; a Novel Component of the Arms Race between Retrotransposons and the Host Genome. *PLoS Genet.* 11, e1005693.
- Ishibashi, T., Li, A., Eirín-López, J.M., Zhao, M., Missiaen, K., Abbott, D.W., Meistrich, M., Hendzel, M.J., and Ausió, J. (2010). H2A.Bbd: an X-chromosome-encoded histone involved in mammalian spermiogenesis. *Nucleic Acids Res.* 38, 1780–1789.
- Ishiguro, K., Kim, J., Shibuya, H., Hernández-Hernández, A., Suzuki, A., Fukagawa, T., Shioi, G., Kiyonari, H., Li, X.C., Schimenti, J., et al. (2014). Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes. *Genes Dev.* 28, 594–607.
- Iwase, S., Xiang, B., Ghosh, S., Ren, T., Lewis, P.W., Cochrane, J.C., Allis, C.D., Picketts, D.J., Patel, D.J., Li, H., et al. (2011). ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 769–776.
- Jang, C.-W., Shibata, Y., Starmer, J., Yee, D., and Magnuson, T. (2015). Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. *Genes Dev.* 29, 1377–1392.
- Jasinska, A., and Krzyzosiak, W.J. (2004). Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Lett.* 567, 136–141.

Jiang, H., Gao, Q., Zheng, W., Yin, S., Wang, L., Zhong, L., Ali, A., Khan, T., Hao, Q., Fang, H., et al. (2018). MOF influences meiotic expansion of H2AX phosphorylation and spermatogenesis in mice. *PLOS Genet.* *14*, e1007300.

Jijiwa, M., Kawai, K., Fukihara, J., Nakamura, A., Hasegawa, M., Suzuki, C., Sato, T., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y., et al. (2008). GDNF-mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes Cells* *13*, 365–374.

Jin, C., and Felsenfeld, G. (2007). Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* *21*, 1519–1529.

Jin, C., Zang, C., Wei, G., Cui, K., Peng, W., Zhao, K., and Felsenfeld, G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* *41*, 941–945.

JOHNSON, L. (1994). A new approach to study the architectural arrangement of spermatogenic stages revealed little evidence of a partial wave along the length of human seminiferous tubules. *J. Androl.* *15*, 435–441.

Johnston, D.S., Wright, W.W., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., and Jelinsky, S.A. (2008). Stage-specific gene expression is a fundamental characteristic of rat spermatogenic cells and Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 8315–8320.

Johnston, D.S., Olivas, E., DiCandeloro, P., and Wright, W.W. (2011). Stage-Specific Changes in GDNF Expression by Rat Sertoli Cells: A Possible Regulator of the Replication and Differentiation of Stem Spermatogonia¹. *Biol. Reprod.* *85*, 763–769.

Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2010). From meiosis to postmeiotic events: Uncovering the molecular roles of the meiosis-specific recombinase Dmc1. *FEBS J.* *277*, 590–598.

Kallappagoudar, S., Yadav, R.K., Lowe, B.R., and Partridge, J.F. (2015). Histone H3 mutations—a special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma* *124*, 177–189.

Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Miki, H., Ogura, A., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2003). Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells¹. *Biol. Reprod.* *69*, 612–616.

Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., and Shinohara, T. (2004). CD9 Is a Surface Marker on Mouse and Rat Male Germline Stem Cells¹. *Biol. Reprod.* *70*, 70–75.

Kang, B., Pu, M., Hu, G., Wen, W., Dong, Z., Zhao, K., Stillman, B., and Zhang, Z. (2011). Phosphorylation of H4 Ser 47 promotes HIRA-mediated nucleosome assembly. *Genes Dev.* *25*, 1359–1364.

Kauppi, L., Jasin, M., and Keeney, S. (2012). The tricky path to recombining X and Y chromosomes in meiosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1267*, 18–23.

Khalil, A.M., Boyar, F.Z., and Driscoll, D.J. (2004). Dynamic histone modifications mark sex chromosome inactivation and reactivation during mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 16583–16587.

- Khodosevich, K., Lebedev, Y., and Sverdlov, E.D. (2004). Large-scale determination of the methylation status of retrotransposons in different tissues using a methylation tags approach. *Nucleic Acids Res.* 32, e31.
- Kiani, J., Grandjean, V., Liebers, R., Tuorto, F., Ghanbarian, H., Lyko, F., Cuzin, F., and Rassoulzadegan, M. (2013). RNA-Mediated Epigenetic Heredity Requires the Cytosine Methyltransferase Dnmt2. *PLoS Genet.* 9.
- Kirino, Y., and Mourelatos, Z. (2007). 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2004 417–418.
- Knisbacher, B.A., and Levanon, E.Y. (2016). DNA Editing of LTR Retrotransposons Reveals the Impact of APOBECs on Vertebrate Genomes. *Mol. Biol. Evol.* 33, 554–567.
- Koito, A., and Ikeda, T. (2013). Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Front. Microbiol.* 4.
- Kong, Q., Banaszynski, L.A., Geng, F., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, H., O'Neill, C.L., Yan, P., Liu, Z., Shido, K., et al. (2018). Histone variant H3.3-mediated chromatin remodeling is essential for paternal genome activation in mouse preimplantation embryos. *J. Biol. Chem.* 293, 3829–3838.
- Kubota, H., Avarbock, M.R., and Brinster, R.L. (2004). Culture Conditions and Single Growth Factors Affect Fate Determination of Mouse Spermatogonial Stem Cells1. *Biol. Reprod.* 71, 722–731.
- Kumar, R., Bourbon, H.-M., and de Massy, B. (2010). Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev.* 24, 1266–1280.
- Kuramochi-Miyagawa, S. (2004). Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131, 839–849.
- Kwak, H.-G., and Dohmae, N. (2016). Characterization of post-translational modifications on lysine 9 of histone H3 variants in mouse testis using matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay: K9 modifications in H3 variants in mouse testis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 30, 2529–2536.
- de La Roche Saint-André, C. (2008). Alternative ends: Telomeres and meiosis. *Biochimie* 90, 181–189.
- van de Lagemaat, L.N., Landry, J.-R., Mager, D.L., and Medstrand, P. (2003). Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet. TIG* 19, 530–536.
- Lahn, B.T., Tang, Z.L., Zhou, J., Barndt, R.J., Parvinen, M., Allis, C.D., and Page, D.C. (2002). Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8707–8712.
- Lam, I., and Keeney, S. (2015). Mechanism and Regulation of Meiotic Recombination Initiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.

- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.
- Latham, J.A., and Dent, S.Y.R. (2007). Cross-regulation of histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1017–1024.
- Lau, N.C., Seto, A.G., Kim, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Bartel, D.P., and Kingston, R.E. (2006). Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313, 363–367.
- Lavie, L., Kitova, M., Maldener, E., Meese, E., and Mayer, J. (2005). CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *J. Virol.* 79, 876–883.
- Law, M.J., Lower, K.M., Voon, H.P.J., Hughes, J.R., Garrick, D., Viprakasit, V., Mitson, M., De Gobbi, M., Marra, M., Morris, A., et al. (2010). ATR-X Syndrome Protein Targets Tandem Repeats and Influences Allele-Specific Expression in a Size-Dependent Manner. *Cell* 143, 367–378.
- Leblond, C.P., and Clermont, Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.* 90, 167–215.
- Lee, Y.N., Malim, M.H., and Bieniasz, P.D. (2008). Hypermutation of an Ancient Human Retrovirus by APOBEC3G. *J. Virol.* 82, 8762–8770.
- Leung, D., Du, T., Wagner, U., Xie, W., Lee, A.Y., Goyal, P., Li, Y., Szulwach, K.E., Jin, P., Lorincz, M.C., et al. (2014). Regulation of DNA methylation turnover at LTR retrotransposons and imprinted loci by the histone methyltransferase Setdb1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6690–6695.
- Levy, M.A., Kernohan, K.D., Jiang, Y., and Bérubé, N.G. (2015). ATRX promotes gene expression by facilitating transcriptional elongation through guanine-rich coding regions. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1824–1835.
- Li, G., Davis, B.W., Raudsepp, T., Pearks Wilkerson, A.J., Mason, V.C., Ferguson-Smith, M., O’Brien, P.C., Waters, P.D., and Murphy, W.J. (2013a). Comparative analysis of mammalian Y chromosomes illuminates ancestral structure and lineage-specific evolution. *Genome Res.* 23, 1486–1495.
- Li, T., Ding, X., Chen, L., Li, L., and Zhang, X. (2014). [Association of single nucleotide polymorphisms in H2BFWT with male infertility in southwest China]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi Chin. J. Med. Genet.* 31, 69–73.
- Li, X.Z., Roy, C.K., Dong, X., Bolcun-Filas, E., Wang, J., Han, B.W., Xu, J., Moore, M.J., Schimenti, J.C., Weng, Z., et al. (2013b). An Ancient Transcription Factor Initiates the Burst of piRNA Production During Early Meiosis in Mouse Testes. *Mol. Cell* 50, 67–81.
- Libby, B.J., De La Fuente, R., O’Brien, M.J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., Eaker, S., Handel, M.A., Eppig, J.J., and Schimenti, J.C. (2002). The Mouse Meiotic

Mutation *mei1* Disrupts Chromosome Synapsis with Sexually Dimorphic Consequences for Meiotic Progression. *Dev. Biol.* 242, 174–187.

Lin, C.-Y., Chen, C.-Y., Yu, C.-H., Yu, I.-S., Lin, S.-R., Wu, J.-T., Lin, Y.-H., Kuo, P.-L., Wu, J.-C., and Lin, S.-W. (2016). Human X-linked Intellectual Disability Factor *CUL4B* Is Required for Post-meiotic Sperm Development and Male Fertility. *Sci. Rep.* 6.

Lin, Y., Gill, M.E., Koubova, J., and Page, D.C. (2008). Germ Cell-Intrinsic and -Extrinsic Factors Govern Meiotic Initiation in Mouse Embryos. *Science* 322, 1685–1687.

Lipkin, S.M., Moens, P.B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J.W., Green, E.D., et al. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in *MLH3*-deficient mice. *Nat. Genet.* 31, 385–390.

Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., and Felsenfeld, G. (2001). Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken β -globin locus. *Science* 293, 2453–2455.

Liu, C.-P., Xiong, C., Wang, M., Yu, Z., Yang, N., Chen, P., Zhang, Z., Li, G., and Xu, R.-M. (2012). Structure of the variant histone H3.3–H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1287–1292.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.

Mahadevaiah, S.K., Turner, J.M., Baudat, F., Rogakou, E.P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W.M., and Burgoyne, P.S. (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27, 271–276.

Maksakova, I.A., Mager, D.L., and Reiss, D. (2008). Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 3329–3347.

Malik, H.S., and Henikoff, S. (2003). Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* 10, 882–891.

Manghera, M., and Douville, R.N. (2013). Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors? *Retrovirology* 10, 16.

Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics* 80, 487–498.

Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* 9, 843–854.

Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A.A., and Allis, C.D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat. Rev. Genet.* 15, 259–271.

McIver, S.C., Roman, S.D., Nixon, B., and McLaughlin, E.A. (2012). miRNA and mammalian male germ cells. *Hum. Reprod. Update* 18, 44–59.

- Meistrich, M.L., and Hess, R.A. (2013). Assessment of Spermatogenesis Through Staging of Seminiferous Tubules. In *Spermatogenesis*, D.T. Carrell, and K.I. Aston, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 299–307.
- Meistrich, M.L., Trostle-Weige, P.K., Lin, R., Allis, C.D., and Bhatnagar, Y.M. (1992). Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 170–181.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen, M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., et al. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287, 1489–1493.
- Miller, D., Brinkworth, M., and Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 139, 287–301.
- Mito, Y., Henikoff, J.G., and Henikoff, S. (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.* 37, 1090–1097.
- Modzelewski, A.J., Holmes, R.J., Hilz, S., Grimson, A., and Cohen, P.E. (2012). AGO4 Regulates Entry into Meiosis and Influences Silencing of Sex Chromosomes in the Male Mouse Germline. *Dev. Cell* 23, 251–264.
- Montellier, E., Rousseaux, S., Zhao, Y., and Khochbin, S. (2012). Histone crotonylation specifically marks the haploid male germ cell gene expression program: post-meiotic male-specific gene expression. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 34, 187–193.
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Hery, P., Curtet, S., et al. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.* 27, 1680–1692.
- Morelli, M.A., and Cohen, P.E. (2005). Not all germ cells are created equal: Aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction* 130, 761–781.
- Moretti, C., Vaiman, D., Tores, F., and Cocquet, J. (2016). Expression and epigenomic landscape of the sex chromosomes in mouse post-meiotic male germ cells. *Epigenetics Chromatin* 9.
- Moss, S.B., Challoner, P.B., and Groudine, M. (1989). Expression of a novel histone 2B during mouse spermiogenesis. *Dev. Biol.* 133, 83–92.
- Motzkus, D., Singh, P.B., and Hoyer-Fender, S. (1999). M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet. Cell Genet.* 86, 83–88.
- Mueller, J.L., Mahadevaiah, S.K., Park, P.J., Warburton, P.E., Page, D.C., and Turner, J.M.A. (2008). The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat. Genet.* 40, 794–799.

- Naughton, C.K., Jain, S., Strickland, A.M., Gupta, A., and Milbrandt, J. (2006). Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor-Mediated RET Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate1. *Biol. Reprod.* 74, 314–321.
- Nishimasu, H., Ishizu, H., Saito, K., Fukuhara, S., Kamatani, M.K., Bonnefond, L., Matsumoto, N., Nishizawa, T., Nakanaga, K., Aoki, J., et al. (2012). Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* 491, 284–287.
- Öllinger, R., Alsheimer, M., and Benavente, R. (2005). Mammalian Protein SCP1 Forms Synaptonemal Complex-like Structures in the Absence of Meiotic Chromosomes. *Mol. Biol. Cell* 16, 212–217.
- Ors, A., Papin, C., Favier, B., Roulland, Y., Dalkara, D., Ozturk, M., Hamiche, A., Dimitrov, S., and Padmanabhan, K. (2017). Histone H3.3 regulates mitotic progression in mouse embryonic fibroblasts. *Biochem. Cell Biol.* 95, 491–499.
- Orsi, G.A., Couble, P., and Loppin, B. (2009). Epigenetic and replacement roles of histone variant H3.3 in reproduction and development. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 231–243.
- Palla, V.-V., Karaolanis, G., Katafigiotis, I., Anastasiou, I., Patapis, P., Dimitroulis, D., and Perrea, D. (2017). gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumor Biol.* 39, 1010428317695931.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H., and Margolis, R.L. (1991). Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3734–3738.
- Pandey, N.B., and Marzluff, W.F. (1987). The stem-loop structure at the 3' end of histone mRNA is necessary and sufficient for regulation of histone mRNA stability. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4557–4559.
- Pehrson, J.R., and Fried, V.A. (1992). MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1398–1400.
- Pennings, S., Meersseman, G., and Bradbury, E.M. (1994). Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10275–10279.
- Perez-Torrado, R., Yamada, D., and Defossez, P.-A. (2006). Born to bind: the BTB protein-protein interaction domain. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 28, 1194–1202.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., et al. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.
- Picketts, D.J., Higgs, D.R., Bachoo, S., Blake, D.J., Quarrell, O.W., and Gibbons, R.J. (1996). ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1899–1907.

Piégu, B., Bire, S., Arensburger, P., and Bigot, Y. (2015). A survey of transposable element classification systems--a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 86, 90–109.

Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic Prophase Arrest with Failure of Chromosome Synapsis in Mice Deficient for Dmc1, a Germline-Specific RecA Homolog. *Mol. Cell* 1, 697–705.

Postberg, J., Forcob, S., Chang, W.-J., and Lipps, H.J. (2010). The evolutionary history of histone H3 suggests a deep eukaryotic root of chromatin modifying mechanisms. *BMC Evol. Biol.* 10, 259.

Powers, N.R., Parvanov, E.D., Baker, C.L., Walker, M., Petkov, P.M., and Paigen, K. (2016). The meiotic recombination activator PRDM9 trimethylates both H3K36 and H3K4 at recombination hotspots in vivo. *PLoS Genet.* 12, e1006146.

Raisner, R.M., and Madhani, H.D. (2006). Patterning chromatin: form and function for H2A.Z variant nucleosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 119–124.

Rao, B.J., Brahmachari, S.K., and Rao, M.R. (1983). Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis. *J. Biol. Chem.* 258, 13478–13485.

Rathke, C., Baarends, W.M., Awe, S., and Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1839, 155–168.

Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2010). Nucleosome dynamics and histone variants. *Essays Biochem.* 48, 75–87.

Ray-Gallet, D., Woolfe, A., Vassias, I., Pellentz, C., Lacoste, N., Puri, A., Schultz, D.C., Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Jansen, L.E.T., et al. (2011). Dynamics of histone H3 deposition in vivo reveal a nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain chromatin integrity. *Mol. Cell* 44, 928–941.

Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B., and Jessberger, R. (2001). Novel Meiosis-Specific Isoform of Mammalian SMC1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6984–6998.

Reynard, L.N., and Turner, J.M.A. (2009). Increased sex chromosome expression and epigenetic abnormalities in spermatids from male mice with Y chromosome deletions. *J. Cell Sci.* 122, 4239–4248.

Richmond, T.J., and Davey, C.A. (2003). The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* 423, 145–150.

Rogers, R.S., Inselman, A., Handel, M.A., and Matunis, M.J. (2004). SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* 113, 233–243.

Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D. (2000). The Mouse Spo11 Gene Is Required for Meiotic Chromosome Synapsis. *Mol. Cell* 6, 975–987.

Sadic, D., Schmidt, K., Groh, S., Kondofersky, I., Ellwart, J., Fuchs, C., Theis, F.J., and Schotta, G. (2015). Atrx promotes heterochromatin formation at retrotransposons. *EMBO Rep.* 16, 836–850.

Saigo, K., Kugimiya, W., Matsuo, Y., Inouye, S., Yoshioka, K., and Yuki, S. (1984). Identification of the coding sequence for a reverse transcriptase-like enzyme in a transposable genetic element in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 312, 659–661.

Saito, K., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2007). Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev.* 21, 1603–1608.

Sakai, A., Schwartz, B.E., Goldstein, S., and Ahmad, K. (2009). Transcriptional and Developmental Functions of the H3.3 Histone Variant in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 19, 1816–1820.

Santoro, S.W., and Dulac, C. (2012). The activity-dependent histone variant H2BE modulates the life span of olfactory neurons. *Elife* 1, e00070.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407–411.

Sato, T., Katagiri, K., Yokonishi, T., Kubota, Y., Inoue, K., Ogonuki, N., Matoba, S., Ogura, A., and Ogawa, T. (2011a). In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat. Commun.* 2, 472.

Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., and Ogawa, T. (2011b). *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504–507.

Saxe, J.P., and Lin, H. (2011). Small Noncoding RNAs in the Germline. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

Schenk, R., Jenke, A., Zilbauer, M., Wirth, S., and Postberg, J. (2011). H3.5 is a novel hominid-specific histone H3 variant that is specifically expressed in the seminiferous tubules of human testes. *Chromosoma* 120, 275–285.

Schwartz, B.E. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.* 19, 804–814.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.

Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. (2007). The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 134, 3507–3515.

- Shannon, M., Richardson, L., Christian, A., Handel, M.A., and Thelen, M.P. (1999). Differential gene expression of mammalian SPO11/TOP6A homologs during meiosis 1. *FEBS Lett.* **462**, 329–334.
- Shinagawa, T., Huynh, L.M., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Kwak, H.-G., Dohmae, N., Noguchi, J., and Ishii, S. (2015). Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. *Development* **142**, 1287–1292.
- Shiraishi, K., Shindo, A., Harada, A., Kurumizaka, H., Kimura, H., Ohkawa, Y., and Matsuyama, H. (2018). Roles of histone H3.5 in human spermatogenesis and spermatogenic disorders. *Andrology* **6**, 158–165.
- Shomron, N., and Levy, C. (2009). MicroRNA-Biogenesis and Pre-mRNA Splicing Crosstalk. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**.
- Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., and Aravin, A.A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 246–258.
- Soboleva, T.A., Nekrasov, M., Pahwa, A., Williams, R., Huttley, G.A., and Tremethick, D.J. (2011). A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 25–30.
- Soh, Y.Q.S., Alföldi, J., Pyntikova, T., Brown, L.G., Graves, T., Minx, P.J., Fulton, R.S., Kremitzki, C., Koutseva, N., Mueller, J.L., et al. (2014). Sequencing the Mouse Y Chromosome Reveals Convergent Gene Acquisition and Amplification on Both Sex Chromosomes. *Cell* **159**, 800–813.
- Song, R., Hennig, G.W., Wu, Q., Jose, C., Zheng, H., and Yan, W. (2011). Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13159–13164.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* **123**, 1213–1226.
- Sullivan, B.A., Blower, M.D., and Karpen, G.H. (2001). Determining centromere identity: cyclical stories and forking paths. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 584–596.
- Sun, X., Clermont, P.-L., Jiao, W., Helgason, C.D., Gout, P.W., Wang, Y., and Qu, S. (2016). Elevated expression of the centromere protein-A(CENP-A)-encoding gene as a prognostic and predictive biomarker in human cancers. *Int. J. Cancer* **139**, 899–907.
- Swarts, D.C., Jore, M.M., Westra, E.R., Zhu, Y., Janssen, J.H., Snijders, A.P., Wang, Y., Patel, D.J., Berenguer, J., Brouns, S.J.J., et al. (2014). DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* **507**, 258–261.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., and Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Res.* **21**, 421.
- Tachiwana, H., Kagawa, W., and Kurumizaka, H. (2012). Comparison between the CENP-A and histone H3 structures in nucleosomes. *Nucleus* **3**, 6–11.

- Taddei, A., and Gasser, S.M. (2004). Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1677, 120–128.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004). Histone H3. 1 and H3. 3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51–61.
- Tang, M.C.W., Jacobs, S.A., Wong, L.H., and Mann, J.R. (2013). Conditional allelic replacement applied to genes encoding the histone variant H3.3 in the mouse. *Genesis* 51, 142–146.
- Tang, M.C.W., Jacobs, S.A., Mattiske, D.M., Soh, Y.M., Graham, A.N., Tran, A., Lim, S.L., Hudson, D.F., Kalitsis, P., O'Bryan, M.K., et al. (2015). Contribution of the Two Genes Encoding Histone Variant H3.3 to Viability and Fertility in Mice. *PLOS Genet.* 11, e1004964.
- Tarabay, Y., Achour, M., Teletin, M., Ye, T., Teissandier, A., Mark, M., Bourc'his, D., and Viville, S. (2017). *Tex19* paralogs are new members of the piRNA pathway controlling retrotransposon suppression. *J. Cell Sci.* 130, 1463–1474.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R.E., and Moens, P.B. (1999). Rad51 and Dmc1 Form Mixed Complexes Associated with Mouse Meiotic Chromosome Cores and Synaptonemal Complexes. *J. Cell Biol.* 147, 207–220.
- Taverna, S.D., Coyne, R.S., and Allis, C.D. (2002). Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in tetrahymena. *Cell* 110, 701–711.
- Tegelenbosch, R.A., and de Rooij, D.G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat. Res.* 290, 193–200.
- Temin, H.M. (1980). Origin of retroviruses from cellular moveable genetic elements. *Cell* 21, 599–600.
- Thoma, F., Koller, T.H., and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403–427.
- Thomas, K.C., Zheng, X.F., Garces Suarez, F., Raftery, J.M., Quinlan, K.G.R., Yang, N., North, K.N., and Houweling, P.J. (2014). Evidence Based Selection of Commonly Used RT-qPCR Reference Genes for the Analysis of Mouse Skeletal Muscle. *PLoS ONE* 9, e88653.
- Thompson, P.J., Macfarlan, T.S., and Lorincz, M.C. (2016). Long Terminal Repeats: From Parasitic Elements to Building Blocks of the Transcriptional Regulatory Repertoire. *Mol. Cell* 62, 766–776.
- Timmons, P.M., Rigby, P.W., and Poirier, F. (2002). The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development* 129, 635–647.
- Trauth, K., Mutschler, B., Jenkins, N. a., Gilbert, D. j., Copeland, N. g., and Klempnauer, K. h. (1994). Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells

of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J.* 13, 5994–6005.

Trostle-Weige, P.K., Meistrich, M.L., Brock, W.A., Nishioka, K., and Bremer, J.W. (1982). Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis. *J. Biol. Chem.* 257, 5560–5567.

Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., and Hansen, J.C. (1998). Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4629–4638.

Tsukiyama, T. (2002). The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 422–429.

Turner, J.M.A. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823–1831.

Turner, J.M., Aprelikova, O., Xu, X., Wang, R., Kim, S., Chandramouli, G.V., Barrett, J.C., Burgoyne, P.S., and Deng, C.-X. (2004). BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. *Curr. Biol.* 14, 2135–2142.

Turner, J.M.A., Mahadevaiah, S.K., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, A., Xu, X., Deng, C.-X., and Burgoyne, P.S. (2005). Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.* 37, 41–47.

Udugama, M., Chang, F.T.M., Chan, F.L., Tang, M.C., Pickett, H.A., McGhie, J.D.R., Mayne, L., Collas, P., Mann, J.R., and Wong, L.H. (2015a). Histone variant H3.3 provides the heterochromatic H3 lysine 9 tri-methylation mark at telomeres. *Nucleic Acids Res.* gkv847.

Udugama, M., Chang, F.T.M., Chan, F.L., Tang, M.C., Pickett, H.A., McGhie, J.D.R., Mayne, L., Collas, P., Mann, J.R., and Wong, L.H. (2015b). Histone variant H3.3 provides the heterochromatic H3 lysine 9 tri-methylation mark at telomeres. *Nucleic Acids Res.* gkv847.

Ueda, J., Harada, A., Urahama, T., Machida, S., Maehara, K., Hada, M., Makino, Y., Nogami, J., Horikoshi, N., Osakabe, A., et al. (2017). Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep.* 18, 593–600.

Urahama, T., Harada, A., Maehara, K., Horikoshi, N., Sato, K., Sato, Y., Shiraishi, K., Sugino, N., Osakabe, A., Tachiwana, H., et al. (2016). Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics Chromatin* 9.

Vagin, V.V., Sigova, A., Li, C., Seitz, H., Gvozdev, V., and Zamore, P.D. (2006). A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 313, 320–324.

Van Hooser, A.A., Ouspenski, I.I., Gregson, H.C., Starr, D.A., Yen, T.J., Goldberg, M.L., Yokomori, K., Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F., and Brinkley, B.R. (2001). Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J. Cell Sci.* 114, 3529–3542.

- Varga-Weisz, P., Zlatanova, J., Leuba, S.H., Schroth, G.P., and van Holde, K. (1994). Binding of histones H1 and H5 and their globular domains to four-way junction DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3525–3529.
- Vasileva, A., Tiedau, D., Firooznia, A., Müller-Reichert, T., and Jessberger, R. (2009). Tudor domain protein Tdrd6 is required for spermiogenesis, chromatoid body architecture and regulation of miRNA expression. *Curr. Biol. CB* *19*, 630–639.
- Vigodner, M., and Morris, P.L. (2005). Testicular expression of small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) supports multiple roles in spermatogenesis: Silencing of sex chromosomes in spermatocytes, spermatid microtubule nucleation, and nuclear reshaping. *Dev. Biol.* *282*, 480–492.
- Voon, H.P.J., Hughes, J.R., Rode, C., De La Rosa-Velázquez, I.A., Jenuwein, T., Feil, R., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2015). ATRX Plays a Key Role in Maintaining Silencing at Interstitial Heterochromatic Loci and Imprinted Genes. *Cell Rep.* *11*, 405–418.
- Vourekas, A., Zheng, Q., Alexiou, P., Maragkakis, M., Kirino, Y., Gregory, B.D., and Mourelatos, Z. (2012). Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 773–781.
- Vourekas, A., Zheng, K., Fu, Q., Maragkakis, M., Alexiou, P., Ma, J., Pillai, R.S., Mourelatos, Z., and Wang, P.J. (2015). The RNA helicase MOV10L1 binds piRNA precursors to initiate piRNA processing. *Genes Dev.* *29*, 617–629.
- Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., and Yokoyama, S. (2007). Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* *21*, 1857–1862.
- Wang, B.-C., Rose, J., Arents, G., and Moudrianakis, E.N. (1994). The Octameric Histone Core of the Nucleosome. *J. Mol. Biol.* *236*, 179–188.
- Watanabe, T., Totoki, Y., Toyoda, A., Kaneda, M., Kuramochi-Miyagawa, S., Obata, Y., Chiba, H., Kohara, Y., Kono, T., Nakano, T., et al. (2008). Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* *453*, 539–543.
- Watanabe, T., Chuma, S., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Totoki, Y., Toyoda, A., Hoki, Y., Fujiyama, A., Shibata, T., Sado, T., et al. (2011). MitoPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and piRNA Biogenesis in the Mouse Germline. *Dev. Cell* *20*, 364–375.
- Wiedemann, S.M., Mildner, S.N., Bönisch, C., Israel, L., Maiser, A., Matheisl, S., Straub, T., Merkl, R., Leonhardt, H., Kremmer, E., et al. (2010). Identification and characterization of two novel primate-specific histone H3 variants, H3.X and H3.Y. *J. Cell Biol.* *190*, 777–791.
- Wolffe, A.P. (1992). New insights into chromatin function in transcriptional control. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *6*, 3354–3361.
- Wong, L.H., Ren, H., Williams, E., McGhie, J., Ahn, S., Sim, M., Tam, A., Earle, E., Anderson, M.A., Mann, J., et al. (2008). Histone H3.3 incorporation provides a unique and

functionally essential telomeric chromatin in embryonic stem cells. *Genome Res.* 19, 404–414.

Wong, L.H., McGhie, J.D., Sim, M., Anderson, M.A., Ahn, S., Hannan, R.D., George, A.J., Morgan, K.A., Mann, J.R., and Choo, K.H.A. (2010a). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* 20, 351–360.

Wong, L.H., McGhie, J.D., Sim, M., Anderson, M.A., Ahn, S., Hannan, R.D., George, A.J., Morgan, K.A., Mann, J.R., and Choo, K.H.A. (2010b). ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells. *Genome Res.* 20, 351–360.

Wu, G., Diaz, A.K., Paugh, B.S., Rankin, S.L., Ju, B., Li, Y., Zhu, X., Qu, C., Chen, X., Zhang, J., et al. (2014). The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat. Genet.* 46, 444–450.

Wu, R.S., Tsai, S., and Bonner, W.M. (1982). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell* 31, 367–374.

Xu, X. (2003). Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* 130, 2001–2012.

Yoshida, S. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133, 1495–1505.

Yuan, L., Liu, J.-G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Höög, C. (2000). The Murine SCP3 Gene Is Required for Synaptonemal Complex Assembly, Chromosome Synapsis, and Male Fertility. *Mol. Cell* 5, 73–83.

Yuen, B.T.K., Bush, K.M., Barrilleaux, B.L., Cotterman, R., and Knoepfler, P.S. (2014). Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. *Development* 141, 3483–3494.

Zalensky, A.O., Siino, J.S., Gineitis, A.A., Zalenskaya, I.A., Tomilin, N.V., Yau, P., and Bradbury, E.M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.* 277, 43474–43480.

Zarnescu, O. (2007). Immunohistochemical distribution of hyperacetylated histone H4 in testis of paddlefish *Polyodon spathula*: ultrastructural correlation with chromatin condensation. *Cell Tissue Res.* 328, 401–410.

Zhang, F., Wang, J., Xu, J., Zhang, Z., Koppetsch, B.S., Schultz, N., Vreven, T., Meignin, C., Davis, I., Zamore, P.D., et al. (2012). UAP56 Couples piRNA Clusters to the Perinuclear Transposon Silencing Machinery. *Cell* 151, 871–884.

Zhang, K., Rajput, S.K., Wang, S., Folger, J.K., Knott, J.G., and Smith, G.W. (2016). CHD1 Regulates Deposition of Histone Variant H3.3 During Bovine Early Embryonic Development. *Biol. Reprod.* 94.

Zhang, Q., Chakravarty, S., Ghersi, D., Zeng, L., Plotnikov, A.N., Sanchez, R., and Zhou, M.-M. (2010). Biochemical Profiling of Histone Binding Selectivity of the Yeast Bromodomain Family. *PLoS ONE* 5, e8903.

Zhang, Z., Wang, J., Schultz, N., Zhang, F., Parhad, S.S., Tu, S., Vreven, T., Zamore, P.D., Weng, Z., and Theurkauf, W.E. (2014). The HP1 homolog Rhino anchors a nuclear complex that suppresses piRNA precursor splicing. *Cell* 157, 1353–1363.

Zhou, B.-R., Feng, H., Kato, H., Dai, L., Yang, Y., Zhou, Y., and Bai, Y. (2013). Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 19390–19395.

Zhou, L., Canagarajah, B., Zhao, Y., Baibakov, B., Tokuhiro, K., Maric, D., and Dean, J. (2017). BTBD18 Regulates a Subset of piRNA-Generating Loci through Transcription Elongation in Mice. *Dev. Cell* 40, 453-466.e5.

Zink, L.-M., Delbarre, E., Eberl, H.C., Keilhauer, E.C., Bönisch, C., Pünzeler, S., Bartkuhn, M., Collas, P., Mann, M., and Hake, S.B. (2017). H3.Y discriminates between HIRA and DAXX chaperone complexes and reveals unexpected insights into human DAXX-H3.3-H4 binding and deposition requirements. *Nucleic Acids Res.* 45, 5691–5706.

VII.1 PUBLICATION N°2: The flexible ends of CENP-A nucleosome are required for mitotic fidelity.

Durant ma thèse, j'ai participé à d'autres études sur les variants d'histones tel que H2AZ et CENP-A. Mes résultats sur CENP-A ont notamment permis la constitution de la figure 5 de la publication citée ci-dessous et parue en 2016 dans molecular cell.

Introduction : CENP-A est un acteur essentiel dans la constitution de la chromatine centromérique. Sa présence permet de structurer localement la chromatine et de recruter les protéines nécessaires à la formation du kinétochore. Le kinétochore jouit d'une place centrale dans la ségrégation des chromosomes en mitose. En effet, il est d'un côté lié au centromère du chromosome par CENP-A. De l'autre, les microtubules viennent s'ancrer sur CENP-A avant d'exercer une traction vers les centrosomes respectifs séparant ainsi physiquement chacun des chromosomes homologues vers les deux pôles opposés de la cellule. De nombreuses zones d'ombre persistent sur la manière dont le kinétochore se forme au niveau de CENP-A. En cristallographie, il a été démontré que la structure de la boucle α N1 de CENP-A était structurellement plus courte que celle de son histone canonique H3 (Tachiwana et al., 2012). Le rôle de cette boucle dans les fonctions de CENP-A est inconnu. L'objectif de cette étude a été de déterminer si la boucle α N1 de CENP-A possède un rôle ou non dans les fonctions spéciales imputées à CENP-A.

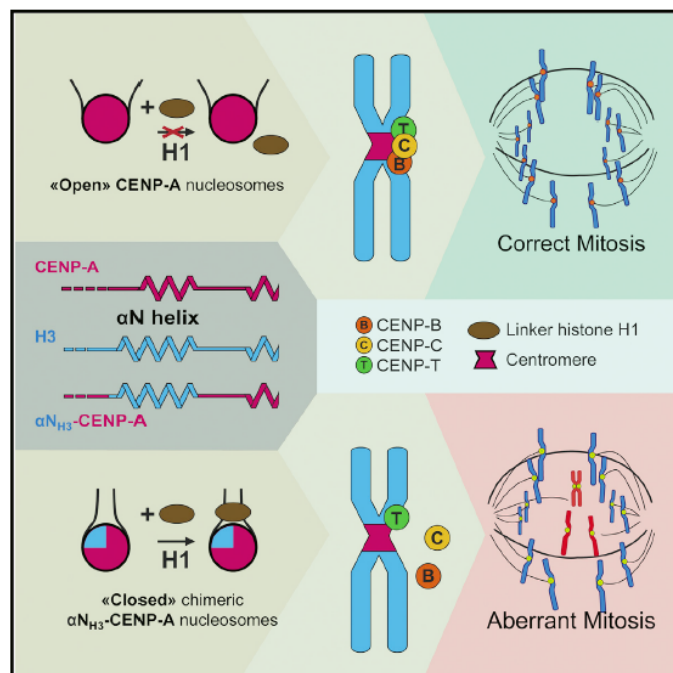
Résultats : Pour étudier l'impact de l'hélice α N1, nous avons créé deux lignées de cellules stables, l'une exprimant la protéine GFP-CENP-A non mutée (contrôle), l'autre mutée au niveau de l'hélice α N1 (GFP- α N_{H3}CENP-A) dans des cellules Hela. L'hélice α N1 de CENP-A est remplacée par celle de son homologue H3. Par RNA interférent (siARN), l'expression du gène endogène de CENP-A a été supprimé afin que seule soit présente la forme mutée, exogène. Nous avons ensuite effectué une étude complète par immunomarquage DAPI, CENP-A et laminine des défauts mitotiques engendrés par la boucle α N1 de H3 sur CENP-A. Les résultats montrent que la présence de la partie α N1 de H3 sur CENP-A

provoque une augmentation significative de défauts mitotiques conduisant à la formation de noyaux polynucléés anormaux. La boucle α N1 de CENP-A est donc essentielle pour la ségrégation des chromosomes. En parallèle, par microscopie électronique, nous avons observé que le mononucléosome contenant CENP-A non mutée possède des brins entrant et sortant flexible qui empêche la liaison de H1 et permet la formation du kinétochore. À l'inverse, CENP-A mutée au niveau de l'hélice α N1 présente des brins entrant et sortant du nucléosomes rigide favorisant la liaison de H1, altérant ainsi la formation du kinétochore.

Conclusion : La bouclée α N1 de CENP-A est fondamentale pour une conformation du nucléosome centromérique qui exclue H1. Cela permet la constitution d'une chromatine particulière capable d'être reconnue par les protéines du kinétochore pour un accrochage efficace de ce dernier dans le but *in fine* de réaliser une ségrégation parfaite des chromosomes lors de la division mitotique.

The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity

Graphical Abstract



Authors

Yohan Roulland, Khalid Ouararhni, Mladen Naidenov, ..., Dimitar Angelov, Ali Hamiche, Stefan Dimitrov

Correspondence

dimitar.angelov@ens-lyon.fr (D.A.), hamiche@igbmc.fr (A.H.), stefan.dimitrov@univ-grenoble-alpes.fr (S.D.)

In Brief

In this issue of *Molecular Cell*, Roulland et al. describe the structural features of a CENP-A nucleosome and identify the mechanism by which its flexible DNA arms interfere with linker histone H1 recruitment, assist active kinetochore assembly, and ensure mitotic fidelity.

Highlights

- CENP-A nucleosomal ends are highly flexible in solution
- Dynamic CENP-A nucleosomal ends prevent H1 recruitment
- Flexibility of DNA ends allows active kinetochore complex assembly
- Open CENP-A nucleosomal structure is essential for its mitotic function



Roulland et al., 2016, *Molecular Cell* 63, 674–685
August 18, 2016 © 2016 Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.023>

CellPress

The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity

Yohan Roulland,¹ Khalid Ouararhni,² Mladen Naidenov,^{3,9} Lorrie Ramos,¹ Muhammad Shuaib,² Sajad Hussain Syed,^{1,3,10} Imtiaz Nizar Lone,^{1,3} Ramachandran Boopathi,^{1,3} Emeline Fontaine,¹ Gabor Papai,⁴ Hiroaki Tachiwana,⁵ Thierry Gautier,¹ Dimitrios Skoufias,⁶ Kiran Padmanabhan,⁷ Jan Bednar,¹ Hitoshi Kurumizaka,⁵ Patrick Schultz,⁴ Dimitar Angelov,^{3,*} Ali Hamiche,^{2,8,*} and Stefan Dimitrov^{1,*}

¹Université de Grenoble Alpes/INSERM U1209/CNRS UMR 5309, 38042 Grenoble Cedex 9, France

²Department of Functional Genomics and Cancer, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer/Université de Strasbourg/CNRS/INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France

³Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule (LBMC) CNRS/ENSL/UCBL UMR 5239 and Institut NeuroMyoGène – INMG CNRS/UCBL UMR 5310, Université de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France

⁴Department of Integrated Structural Biology, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)/Université de Strasbourg/CNRS/INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France

⁵Laboratory of Structural Biology, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku, Tokyo 162-8480, Japan

⁶Institut de Biologie Structurale, Université de Grenoble Alpes, 38044 Grenoble, France

⁷Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5242, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France

⁸Qatar Biomedical Research Institute, Hamad Bin Khalifa University, P.O. Box 5825, Qatar Foundation, Doha, Qatar

⁹Present address: Department of Plant Physiology and Molecular Biology, University of Plovdiv, Faculty of Biology, Plovdiv 4000, Bulgaria

¹⁰Present address: Division of Cancer Pharmacology, Indian Institute of Integrative Medicine (CSIR), Jammu 180001 and Kashmir, India

*Correspondence: dimitar.angelov@ens-lyon.fr (D.A.), hamiche@igbmc.fr (A.H.), stefan.dimitrov@univ-grenoble-alpes.fr (S.D.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.023>

SUMMARY

CENP-A is a histone variant, which replaces histone H3 at centromeres and confers unique properties to centromeric chromatin. The crystal structure of CENP-A nucleosome suggests flexible nucleosomal DNA ends, but their dynamics in solution remains elusive and their implication in centromere function is unknown. Using electron cryo-microscopy, we determined the dynamic solution properties of the CENP-A nucleosome. Our biochemical, proteomic, and genetic data reveal that higher flexibility of DNA ends impairs histone H1 binding to the CENP-A nucleosome. Substituting the 2-turn α N-helix of CENP-A with the 3-turn α N-helix of H3 results in compact particles with rigidified DNA ends, able to bind histone H1. In vivo replacement of CENP-A with H3-CENP-A hybrid nucleosomes leads to H1 recruitment, delocalization of kinetochore proteins, and significant mitotic and cytokinesis defects. Our data reveal that the evolutionarily conserved flexible ends of the CENP-A nucleosomes are essential to ensure the fidelity of the mitotic pathway.

INTRODUCTION

Chromatin is composed of repetitive structures of the basic unit, a nucleosome, which consists of histone octamer composed of

core histones (two of each H2A, H2B, H3, and H4) around which 167 base pairs (bp) of DNA are wrapped to form two superhelices (Luger et al., 1997; Van Holde et al., 1980). Individual nucleosomes interspersed with linker DNA form the 10 nm chromatin filament (Thoma et al., 1979; Van Holde et al., 1980). A fifth histone, termed “linker histone”, interacts with this linker DNA and assists in the assembly, condensation, and stability of the 30 nm chromatin fiber (Makarov et al., 1983; Thoma et al., 1979).

In addition to the conventional core histones, each cell expresses histone variants. Histone variants are non-allelic isoforms of conventional histones and all histones, except H4, have variants (Van Holde et al., 1980). Incorporation of these variants confers novel structural and functional properties to chromatin (reviewed in Boulard et al., 2007).

The histone CENP-A is a textbook example of a histone variant that upon incorporation changes the properties of a nucleosome (Goutte-Gattat et al., 2013; Kingston et al., 2011; Mizuguchi et al., 2007; Tachiwana et al., 2011). CENP-A belongs to the H3 family of histones (Earnshaw and Migeon, 1985; Palmer et al., 1987) and is exclusively localized to centromeres and defines the specific centromere structure and function (Buscaino et al., 2010).

CENP-A epigenetically marks the centromeres, where it is required for the assembly of active kinetochores. The constitutive centromere associated network (CCAN), a complex consisting of 16 proteins (termed generally as CENPs), recognizes and directly interacts with centromeric chromatin (Perpelescu and Fukagawa, 2011). Importantly, two of the CCAN members, CENP-C and CENP-T, assemble a platform to direct kinetochore formation (Perpelescu and Fukagawa, 2011).

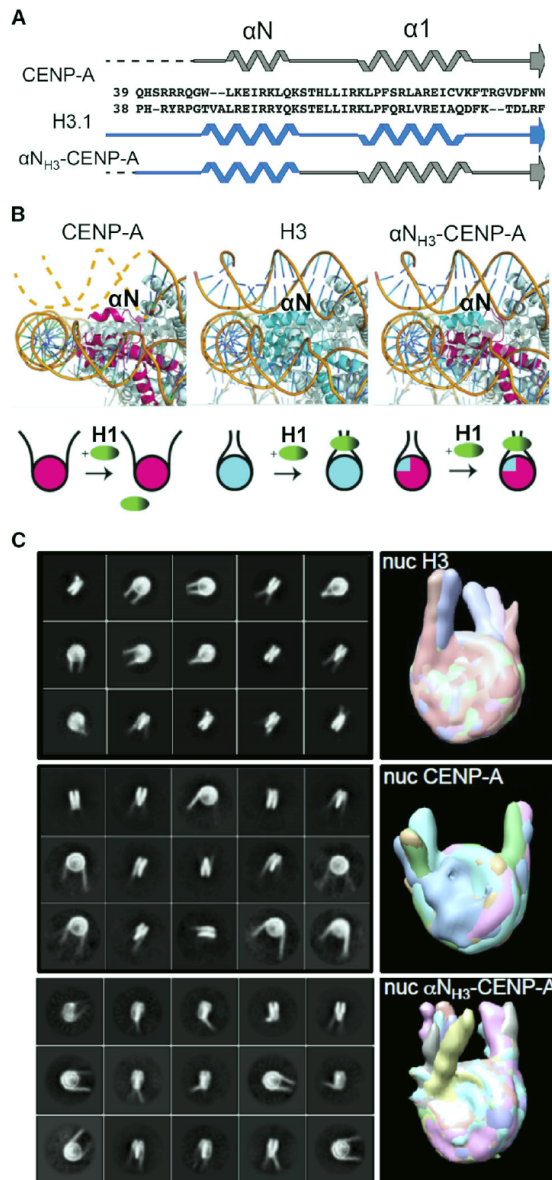


Figure 1. The Hybrid αN_{H3} -CENP-A Nucleosome, in Contrast to the WT CENP-A Nucleosome, Exhibits a Compact Structure Very Similar to that of the Conventional Nucleosome

(A) Schematics of the secondary structure of the N-terminal regions of CENP-A, H3, and αN_{H3} -CENP-A in the nucleosome. The sequences of human CENP-A, H3, and αN_{H3} -CENP-A are aligned with the secondary structural elements.

(B) Close up views of the αN helices and the DNA edge regions of CENP-A (left) and H3 (middle) nucleosomes; right, predicted organization of the αN helices and the DNA edge regions of αN_{H3} -CENP-A nucleosome; bottom, schematics of the expected interaction of H1 with the respective nucleosomes, depicted in the upper images.

CENP-A depletion results in numerous mitotic and cytokinetic defects and subsequent aneuploidy (Goutte-Gattat et al., 2013; Régnier et al., 2005). CENP-A loss leads to altered composition and organization of the kinetochore, including the delocalization of the inner kinetochore proteins CENP-C, CENP-I, and CENP-H as well as the outer kinetochore components HEC1, Mad2, and CENP-E (Goutte-Gattat et al., 2013; Régnier et al., 2005).

The crystal structure of the CENP-A nucleosome particle was recently solved (Tachiwana et al., 2011). In contrast to the conventional nucleosome structure, only 121 bp of DNA are resolved in the crystal structure of the CENP-A nucleosome, suggesting that 13 bp of DNA at each nucleosomal end display marked flexibility. In agreement with this suggestion, CENP-A nucleosomal ends exhibited higher accessibility to nucleases (Kingston et al., 2011). Experiments in solution point to some crystal packing artifacts, which might affect the central part of the CENP-A nucleosomes, but not the dynamics of their ends (Falk et al., 2015). However, whether the CENP-A driven nucleosomal end DNA flexibility has any physiological consequences is totally unknown.

To determine the dynamics of nucleosomal DNA ends in solution, both conventional and CENP-A nucleosomes were analyzed by using electron cryomicroscopy (ECM) combined with 3D reconstruction. ECM data clearly show that the CENP-A nucleosomal ends, as suggested by the crystal structure, exhibit a high degree of flexibility. The αN helix of H3 and the preceding loop, which is in contact with DNA, plays a role in stabilizing the conventional nucleosomal DNA ends. This specific rigid orientation of the exit and entry angle of the nucleosomal DNA ends, in addition to the linker histone H1 binding modes and condensation of nucleosomal arrays, is regulating the interaction of H1 with conventional nucleosomes (Song et al., 2014; Syed et al., 2010; Zhou et al., 2013; Zhou et al., 2015). Thus, highly dynamic CENP-A nucleosomal ends would likely preclude the binding of H1, which might in turn be important for centromere function and kinetochore assembly (Figures 1A and 1B). Since the fixed entry/exit angle and rigidity of DNA ends of conventional nucleosome are governed by the interaction of the αN helix of H3, we created a hybrid CENP-A nucleosome, wherein the αN helix of CENP-A was replaced with that of H3, which is one helical turn longer. ECM analysis reveals that this hybrid H3-CENP-A particle, in contrast to the wild-type (WT) CENP-A nucleosome, exhibits a compact structure very similar to that of the conventional nucleosome. We then studied the properties of these hybrid nucleosomes in vitro and in vivo and compared them with those of the WT CENP-A nucleosomes. Our biochemical and cell biological data demonstrate that the flexible DNA ends of CENP-A nucleosome are essential for the structural integrity of the centromere, which is required for the fidelity of the mitotic process.

(C) ECM and image analysis of conventional, CENP-A, and mutant αN_{H3} -CENP-A nucleosomes reconstituted on 601 DNA; gallery of class averages after image alignment and clustering for conventional (upper), CENP-A (middle), and αN_{H3} -CENP-A (lower) nucleosomes without H1; right, surface representation of the main distinct conformations of conventional (upper), CENP-A (middle), and αN_{H3} -CENP-A (lower) nucleosomes.

RESULTS

CENP-A Nucleosomes Exhibit Highly Dynamical DNA Ends in Solution, Determined by the “Defective” α N Helix of CENP-A

We used ECM to analyze the dynamics of CENP-A nucleosome in solution. We purified recombinant human core histone octamers containing conventional H3 or CENP-A (Figure S1) and reconstituted centrally positioned nucleosomes on 197 bp 601 DNA in order to have 25 bp free DNA ends. The reconstituted particles were studied in frozen hydrated conditions (Figure S2). Frames showing well-separated nucleosomes were selected and 29,711 and 24,286 molecular images were extracted for conventional and CENP-A nucleosomes, respectively. These images were used for building ab initio a 3D model of the particles (Figure 1C). The final ECM map is in full agreement with the crystal structure of the nucleosome core particle (NCP) (Luger et al., 1997). To analyze the conformational variability of the particle population, a 3D classification scheme based on maximum likelihood optimization was used to separate different structural variants (Scheres, 2012; Table S1). While the nucleosome core showed little variation, we observed distinct configurations of the DNA ends for both conventional and CENP-A particles (Figure 1C). For each 3D class, the angles between each linker arm and the dyad axis were determined in the front and the side view of the nucleosome (Figure S3). The analyses indicated that, in particular, the CENP-A particles have open conformations with much higher entry/exit angles (higher DNA end orientation fluctuations) compared to the conventional ones. We conclude that in solution, the CENP-A nucleosomal ends exhibited, as suggested by the X-ray diffraction studies, a very high degree of flexibility. The α N helix of CENP-A is one helical turn shorter than that of conventional H3 nucleosome and the preceding region, in contrast to that of H3, is completely disordered (Tachiwana et al., 2011; see also Figure 1B). However, both the α N helix length and the loop segment preceding the α N helix (which directly interacts with the DNA ends in H3 nucleosome; Luger et al., 1997) are required for maintaining the DNA orientation at the entrance and exit of H3 nucleosomes. Thus, the specific organization of these regions in CENP-A might be responsible for the inherent flexibility of the DNA ends of the CENP-A nucleosome (Tachiwana et al., 2011; Figure 1B). Therefore, we hypothesized that swapping the CENP-A α N helix and the segment preceding it with those of conventional H3 would rigidify the ends of nucleosomal CENP-A DNA. To test this, we generated a hybrid H3-CENP-A mutant (α NH3-CENP-A) containing the α N helix and the preceding loop region of H3. Next, we expressed this construct in bacteria and, after purification, we used it for reconstitution of α NH3-CENP-A nucleosomes on 197 bp 601 DNA (Figure S1). The structure and dynamics of the mutant α NH3-CENP-A nucleosomes were studied by ECM as described above for both conventional and CENP-A nucleosome. There were 155,000 molecular images that were extracted and used for building ab initio a 3D model of the hybrid particles (Figures 1C, bottom, S2 and S3). As seen, the mutant α NH3-CENP-A particle exhibits a structure very similar to those of conventional H3 nucleosome conformations, with smaller entry/exit angles of the DNA ends. Therefore, the defective α N helix

of CENP-A is the main determinant for the highly flexible CENP-A nucleosomal ends.

CENP-A Nucleosome Is Refractive to Histone H1 Binding

The binding of histone H1 to the nucleosome is regulated by the entry/exit angle of the nucleosomal DNA ends and is favored by rigid DNA (Bednar et al., 1998; Syed et al., 2010). The flexibility of the ends within the CENP-A nucleosome might therefore interfere with the binding of histone H1. To analyze the ability of histone H1 to interact in vitro with the CENP-A nucleosome, we have used a combination of two techniques, namely electro-mobility shift assay (EMSA) and hydroxyl radical ($\cdot$ OH) footprinting. EMSA allows the visualization of H1 binding to the nucleosome, but does not differentiate between specific and non-specific association, while $\cdot$ OH footprinting detects the specific H1 binding at 1 bp resolution (Menoni et al., 2012; Syed et al., 2010).

A physiologically relevant linker histone chaperone (NAP-1) was used to deposit histone H1 on centrally positioned conventional or CENP-A nucleosomes (Syed et al., 2010). The particle solutions were incubated with increasing amounts of NAP-1/H1 complex and run on native PAGE (Figure 2A). As seen, at the NAP-1/H1 concentration, when a complete shift for the H3-nucleosome was found, only a very weak shifted band reflecting the H1-CENP-A-nucleosomal complex was detected. These data showed that the presence of CENP-A interferes with the binding of histone H1 to the nucleosome.

The $\cdot$ OH footprinting patterns of conventional and CENP-A di-nucleosome were very similar; i.e., no enhanced cleavage at the DNA ends of the CENP-A nucleosome was observed (Figure 2B). This reflects the lack of sensitivity of the method to detect the dynamics and the transient dissociation of the ends from the core histone octamer. Some perturbations (increase of the $\cdot$ OH cleavage “noise”) in the $\cdot$ OH cleavage pattern can be observed only when the DNA nucleosomal ends are permanently and completely dissociated from the histone octamer as in the case of the histone variant H2A.Bbd and the chimeric H2A.ddBbd nucleosomes (see Figures 4 and S1; Shukla et al., 2011).

In agreement with our earlier data (Syed et al., 2010), the binding of histone H1 to conventional H3 di-nucleosomes results in: (1) clear protection of the nucleosomal dyad due to the strong interaction of the globular domain of H1 with the dyad, and (2) generation of 10 bp repeat of the linker DNA (Figure 2B, footprinting gel and the scans), which reflects the H1-induced formation of the stem structure (H1 interacts with both linkers and brings them in close vicinity and, thus, induces the assembly of the stem (Hamiche et al., 1996; Menoni et al., 2012; Syed et al., 2010). However, only very faint protection and 10 bp repeats were observed in CENP-A-di-nucleosomes incubated with the NAP1/H1 complex (Figure 2B, footprinting gel and the scans). These data revealed weak interaction of histone H1 with the CENP-A particles. Taken together, our in vitro experiments demonstrate that the CENP-A nucleosomal templates are poor substrates for H1 binding.

“Rigidifying” the DNA Ends of the CENP-A Nucleosome Allows Efficient Binding of Histone H1 In Vitro

A low degree of flexibility of the nucleosomal DNA ends is required for the efficient and specific binding of histone H1.

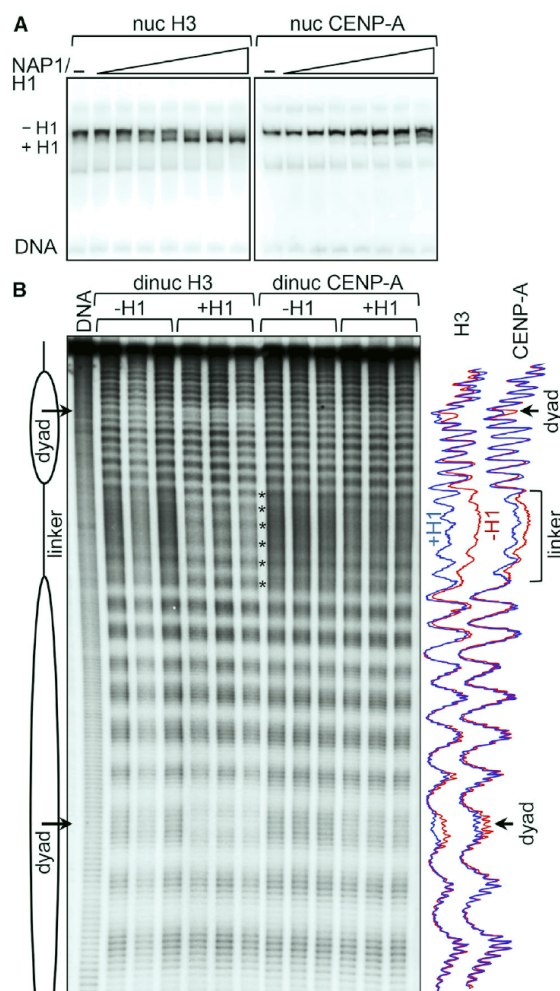


Figure 2. The Presence of CENP-A Interferes with Histone H1 Binding to the Nucleosome

(A) EMSA of binding of histone H1 to conventional H3 (nucH3, left) and to CENP-A (nuc CENP-A, right) mononucleosomes. The particles were incubated with increasing amounts of NAP-1-histone H1 complex.

(B) OH footprinting of conventional H3 and CENP-A di-nucleosomes. The di-nucleosomes were assembled with H1 and H1 binding was analyzed by OH footprinting. On the left are schematics of the di-nucleosome, the nucleosome dyad is indicated with an arrow, and on the right are scans of the OH digestion pattern of H3 and CENP-A di-nucleosomes, assembled (+H1, blue) or not (-H1, red) with H1.

The swapped α N_{H3}-CENP-A mutant particle has rigid DNA ends (Figure 1C) as conventional H3 nucleosomes, and thus, would allow H1 binding (see schematics, Figures 1A and 1B). To test this, we analyzed the interaction of H1 with α N_{H3}-CENP-A nucleosomes with both EMSA and OH footprinting as described for WT CENP-A (Figure 2). H1.5 subtype was used in these experiments. Of note, H1.5 exhibits very similar to H1.2 binding effi-

ciency to the nucleosome (Figure S4). The deposition of H1 was performed by using the NAP-1/H1 complex, as detailed in Figure 2. The EMSA experiment clearly shows that histone H1 binds to both H3 and α N_{H3}-CENP-A particles with the same efficiency (Figure 3A, compare upper and lower). OH footprinting revealed identical localization of histone H1 on both control H3 and α N_{H3}-CENP-A nucleosomes as evidenced by a clear protection at the nucleosomal dyad and the generation of the typical OH cleavage 10 bp-repeat of the linker DNA (Figure 3B). Therefore, the hybrid α N_{H3}-CENP-A nucleosomes, in contrast to WT CENP-A nucleosomes, are able, as predicted, to bind H1 with higher specificity and affinity.

H1 Is Not Associated with CENP-A Chromatin In Vivo

To determine whether H1 binding to CENP-A nucleosomes was also negatively affected in vivo as our in vitro experiments demonstrated, we used a proteomic approach coupled to mass spectrometry using cell culture models. We generated stable HeLa cell lines expressing double HA and FLAG tagged CENP-A (e-CENP-A) (Goutte-Gattat et al., 2013; Shuaib et al., 2010). Stable HeLa cell lines expressing double-tagged conventional histone H3.1 (e-H3.1) or the histone variant H3.3 (e-H3.3) were used as positive controls. We isolated the nucleosomal e-CENP-A as well as both e-H3.1 and e-H3.3 nucleosomal complexes by double immunoaffinity purification (Goutte-Gattat et al., 2013). The composition of the complexes was analyzed by mass spectrometry, SDS PAGE, and western blotting (Figure 4). The e-CENP-A complex, in agreement with the available data (Foltz et al., 2006; Goutte-Gattat et al., 2013), contained several proteins from the CCAN as well as other proteins (Figure 4; Table S2). Importantly, no histone H1 was found associated within the complex as shown by electrophoretic analysis, western blotting, and mass spectrometry (Figures 4B–4D), although e-H3.1 and e-H3.3 nucleosomal complexes contained both isoforms H1.1 and H1.2 of histone H1 (Figure 4A). Therefore, histone H1 does not associate in vivo with CENP-A chromatin. These in vivo data fully agree with the poor non-specific in vitro binding of H1 to reconstituted CENP-A nucleosomes (Figure 1).

In Vivo Binding of H1 to the α N_{H3}-CENP-A Nucleosome

Does artificially rigidifying CENP-A nucleosomal ends allow H1 binding in vivo? To analyze this, we generated stable HeLa cell lines expressing double HA and FLAG epitope tagged α N_{H3}-CENP-A. The α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex was purified as above and compared to the WT CENP-A nucleosomal complex. Its members were characterized by SDS PAGE, western blot, and mass spectrometry (Figures 4B–4D). Unlike the CENP-A nucleosomal complex, all methods identified histone H1 present in the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex. The characteristic histone H1 doublet was present in the electrophoretic pattern of the α N_{H3}-CENP-A complex, but not in that of WT CENP-A one (Figure 4B). The anti-H1 antibody revealed a clear doublet corresponding to H1 (Figure 4C) and 15 H1 peptides (in total) were found by mass spectrometry in the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex (Figure 4D). Taken as a whole, our data reveal that the swapping the α N helix, and the preceding region of CENP-A with those of H3, primarily drives the generation of a

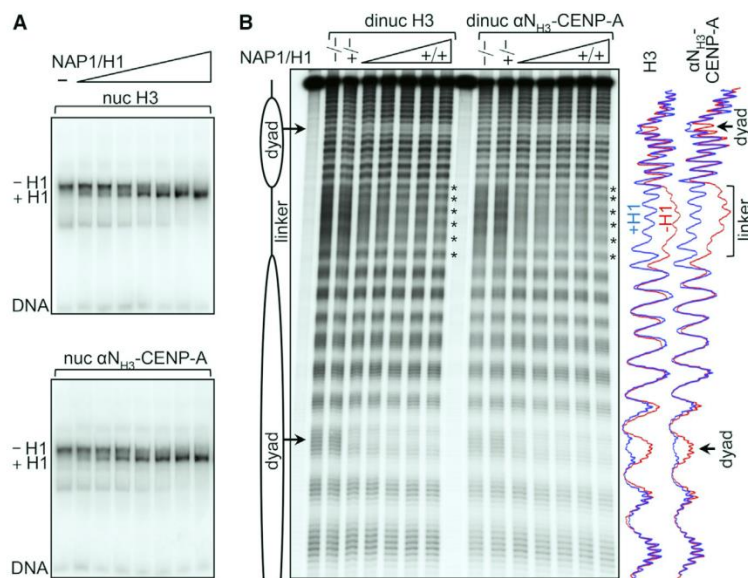


Figure 3. Efficient In Vitro Binding of Histone H1 Swapped αNH_3 Helix Mutant CENP-A, $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$, Nucleosome

(A) EMSA of histone H1 binding to H3 and $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ nucleosomes. Conventional H3 (upper) or swapped $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ nucleosomes (lower) were incubated with increasing amounts of NAP-1-histone H1 complex and were analyzed by PAGE. The positions of the non-bound and H1-bound nucleosomes are indicated.

(B) $\cdot\text{OH}$ footprinting of H3 and $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ dinucleosomes. The di-nucleosomes were assembled with increasing amounts of NAP-1-histone H1 complex and H1 binding was analyzed by $\cdot\text{OH}$ footprinting. On the left are schematics of the di-nucleosome, the nucleosome dyad is indicated with an arrow, and on the right are scans of the $\cdot\text{OH}$ digestion pattern of H3 and CENP-A di-nucleosomes, assembled (+H1, blue) or not (–H1, red) with H1.

particle with rigid orientation of the entry/exit DNA ends, which then allows efficient and specific association with histone H1 both in vitro and in vivo.

The In Vivo Replacement of CENP-A with the $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ Swap Mutant Leads to Strong Mitotic and Cytokinetic Defects

A hybrid $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ with H1 bound to it would in turn lead to the formation of condensed chromatin fibers similar to those established with canonical H3. Could this compact structure of the $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ chromatin then affect the function of centromeres? To test this hypothesis, endogenous CENP-A was knocked down by using specific small interfering (si)RNAs in HeLa cell lines, and we analyzed the effect of expressing a siRNA resistant GFP- $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ hybrid transcript as compared to a siRNA resistant GFP-CENP-A transcript (see schematics in Figure 5A). This was followed by quantitative analysis of mitotic progression in all cell lines.

Treatment with siRNA results in very strong ablation of endogenous CENP-A: more than 85%–90% of endogenous CENP-A was depleted in each of the cell lines used and, as expected, the expression of the siRNA-resistant GFP-fusions was not affected (Figure 5B). Both GFP-fusions were found localized to the centromeres (Figure 5C). In agreement with the reported data (Goutte-Gattat et al., 2013; Régner et al., 2005), the absence of CENP-A in naive HeLa cells has deleterious effects on both mitosis and cytokinesis (Figure 5C). CENP-A depleted cells exhibited numerous mitotic and cytokinetic defects including chromosome misalignment, lagging chromosomes, chromosome bridges, and multiple nuclei in interphase (Figures 5C–5E). The presence of stably expressed GFP-CENP-A completely rescued the mitotic and cytokinetic defects in HeLa cell lines treated with siRNA (Figures 5C–5E). No rescue

was, however, observed in CENP-A depleted HeLa cell lines stably expressing the GFP- $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ fusion (Figures 5C–5E). HeLa cells are polyploid and exhibit some mitotic defects even under normal growth conditions and while our data clearly illustrate that cells harboring hybrid CENP-A nucleosomes are in a poor condition, we cannot rule out some off-target effects. To conclusively eliminate any possible undesirable effects, we established conditional homozygous knockout/knockin (cKO/KI) mouse lines, where the endogenous CENP-A was replaced with a HA-FLAG-tagged CENP-A version (Figure 6A). These mice did not show any visible phenotype and were fertile. We derived mouse embryonic fibroblasts (MEF) from 14.5 days post coitum embryos and immortalized them. The immortalized MEFs were transfected with constructs expressing a tamoxifen inducible Cre-ERT2 recombinase along with either GFP-CENP-A or GFP- $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ mutants and stable lines were established. Quantification of centromeres in over 100 cells indicated that the amount of both GFP-fusions incorporated at the centromeres of the respective MEFs were identical (Figure S5).

Tamoxifen induced Cre-ERT2 expression led to excision of both CENP-A alleles and subsequent depletion of CENP-A protein. Western blot analysis showed that 8 days after tamoxifen treatment, the endogenous protein was completely depleted (Figures 6B–6D) and a strong increase of both mitotic and cytokinesis defects were observed in the control CENP-A depleted MEFs (Figures 6E–6G). The expression of GFP-CENP-A was sufficient to completely rescue the phenotype (Figures 6E–6G). The expression of GFP- $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$, however, was unable to rescue both the mitotic and cytokinesis defects (Figures 6E–6G). In the absence of endogenous CENP-A, the stable MEFs expressing GFP- $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ exhibited close to 2-fold more mitotic defects compared to those expressing GFP-CENP-A (Figure 6F). Of note, GFP- $\alpha\text{NH}_3\text{-CENP-A}$ is likely to act as a dominant negative since its stable expression (in the presence of endogenous CENP-A) is associated with ~2-fold increase of

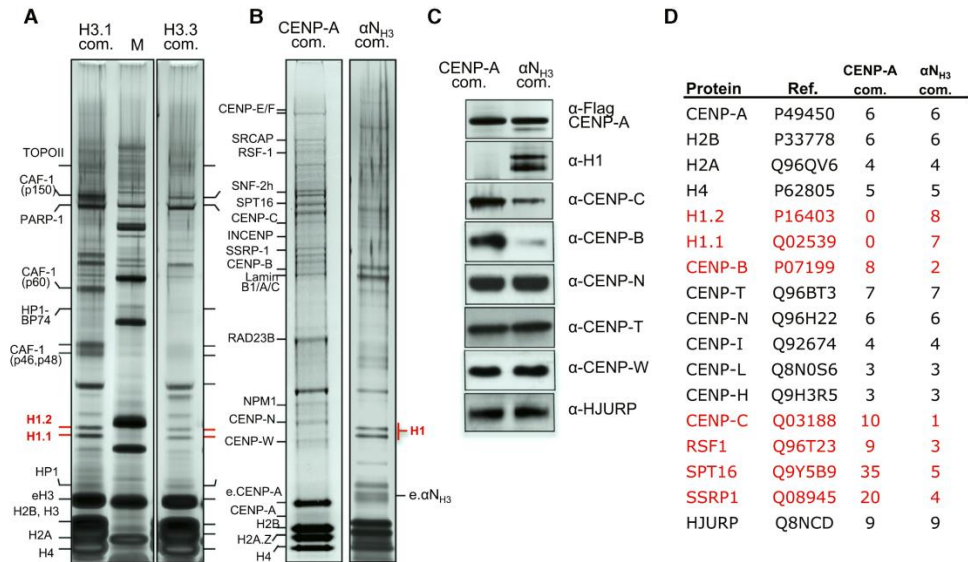


Figure 4. Histone H1 Binds In Vivo to the α N_{H3}-CENP-A Swapped Nucleosomes, but Not to WT CENP-A Particles

(A) Silver staining of proteins associated with either e-H3.1 or e-H3.3 nucleosomes. The nucleosomal e-H3.1 and e-H3.3 complexes were purified by tandem immunoaffinity from stable HeLa cells expressing either e-H3.1 or e-H3.3 and the associated polypeptides were identified by mass spectrometry. Lane M corresponds to a protein molecular mass marker. The H1 histones (both H1.1 and H1.2 isoforms) are indicated in red.

(B) Silver staining of proteins associated with either the e-CENP-A (left) or the e- α N_{H3}-CENP-A (right) nucleosomal complexes isolated from stable HeLa expressing either e-CENP-A or e- α N_{H3}-CENP-A, respectively. Note that the e-CENP-A complex, in contrast to e- α N_{H3}-CENP-A and both e-H3.1 and e-H3.3 complexes, is not associated with histone H1.

(C) Western blot detection of the indicated proteins associated with either the WT e-CENP-A or e- α N_{H3}-CENP-A mutant nucleosomes.

(D) Mass spectrometry analysis of selected proteins associated with either the WT e-CENP-A or e- α N_{H3}-CENP-A mutant nucleosomes. The proteins together with the number of identified peptides are shown. The proteins with distinct number of identified peptides in both complexes are indicated in red.

mitotic defects compared to these of control MEFs (Figure 6F). Taken as a whole, the data in both HeLa cells and in MEFs reveal that the replacement of CENP-A with α N_{H3}-CENP-A nucleosomes at the centromeres impairs both mitosis and cytokinesis in these cells.

Replacement of CENP-A with the Swapped α N_{H3}-CENP-A Mutant at the Centromeres Leads to Aberrant Localization of CENP-C

The deleterious effect of α N_{H3}-CENP-A hybrid nucleosomes on centromere function might reflect reduced amount or absence of some proteins from the CCAN complex, crucial for the assembly of active kinetochores. Comparative mass spectrometry analysis on the composition of α N_{H3}-CENP-A and the WT CENP-A nucleosomal complexes reveals that this is the case (Figure 4; Table S2). In agreement with earlier observations (Goutte-Gattat et al., 2013), the WT CENP-A nucleosomal complex comprised a large number of CCAN proteins (CENP-B, CENP-T, CENP-N, CENP-I, CENP-L, CENP-C, and CENP-H, etc.), the CENP-A chaperone HJURP, the chromatin remodeler RSF-1, as well as many other proteins (Figure 4; Table S2). These proteins are also members of the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex (Figures 4C and 4D; Table S2). However, the number of identified peptides originating from several of the identified

proteins and in particular for both CENP-C and CENP-B, RSF-1, and the two subunits (SPT16 and SSRP1) of FACT dramatically decreased in the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex compared to the WT CENP-A complex (Figure 4D; Table S2), suggesting a strong loss of these proteins in the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex. Western blot analysis further confirmed that the amount of both CENP-C and CENP-B is much lower in the α N_{H3}-CENP-A nucleosomal complex (Figure 4C). In contrast, the levels of several CCAN proteins, including CENP-T, CENP-N, and CENP-W are not affected in both types of nucleosomes, as shown by western blot and mass spectrometry (Figures 4C and 4D). In addition, no changes in the HJURP associated with both the nucleosomal and the nuclear soluble GFP-CENP-A and GFP- α N_{H3}-CENP-A were observed (Figures 4C and S7B).

Indeed, immunofluorescence analysis of the localization of CENP-C in stable HeLa cells expressing α N_{H3}-CENP-A and depleted of endogenous CENP-A support our biochemical data (Figure 7). Depletion of CENP-A in naive HeLa cells results in dramatic delocalization of CENP-C, but not of CENP-T from the centromeres (Figures 7A, 7B, and S6). In the siRNA treated stable HeLa cells expressing GFP-CENP-A, this phenotype was completely rescued; i.e., a CENP-C centromere specific localization was indistinguishable from that observed in naive

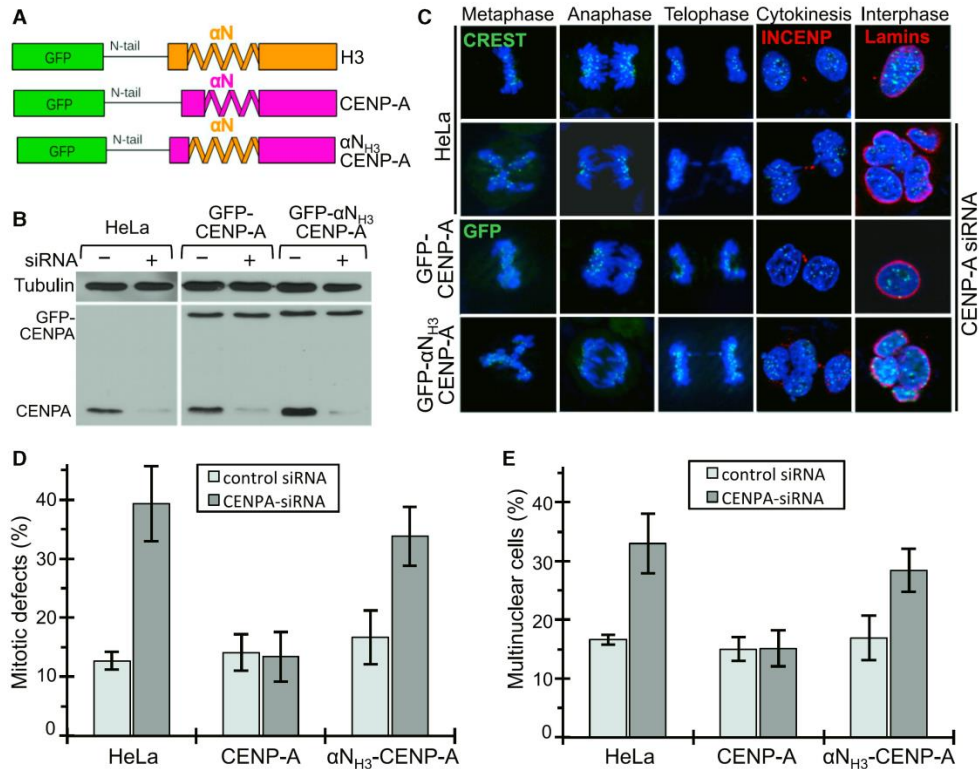


Figure 5. The Replacement in HeLa Cells of WT CENP-A with the Swapped α N_{H3}-CENP-A Mutant at the Centromere Results in Strong Mitotic and Cytokinetic Defects

(A) Schematics for the silencing resistant GFP-fusions used for the in vivo replacement of WT CENP-A with the swapped α N_{H3}-CENP-A mutant. (B) Western blot detection of the GFP-CENP-A fusions and endogenous CENP-A using anti-CENP-A antibody in cells treated with control siRNA (–) or CENP-A siRNA (+). The nuclear proteins were extracted 72 hr post-transfection. The cell lines as well as the positions of the GFP-CENP-A fusions and endogenous CENP-A are indicated. (C) Cell-cycle visualization, after endogenous CENP-A depletion by siRNA treatment, of naive HeLa cells (second row) or HeLa cells stably expressing siRNA-resistant full-length GFP-CENP-A (third row) or the swapped α N_{H3}-CENP-A mutant (fourth row). On the first row are shown naive HeLa cells treated with scramble siRNA. The centromeres in naive cells were stained by CREST antibody and GFP fluorescence was used to visualize CENP-A in GFP fusion-expressing cells. An antibody against inner centromere protein (INCENP) and an anti-lamina antibody were used to detect the midbody during cytokinesis and the nuclear envelope in interphase cells (shown in red). (D and E) Blue, DNA; quantification of the mitotic (D) and cytokinetic (E) defects at 72 hr post-transfection with siRNA against CENP-A in the indicated cell lines. For each experiment, at least 300 cells were counted. The data are means and SEM from three different experiments.

cells (Figures 7A and 7B). However, no rescue was observed in the siRNA treated stable HeLa cells expressing GFP- α N_{H3}-CENP-A since almost complete delocalization of CENP-C was observed (Figures 7A and 7B). We have further confirmed these results by using stable HeLa cells expressing either GFP-CENP-A or both GFP- α N_{H3}-CENP-A and RFP-CENP-C fusions. As expected, the absence of endogenous CENP-A in the control cells resulted in the delocalization of RFP-CENP-C and this phenotype was completely reversed by the presence of GFP-CENP-A (Figure 7C). However, only very faint RFP stained centromeres were observed in endogenous CENP-A depleted cells, stably expressing GFP- α N_{H3}-CENP-A (Figure 7C). Identical results were observed in modified MEFs depleted of CENP-A, which expressed mouse RFP-CENP-C (Figure 7D). Therefore,

the flexible CENP-A nucleosomal ends and the absence of H1 from centromeric chromatin are required for both proper CENP-C localization and function at the centromeres.

DISCUSSION

Recent X-ray diffraction studies revealed that within the crystal, the DNA ends of the CENP-A nucleosome are not firmly wrapped around the histone octamer. In this work, by using high resolution ECM, we confirmed the results of the X-ray diffraction studies and showed that in solution the CENP-A nucleosomal ends are indeed highly flexible. Our data further revealed that the uncommon structure of the α N helix of CENP-A determines this peculiar feature of the CENP-A particle. We hypothesized that

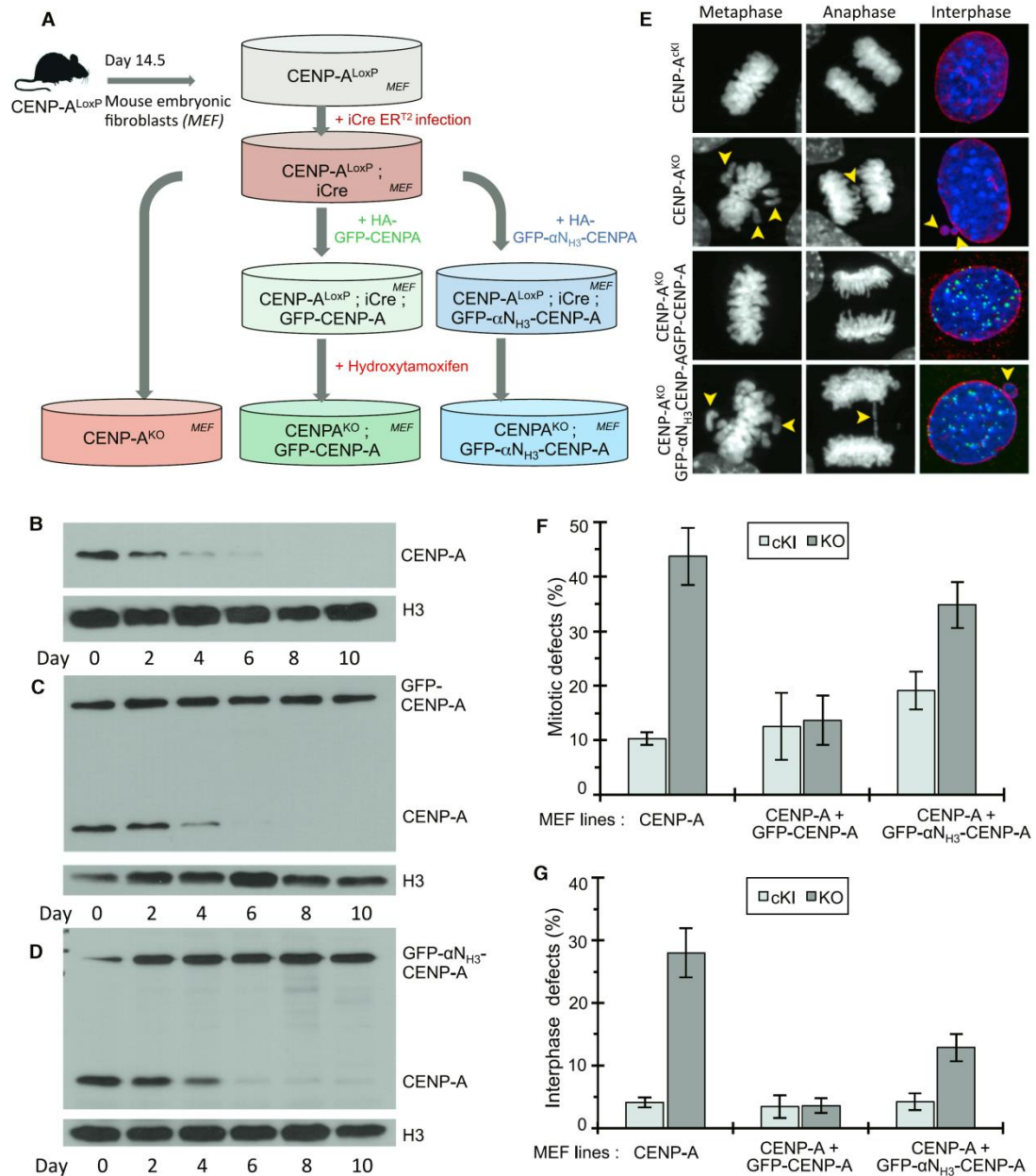


Figure 6. The Replacement in MEFs of WT CENP-A with the Swapped α N_{H3}-CENP-A Mutant at the Centromere Results in Strong Mitotic and Cytokinetic Defects

(A) Schematics of the establishment of stable MEF cell lines expressing the indicated GFP-CENP-A fusions.

(B–D) Western blot detection of the HA-GFP-CENP-A fusions and endogenous HA-CENP-A in control CENP-A (Flox/Flox) MEFs (B) and stable CENP-A (Flox/Flox) MEFs expressing either HA-GFP-CENP-A (C) or HA-GFP- α N_{H3}-CENP-A (D) at different days after tamoxifen treatment. All cells have stably inserted Cre-ERT2. H3 is used for visualization of the equal loading.

(legend continued on next page)

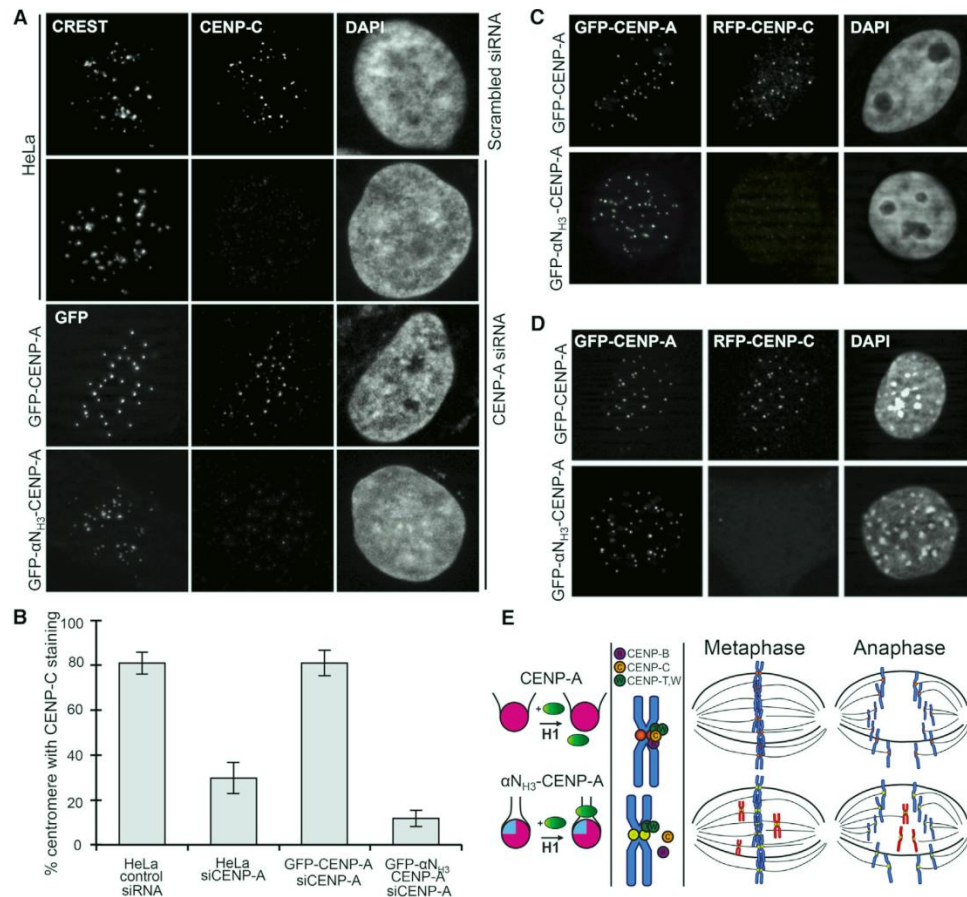


Figure 7. The Incorporation of Swapped αN_{H3} -CENP-A Mutant in the Centromeres Affects the Localization Pattern of CENP-C

(A) Immunofluorescent localization of CENP-C in CENP-A depleted HeLa cells stably expressing the indicated siRNA-resistant GFP-CENP-A fusions (rows 3 and 4). Rows 1 and 2 show the CENP-C localization in naive HeLa cells treated with scrambled or CENP-A siRNA, respectively. Centromeres in naive cells were stained with a CREST antibody.

(B) Quantification of the CENP-C delocalization data presented in (A). In each experiment, 150 cells were used. The data are means and SEM from five different experiments.

(C) Same as (A), but for the localization of the fusion RFP-CENP-C. The experiments were carried out in stable HeLa cells expressing both RFP-CENP-C and the respective siRNA-resistant GFP-CENP-A fusions.

(D) Localization of RFP-CENP-C in endogenous CENP-A-depleted MEF cells stably expressing either the GFP-CENP-A (first row) or GFP- αN_{H3} -CENP-A (second row) fusions.

(E) Schematics describing the role of the flexible nucleosomal ends of the CENP-A nucleosome in the organization of CENP-A centromeric chromatin and the assembly of active kinetochores. Rigidifying the ends of the CENP-A nucleosome compromises kinetochore assembly and mitosis.

maintaining DNA ends in a flexible state is central to the function of CENP-A in not only the structural context of a nucleosome, but also in the control of the biological output of CENP-A centromeric chromatin. Our results show that the higher flexibility of the DNA ends prevents the *in vitro* binding of the linker histone

H1 to the CENP-A nucleosome. In agreement with this, no binding of H1 was observed to the CENP-A nucleosome *in vivo*. This observation may be linked to the fact that a stable interaction with the nucleosome requires that H1 interact not only with the DNA on the dyad axis, but also with both linker DNAs. A more

(E) Cell-cycle visualization of the effects of CENP-A depletion (8 days after the treatment with tamoxifen) in the indicated MEF lines. The first row shows the control CENP-A (Flox/Flox) MEFs, which do not have inserted Cre-ERT2.

(F and G) Quantification of the mitotic (F) and cytokinetic (G) defects in the indicated cell lines upon depletion of CENP-A after 8 days treatment with tamoxifen. For each experiment, at least 200 cells were counted. The data are means and SEM from three different experiments.

open conformation resulting in highly divergent entry and exit linker DNA ends may prevent H1 from binding simultaneously both linkers and thus weaken the interaction. Indeed, we found that hybrid H3-CENP-A nucleosome with rigid orientation of the DNA linkers was able to bind *in vitro* histone H1 with higher specificity and the same efficiency as conventional H3 nucleosome. In agreement with this, the *in vivo* replacement of the CENP-A nucleosome with rigid hybrid H3-CENP-A nucleosome led to H1 recruitment.

We have further investigated the biological outcomes of the distinct CENP-A nucleosome structure by various *in vitro* and *in vivo* approaches. Our data clearly illustrate that the highly flexible DNA ends of the CENP-A nucleosome are required for the assembly of the CCAN complex. In both HeLa and MEF cells, where the CENP-A nucleosomes were fully replaced with rigid end H3-CENP-A hybrid nucleosomes, several kinetochore proteins, including CENP-C and CENP-B, were delocalized. As a result, the kinetochore assembly was highly perturbed and the chromosome segregation was strongly affected (schematically depicted in Figure 7E). Our data thus revealed that the flexible ends of CENP-A nucleosomes are required to ensure the fidelity of the mitotic pathway in higher eukaryotes (schematically depicted in Figure 7E). The lower affinity of H1 for the CENP-A nucleosome appeared to be important for this event, since artificially induced H1 binding to centromeres, containing only rigidified hybrid H3-CENP-A nucleosomes, altered both the association of several kinetochore proteins (Figure 4; Table S2) with centromeric chromatin and the organization of the structure of the kinetochores. Since, among others, the CCAN platform protein CENP-C binds equally well to the “open” CENP-A (Guse et al., 2011; Kato et al., 2013) and rigid end hybrid H3-CENP-A particles (Figure S7A), we attribute this to the assembly of the rigid and compact conventional-like chromatin fiber containing H1 and the subsequent inability of kinetochore proteins to get access and bind to it.

Of note, the non-conventional flexible structure of the CENP-A nucleosome is likely to be preserved in all eukaryotes, including yeast (Kingston et al., 2011). All this indicates that the open structure of the CENP-A nucleosome in yeast is, as in the case of higher eukaryotes, required for mitosis. Yeast does not express, however, conventional H1 able to condense chromatin. The inability of histone H1 to bind to CENP-A nucleosomes thus allows higher eukaryotes to assemble centromeres with distinct low compact chromatin structure, which would then be important for recognition of centromeric chromatin by the kinetochore protein complexes. Therefore, evolution has preserved an open structure of CENP-A nucleosomes for chromosome segregation and mitotic fidelity.

Interestingly, CENP-A is retained quantitatively, presumably under the form of nucleosomes, in mature spermatozoa in mouse, human, and bull as well as in *Drosophila* (Hammoud et al., 2009; Palmer et al., 1990; Raychaudhuri et al., 2012). The CENP-A nucleosome as a whole is therefore likely to be inherited, thus clearly establishing the epigenetic character of the CENP-A nucleosomal structure. The flexibility of DNA ends on CENP-A nucleosome could thus be needed to establish critical protein networks important for male genome function post-fertilization.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Recombinant Protein Purification

Human silencing-resistant CENP-A and α N_{H3}-CENP-A mutants were constructed using the CENP-A coding sequence (Tanaka et al., 2004). For α N_{H3}-CENP-A construct, coding sequence of amino acids 39 to 54 from CENP-A have been replaced by coding sequence for H3.1 amino acids 38 to 53. Final CENP-A constructs were cloned in frame with GFP at the N terminus into pBABE-puro vector (Addgene #1764).

Mouse α N_{H3}-CENP-A was obtained by replacing mouse CENP-A coding sequence of amino acids 34 to 49 by mouse coding sequence of H3.1 amino acids 34 to 51. Both mouse WT CENP-A and mouse α N_{H3}-CENP-A were fused in N-term with HA-GFP and then cloned into retroviral pCL-MFG vector.

Human CENP-C and mouse CENP-C sequence were fused in N-term with RFP and then cloned into pQCXIH vector (Clontech).

Construction of GFP-H3.1 and GFP-H3.3 were described elsewhere (Drané et al., 2010). Core human recombinant histones and histone H1 were expressed in bacteria and purified as described in Angelov et al. (2004) and in Syed et al. (2010), respectively. Recombinant bacterially expressed NAP-1 was purified according to the procedure described in Syed et al. (2010).

Nucleosome Reconstitution, EMSA, and -OH Footprinting

Centrally positioned conventional or either WT CENP-A or α N_{H3}-CENP-A mono-nucleosomes and di-nucleosomes were reconstituted as described previously (Menoni et al., 2007) using 255 bp 601 DNA fragment and 2 x 197 bp 601 DNA (Syed et al., 2010). The deposition of H1 was carried out by using NAP-1/H1 complexes as described in Syed et al. (2010). EMSA and -OH footprinting were performed according to well-established protocols (Syed et al., 2010).

Cell Culture

HeLa cell lines stably expressing the various GFP-CENP-A fusions were established by retroviral infection with Moloney murine leukemia viruses (MMLV) produced by amphotropic Phoenix packaging cells (Swift et al., 2001). HeLa cell lines stably expressing either GFP-H3.1 or GFP-H3.3 were described in Drané et al. (2010). The cells were maintained in standard Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) media containing 10% fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin, and 1% glutamine at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For generation of stable HeLa cell lines expressing FLAG-HA epitope-tagged either WT CENP-A or α N_{H3}-CENP-A swapped mutant, the cells were transfected with calcium phosphate.

Tandem Affinity Purification

The chromatin extracts were prepared from stable HeLa cell lines expressing CENP-A, α N_{H3}-CENP-A, H3.1, or H3.3 proteins fused to FLAG and HA epitope tags. The purification of both soluble and chromatin associated complexes were carried out as described in Goutte-Gattat et al. (2013) and Drané et al. (2010). After collection, cells were lysed in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.65, 1.5 mM MgCl₂, and 10 mM KCl) and a Dounce homogenizer was used to disrupt them. Following incubation of the nuclear pellet in high salt buffer (final concentration of NaCl of 300 mM), tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG M2-agarose (Sigma) and eluted with FLAG peptide (0.5 mg/ml). A second step of immuno-purification was carried out with anti-HA antibody-conjugated agarose, and the material was finally eluted with HA peptide (1 mg/ml). The different complexes were separated by SDS-PAGE and stained using the Silver Quest Kit (Invitrogen). Of note, we used for proteomic analysis extracts (either nucleosomal or nuclear soluble) “normalized” to CENP-A; i.e., we first performed western blotting to evaluate the amount of CENP-A/ α N_{H3}-CENP-A in the extracts and then we used either CENP-A or α N_{H3}-CENP-A extracts containing the same amount of CENP-A / α N_{H3}-CENP-A for the proteomic study. This allowed us to have some semi-quantitative estimation of the abundance of the different proteins within the complexes.

CENP-A KI-cKO Mouse Line

The CENP-A cKO/KI mouse line was established by using standard mouse genetic approaches. In this line, the CENP-A gene was replaced by a double

tagged FLAG-HA-CENP-A fusion. The targeting vector of the generated cKO/Ki FLAG-HA tagged CENP-A^{flax/flax} mice flanked exon 1 of the murine CENP-A gene with LoxP recombination sites. The exon 1 excision leads to the loss of expression of the protein (see Figure 4).

MEF Conditional CENP-A KO

Day 14 MEFs were isolated and cultured from CENP-A cKO/Ki mice. P2 cells were immortalized and infected with MSCV CreERT2 puro (Addgene #22776) and vectors expressing CENP-A constructs. CENP-A KO is induced by adding 10 μ M (Z)-4-Hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich) to cell culture media during 24 hr. Every 48 hr during 10 days, cells are trypsinated and a small portion of the cells is put back into culture. The rest of the cells are collected in order to perform experiments.

RNAi

Endogenous CENP-A expression was silenced by transient transfection with CENP-A siRNAs (Dharmacon). Transfections were carried out in six wells plates with 100 nM of siRNA mixed with 4 μ l of Oligofectamin (Invitrogen), following the provider's instructions. The following day, the transfection medium was replaced by fresh medium and cells were allowed to grow. At 72 hr after transfection, cells were fixed on coverslip for immunofluorescence (IF) or collected for western blot.

Immunofluorescence and Microscopy Image Acquisition

Cells were fixed in formalin solution (Sigma-Aldrich) at room temperature. After permeabilization, primary antibodies were incubated in blocking buffer for 1 hr at room temperature using the following antibodies: CENP-C 1/2000^o (gift from I. Cheeseman), CREST 1/2000^o (ImmunoVision), and Lamin B 1/300^o (Santa Cruz). All microscopy was performed on fixed cells with a Zeiss Axio Imager Z1 microscope with a Plan-Apochromat $\times 63$ objective. GFP, cyanine-2, cyanine-3, and Hoechst 33342 were used as fluorochromes. z stack images were acquired with a Zeiss Axiocam camera piloted with the Zeiss AxioVision 4.8.10 software. All image treatment was performed using Fiji (ImageJ2-rc14). For quantification of CENP-C signal at centromeres, undeconvoluted 2D maximum intensity projections were saved as 8-bit TIFF images. Each individual nucleus was determined using Hoechst staining, then colocalization of CENP-C signal with GFP-CENP-A or CREST signal was calculated using JACoP 2.1.1 plugin (Bolte and Cordelières, 2006).

ECM Image Acquisition

Specimen Preparation

The reconstituted nucleosomes were prepared in a low ionic strength buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, and 10 mM NaCl) and diluted in the same buffer to a concentration of 150 mg/ml of DNA. Three microliters of the specimen were deposited on a holey carbon film (C-flat 2-2-2), rendered hydrophilic by a 20 s glow discharge in air, and flash frozen in liquid ethane using an automated plunger (Vitrobot, FEI) with controlled blotting time (1 s), blotting force (5), humidity (97%), and temperature (4°C). The particles were imaged using a cryo-transmission electron microscope (Polara, FEI) equipped with a field emission gun operating at 100 kV. Images were recorded under low-dose condition (total dose of 20 e⁻/Å²) on a 4096 $\times$ 4096 CCD camera (Eagle FEI) at a magnification of 59,000 $\times$ resulting in a pixel size on the specimen of 0.187 nm.

Image Processing

Nucleosomal particles were selected manually using the Boxer application in the EMAN2 software package (Ludtke et al., 1999). The contrast transfer function (CTF) of the microscope was determined for each micrograph using the CTFFIND3 program (Mindell and Grigorieff, 2003). CTF correction and further image analysis was performed within the RELION software package (Scheres, 2012). The molecular images of both data sets representing conventional nucleosomes and those with incorporated CENP-A were subjected to reference-free 2D classification to remove images containing contamination or damaged particles. An initial 3D model was reconstructed from the 2D class-average images by the angular reconstitution method (Van Heel, 1987) and further refined using maximum-likelihood based methods. 3D classification was carried out to identify structural variations within the image data set. There were four or five most populated classes that were selected for each of the samples. Illus-

trations were prepared using the Chimera visualization software (Pettersen et al., 2004).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.023>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.D. conceived and supervised the project. Y.R., K.O., M.N., L.R., M.S., S.H.S., I.N.L., R.B., E.F., G.P., H.T., J.B., T.G., and K.P. conducted the experiments. T.G., D.S., K.P., J.B., H.K., P.S., D.A., A.H., and S.D. designed the experiments and analyzed the data. S.D., A.H., P.S., and K.P. wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by institutional funds from the Université de Strasbourg (UDS), the Université de Grenoble Alpes (UGA), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) (Plan Cancer), and by grants from: the Institut National du Cancer (INCA) (INCa_4496, INCa_4454, and INCa_PLBIO15-245), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) ("VariZome", "CHROMCOMP", "CHROME", and "CENP-A"), the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (DEP20131128521), the Université de Strasbourg Institut d'Etudes Avancées (USIAS-2015-42) (A.H.), the Association pour la Recherche sur le Cancer, and La Ligue Nationale contre le Cancer (Équipe labellisée à A.H.). This work also benefitted from the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INSB-05-01, Instruct as part of the European Strategy Forum on Research Infrastructures (ESFRI), from the High Performance Computing Center of the University of Strasbourg funded by the Equipex Equip@Meso project, and from the Labex INRT. K.P. was supported by a fellowship from La Ligue Nationale contre le Cancer and an ATIP-AVENIR starting grant. This work was supported in part by JSPS KAKENHI Grant Number JP25116002 to H.K.O. Tonchev, E. Bellotti, and A.S. Ribba are acknowledged for help in the initial stage of this work. The technical assistance of E. Ben Simon is also acknowledged.

Received: December 11, 2015

Revised: April 3, 2016

Accepted: June 15, 2016

Published: August 18, 2016

REFERENCES

- Angelov, D., Lenouvel, F., Hans, F., Müller, C.W., Bouvet, P., Bednar, J., Moudrianakis, E.N., Cadet, J., and Dimitrov, S. (2004). The histone octamer is invisible when NF-kappaB binds to the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 279, 42374–42382.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Grigoryev, S.A., Carruthers, L.M., Hansen, J.C., Koster, A.J., and Woodcock, C.L. (1998). Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14173–14178.
- Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.
- Boulard, M., Bouvet, P., Kundu, T.K., and Dimitrov, S. (2007). Histone variant nucleosomes: structure, function and implication in disease. *Subcell. Biochem.* 41, 71–89.
- Buscaino, A., Allshire, R., and Pidoux, A. (2010). Building centromeres: home sweet home or a nomadic existence? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 118–126.
- Drané, P., Ouarrhni, K., Depaux, A., Shuaib, M., and Hamiche, A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* 24, 1253–1265.

- Earnshaw, W.C., and Migeon, B.R. (1985). Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable isodicentric chromosome. *Chromosoma* 92, 290–296.
- Falk, S.J., Guo, L.Y., Sekulic, N., Smoak, E.M., Mani, T., Logsdon, G.A., Gupta, K., Jansen, L.E., Van Duyne, G.D., Vinogradov, S.A., et al. (2015). Chromosomes. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere. *Science* 348, 699–703.
- Foltz, D.R., Jansen, L.E., Black, B.E., Bailey, A.O., Yates, J.R., 3rd, and Cleveland, D.W. (2006). The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex. *Nat. Cell Biol.* 8, 458–469.
- Goutte-Gattat, D., Shuaib, M., Ouararhni, K., Gautier, T., Skoufias, D.A., Hamiche, A., and Dimitrov, S. (2013). Phosphorylation of the CENP-A amino-terminus in mitotic centromeric chromatin is required for kinetochore function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 8579–8584.
- Guse, A., Carroll, C.W., Moree, B., Fuller, C.J., and Straight, A.F. (2011). In vitro centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates. *Nature* 477, 354–358.
- Hamiche, A., Schultz, P., Ramakrishnan, V., Oudet, P., and Prunell, A. (1996). Linker histone-dependent DNA structure in linear mononucleosomes. *J. Mol. Biol.* 257, 30–42.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Zhang, H., Purwar, J., Carrell, D.T., and Cairns, B.R. (2009). Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460, 473–478.
- Kato, H., Jiang, J., Zhou, B.R., Rozendaal, M., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T.S., Straight, A.F., and Bai, Y. (2013). A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. *Science* 340, 1110–1113.
- Kingston, I.J., Yung, J.S., and Singleton, M.R. (2011). Biophysical characterization of the centromere-specific nucleosome from budding yeast. *J. Biol. Chem.* 286, 4021–4026.
- Ludtke, S.J., Baldwin, P.R., and Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.* 128, 82–97.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Makarov, V.L., Dimitrov, S.I., and Petrov, P.T. (1983). Salt-induced conformational transitions in chromatin. A flow linear dichroism study. *Eur. J. Biochem.* 133, 491–497.
- Menoni, H., Gasparutto, D., Hamiche, A., Cadet, J., Dimitrov, S., Bouvet, P., and Angelov, D. (2007). ATP-dependent chromatin remodeling is required for base excision repair in conventional but not in variant H2A.Bbd nucleosomes. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5949–5956.
- Menoni, H., Shukla, M.S., Gerson, V., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2012). Base excision repair of 8-oxoG in dinucleosomes. *Nucleic Acids Res.* 40, 692–700.
- Mindell, J.A., and Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 142, 334–347.
- Mizuguchi, G., Xiao, H., Wisniewski, J., Smith, M.M., and Wu, C. (2007). Nonhistone Scm3 and histones CenH3-H4 assemble the core of centromere-specific nucleosomes. *Cell* 129, 1153–1164.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Wener, M.H., Andrews, B.S., and Margolis, R.L. (1987). A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones. *J. Cell Biol.* 104, 805–815.
- Palmer, D.K., O'Day, K., and Margolis, R.L. (1990). The centromere specific histone CENP-A is selectively retained in discrete foci in mammalian sperm nuclei. *Chromosoma* 100, 32–36.
- Perpelescu, M., and Fukagawa, T. (2011). The ABCs of CENPs. *Chromosoma* 120, 425–446.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- Raychaudhuri, N., Dubruielle, R., Orsi, G.A., Bagheri, H.C., Loppin, B., and Lehner, C.F. (2012). Transgenerational propagation and quantitative maintenance of paternal centromeres depends on Cid/Cenp-A presence in *Drosophila* sperm. *PLoS Biol.* 10, e1001434.
- Régner, V., Vagnarelli, P., Fukagawa, T., Zerjal, T., Burns, E., Trouche, D., Earnshaw, W., and Brown, W. (2005). CENP-A is required for accurate chromosome segregation and sustained kinetochore association of BubR1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3967–3981.
- Scheres, S.H. (2012). RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.* 180, 519–530.
- Shuaib, M., Ouararhni, K., Dimitrov, S., and Hamiche, A. (2010). HJURP binds CENP-A via a highly conserved N-terminal domain and mediates its deposition at centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 1349–1354.
- Shukla, M.S., Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Richard, J.L., Montel, F., Hamiche, A., Travers, A., Faivre-Moskalenko, C., Bednar, J., Hayes, J.J., et al. (2011). The docking domain of histone H2A is required for H1 binding and RSC-mediated nucleosome remodeling. *Nucleic Acids Res.* 39, 2559–2570.
- Song, F., Chen, P., Sun, D., Wang, M., Dong, L., Liang, D., Xu, R.M., Zhu, P., and Li, G. (2014). Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units. *Science* 344, 376–380.
- Swift, S., Lorens, J., Achacoso, P., and Nolan, G.P. (2001). Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr. Protoc. Immunol.* <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.im1017cs31>.
- Syed, S.H., Goutte-Gattat, D., Becker, N., Meyer, S., Shukla, M.S., Hayes, J.J., Everaers, R., Angelov, D., Bednar, J., and Dimitrov, S. (2010). Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 9620–9625.
- Tachiwana, H., Kagawa, W., Shiga, T., Osakabe, A., Miya, Y., Saito, K., Hayashi-Takanaka, Y., Oda, T., Sato, M., Park, S.Y., et al. (2011). Crystal structure of the human centromeric nucleosome containing CENP-A. *Nature* 476, 232–235.
- Tanaka, Y., Tawaramoto-Sasanuma, M., Kawaguchi, S., Ohta, T., Yoda, K., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S. (2004). Expression and purification of recombinant human histones. *Methods* 33, 3–11.
- Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403–427.
- Van Heel, M. (1987). Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy* 21, 111–123.
- Van Holde, K.E., Allen, J.R., Tatchell, K., Weischat, W.O., and Lohr, D. (1980). DNA-histone interactions in nucleosomes. *Biophys. J.* 32, 271–282.
- Zhou, B.R., Feng, H., Kato, H., Dai, L., Yang, Y., Zhou, Y., and Bai, Y. (2013). Structural insights into the histone H1-nucleosome complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 19390–19395.
- Zhou, B.R., Jiang, J., Feng, H., Ghirlando, R., Xiao, T.S., and Bai, Y. (2015). Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones. *Mol. Cell* 59, 628–638.

Supplemental Information

The Flexible Ends of CENP-A Nucleosome Are Required for Mitotic Fidelity

Yohan Roulland, Khalid Ouarrhmi, Mladen Naidenov, Lorrie Ramos, Muhammad Shuaib, Sajad Hussain Syed, Imtiaz Nizar Lone, Ramachandran Boopathi, Emeline Fontaine, Gabor Papai, Hiroaki Tachiwana, Thierry Gautier, Dimitrios Skoufias, Kiran Padmanabhan, Jan Bednar, Hitoshi Kurumizaka, Patrick Schultz, Dimitar Angelov, Ali Hamiche, and Stefan Dimitrov

Figure S1 (Related to Figure 1C, Figure 2 and Figure 3)

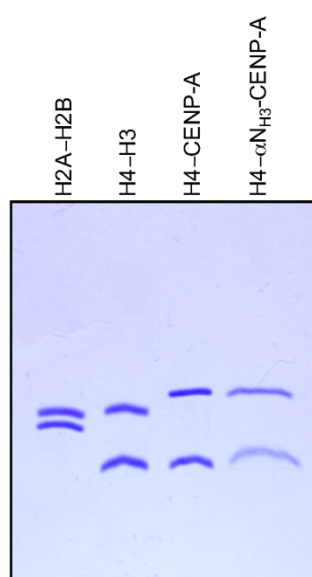
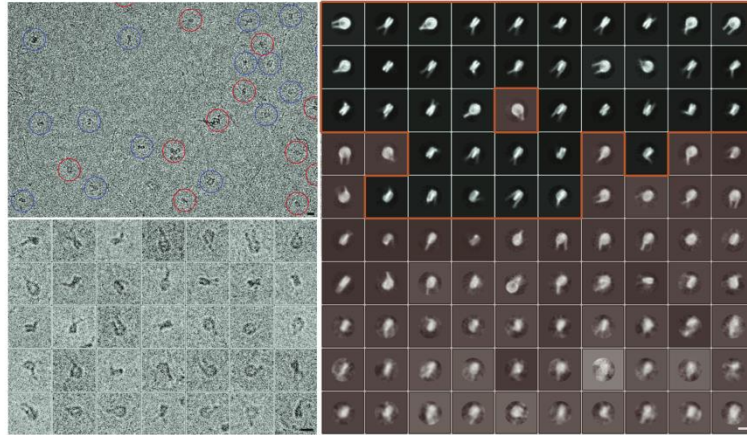


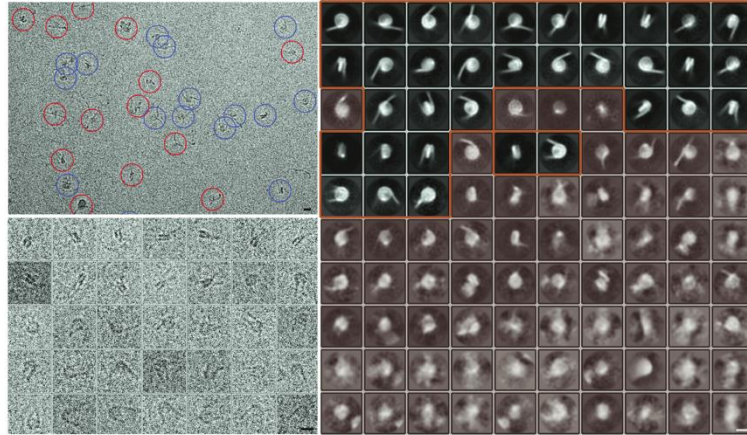
Figure S1. 18% SDS PAGE of the indicated purified recombinant histones used for nucleosome reconstitution.

Figure S2 (Related to Figure 1C)

A H3 nucleosomes



B CENP-A nucleosomes



C α NH₃-CENP-A nucleosomes

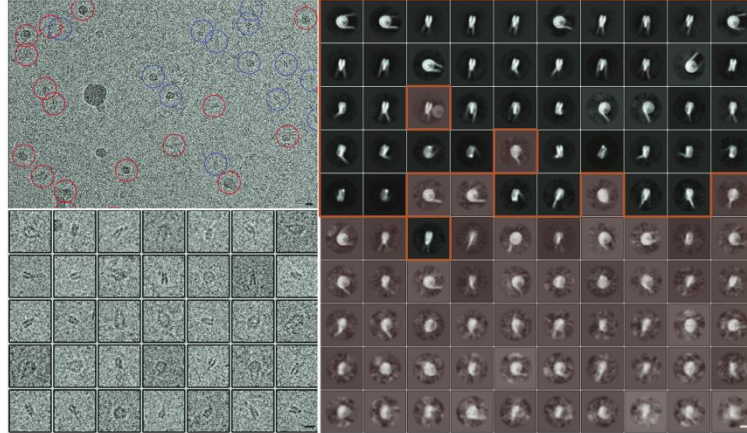


Figure S2. Representative micrographs, selected particles and class averages of conventional H3 (**A**), CENP-A (**B**), and α NH₃-CENP-A (**C**) reconstituted centrally positioned nucleosomes. Each panel shows a representative original image in which ultimately selected and rejected particles are shown in blue and red, respectively (upper left); a gallery of selected nucleosomal particles (lower left); and a clustering into 100 classes ordered according to their occupancy (right). The classes highlighted in red were discarded because they correspond to poorly defined nucleosomal particles. In each panel the bar represents 10nm.

Figure S3 (Related to Figure 1C)

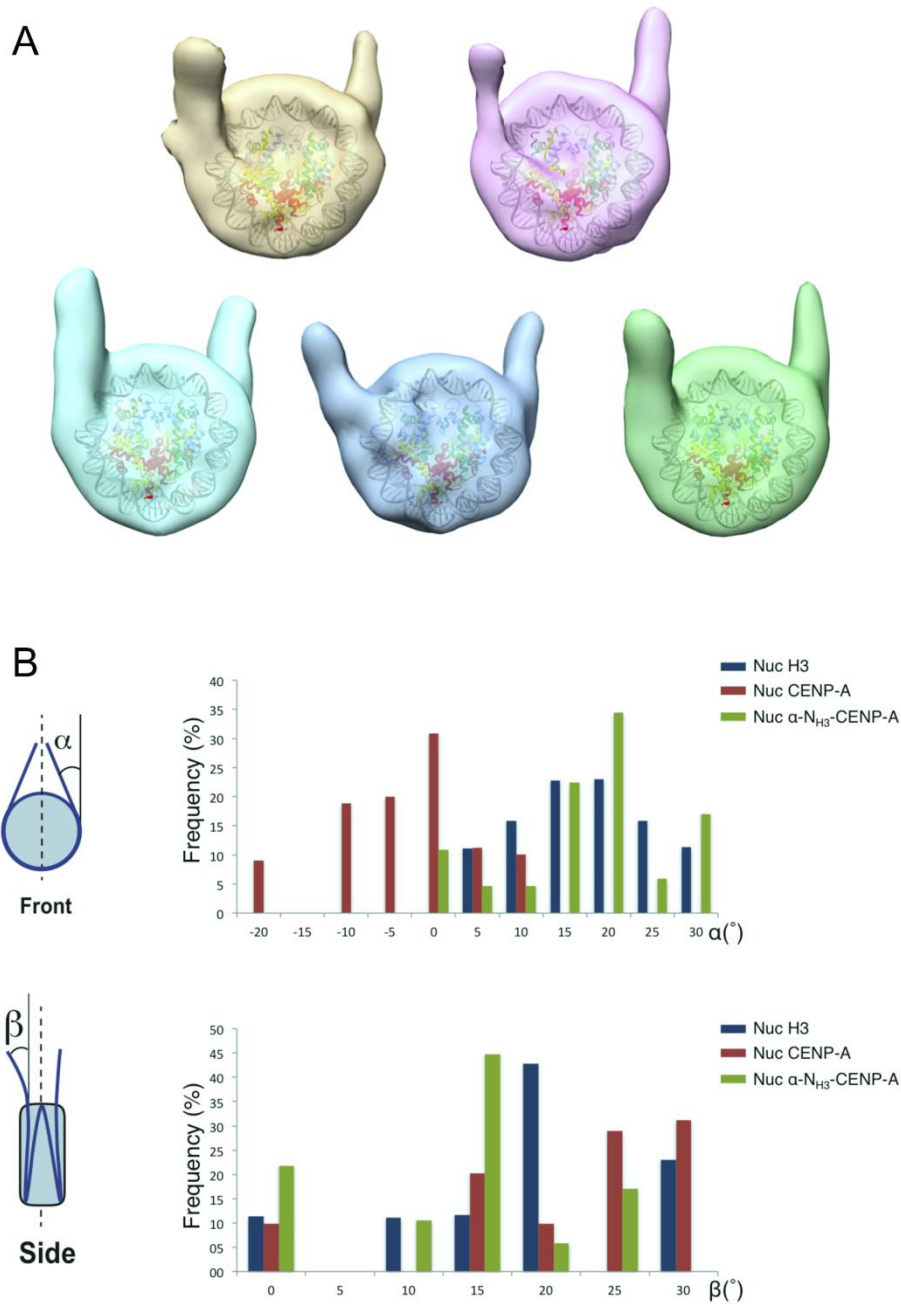


Figure S3. (A) Surface representation of the five 3-D classes obtained upon analysis of the CENP-A nucleosomes. The atomic structure of the NCP was positioned within the E-CM maps. **(B)** Analysis of the angles between each linker arm and the dyad axis in the front and the side view of the five 3-D classes obtained for the H3, the CENP-A and the α N_{H3}-CENP-A nucleosome dataset.

Figure S4 (Related to Figure 2 and 3)

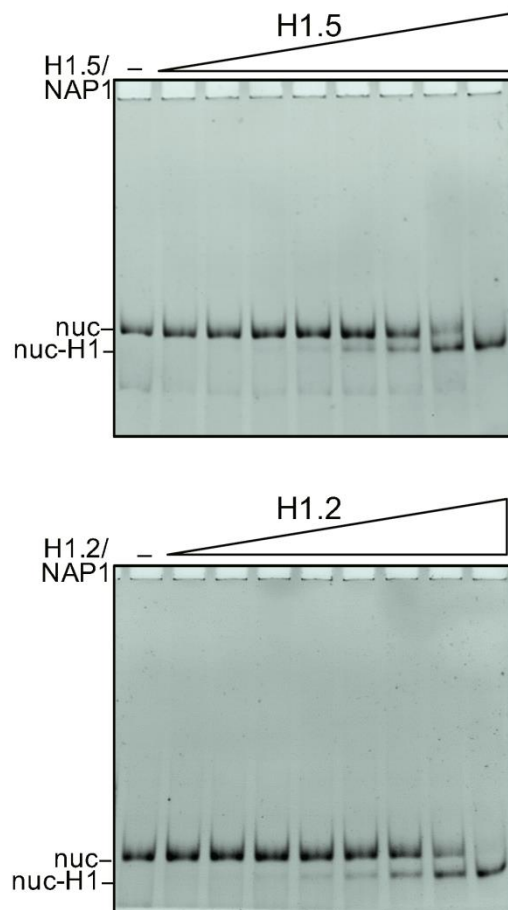


Figure S4. Linker histones H1.2 and H1.5 bind with very similar efficiency to the nucleosome. The same amount of NAP-1 and either linker histone H1.2 or H1.5 were mixed at 2:1 molar ratio and incubated at 30°C for 30 minutes (for details see Syed et al. 2010, PNAS, 107, 9620-9625). Centrally positioned nucleosomes, reconstituted with conventional H3 octamers and 207 bp 601 DNA, were incubated with increasing amount (with increasing step of 1.5 fold) of either NAP-1-H1.5 (upper panel) or with NAP-1-H1.2 (lower panel) complexes and run on a native PAGE. The position of the nucleosomes (nuc) and the H1-bound nucleosomes (nuc-H1) are indicated.

Figure S5 (Related to Figure 6)

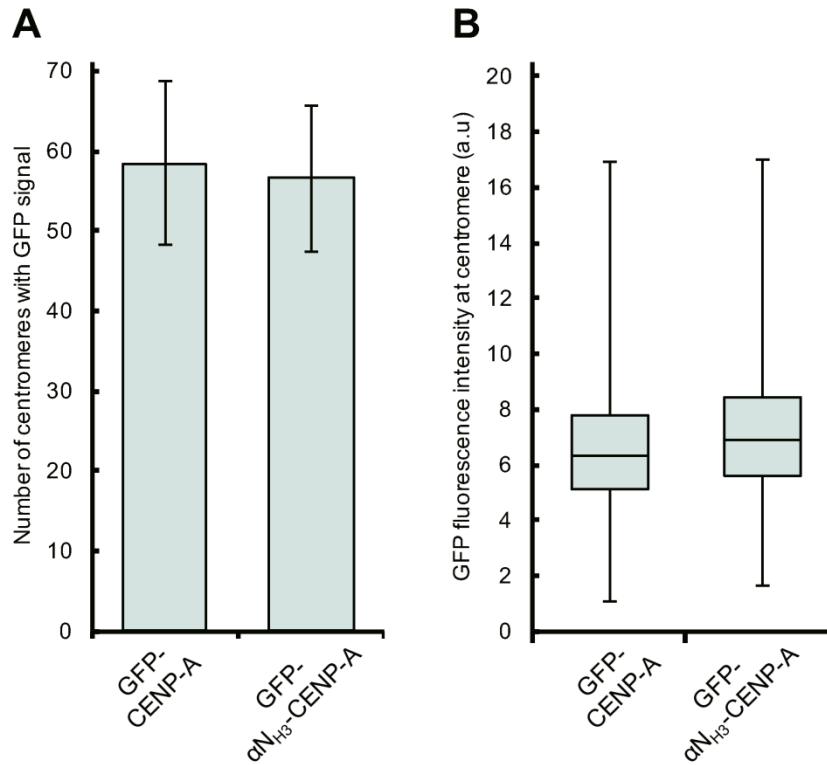


Figure S5. Identical incorporation of GFP-CENP-A and GFP- α N_{H3}-CENP-A at the centromeres. **(A)** Numbers of GFP-stained centromeres for stable MEFs expressing either GFP-CENP-A or GFP- α N_{H3}-CENP-A. In each case more than 100 cells were used for the quantification. **(B)** Box plot showing the centromeric GFP-fluorescence intensities of stable MEFs expressing either GFP-CENP-A or GFP- α N_{H3}-CENP-A. Values represent normalized intensity. In each case more than 100 cells were used for the quantification.

Figure S6 (Related to Figure 7A)

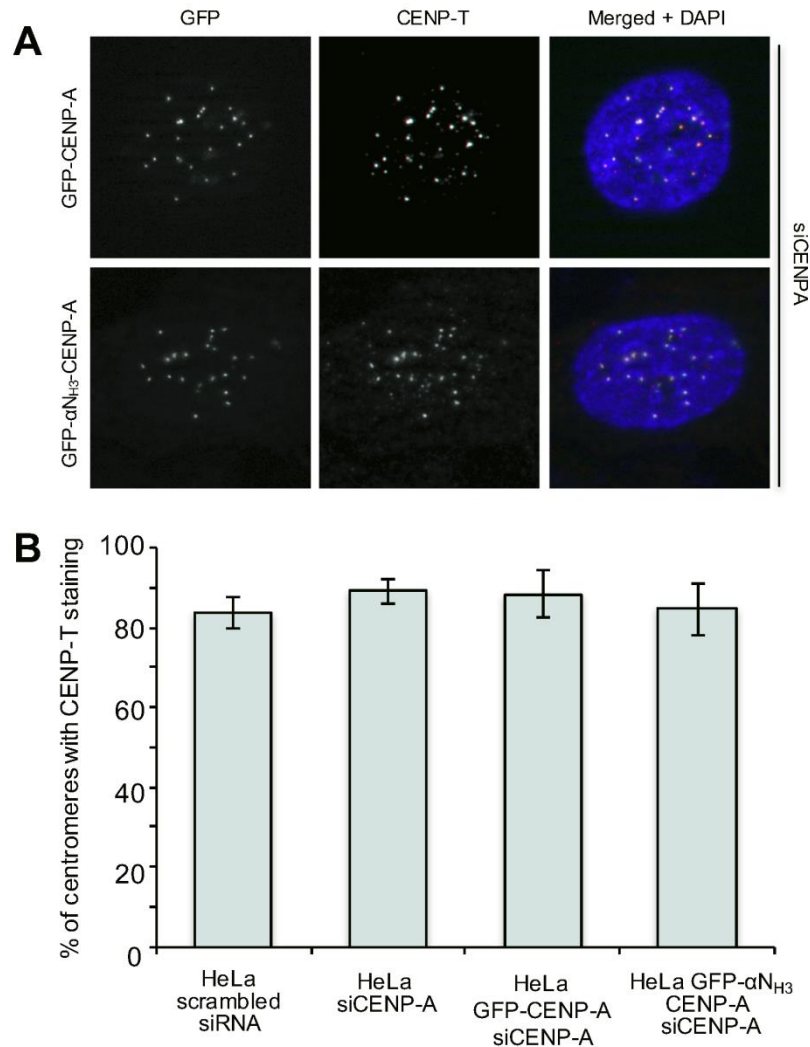


Figure S6. (A) Cell cycle visualization, after endogenous CENP-A depletion by siRNA treatment, of HeLa cells stably expressing either siRNA-resistant of full-length GFP-CENP-A (first row) or the swapped the α N_{H3}-CENP-A mutant. GFP fluorescence was used to visualize CENP-A in GFP-fusion expressing cells. A specific anti-CENP-T antibody was used for CENP-T visualization; blue, DNA. **(B)** Quantification of the percentage of centromeres showing CENP-T staining in the indicated HeLa cell lines after treatment with either scrambled siRNA or with siRNA against CENP-A.

Figure S7 (Related to Figure 4C)

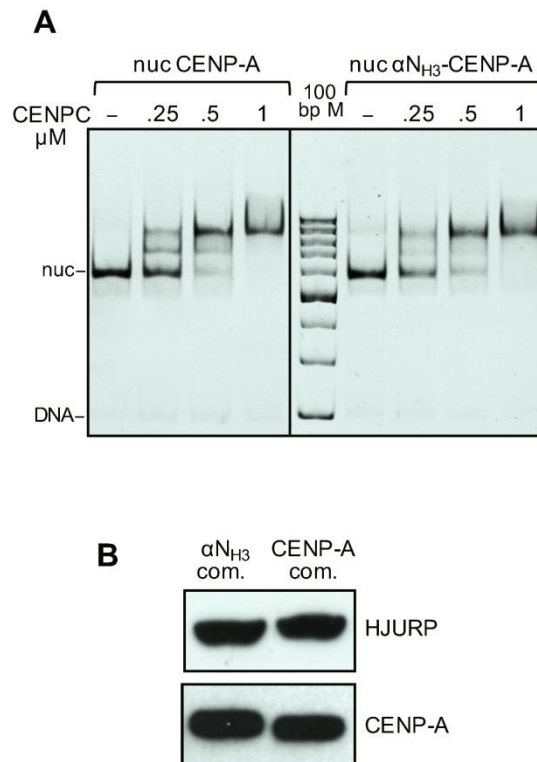


Figure S7. (A) EMSA of CENP-C central domain (amino acids 426-537) binding to CENP-A nucleosome (left, nuc CENP-A) and α N_{H3}-CENP-A nucleosomes (right, nuc α N_{H3}-CENP-A). Both samples were incubated with the indicated increasing amount of CENP-C central domain (Kato et al. Science, 340:1110-3, 2013) and analyzed by PAGE. **(B)** Western blot detection of HJURP (top) and CENP-A (bottom) associated with either e- α N_{H3}-CENP-A mutant or WT e-CENP-A nuclear soluble deposition complexes.

Table S1 (Related to Figure 1C)

Table S1:
Dataset statistics

	Extracted particles	Selected particles	Particles in Class1	Particles in Class2	Particles in Class3	Particles in Class4	Particles in Class5	Average resolution
H3- nucleosome	94.264	29.222	5.479	5.342	5.672	7.654	5.071	17,4 Å
CENP-A	110.333	25.012	5.049	4.945	4.501	5.596	4.921	20,8 Å
aNH3-CENP- A	529.368	153.576	52.415	18.008	14.241	35.479	33.433	15,2 Å

Table S2 (Related to Figure 4D)

Protein name	Reference	WT CENP-A complex (# of peptides)	α N _{H3} -CENP-A complex (# of peptides)
CENPA	P49450	6	6
macro-H2A.1	O75367	10	10
H2B	P33778	6	6
H2A	Q96QV6	4	4
H4	P62805	5	5
H1.2	P16403	0	8
H1.1	Q02539	0	7
CENP-B	P07199	8	2
CENP-T	Q96BT3	7	7
CENP-N	Q96H22	6	6
CENP-I	Q92674	4	4
CENP-L	Q8N0S6	3	3
CENP-H	Q9H3R5	3	3
CENP-C	Q03188	10	1
HJURP	Q8NCD3	9	9
RSF-1	Q96T23	9	3
NPM1	P06748-2	7	7
SSRP1	Q08945	20	4
SPT16	Q9Y5B9	35	5
KU70	P12956	2	15
KU80	P13010	2	20
CHD-2	O14647	2	2
CHD-4	Q14839	5	10
CHD-3	Q12873	2	2
PARP-1	P09874	25	25

Table S2. Proteins identified in nucleosomal complexes of WT CENP-A and α N_{H3}-CENP-A mutant by mass spectrometry. The proteins, which level of association with the nucleosome particles was altered, are indicated in red.

RÉSUMÉ:

Durant ces dernières décennies, la fertilité masculine est en constante diminution à l'échelle mondiale. Même si les facteurs environnementaux ont une part de responsabilité indéniable, il n'en reste pas moins que les altérations génétiques mais également épigénétiques semblent aussi largement impliquées. La compréhension des mécanismes épigénétiques qui régulent la fertilité masculine est récente mais essentielle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse s'est focalisé sur l'étude du rôle du variant d'histone H3.3 dans la spermatogenèse. H3.3 possède la capacité de remplacer l'histone canonique H3 dans la chromatine modifiant ainsi les propriétés épigénétiques de cette dernière. H3.3 est nécessaire à la spermatogenèse mais son rôle reste à élucider. Grâce à plusieurs modèles murins, mes travaux de thèse ont montré que la forme H3.3B est essentielle à la reproduction masculine notamment pour la transition méiose/post-méiose. Lors de cette transition, on observe une forte régulation des piARN, des rétrotransposons et des chromosomes sexuels. Nos expériences révèlent pour la première fois que la perte de H3.3B provoque une chute de l'expression des piARN. À l'inverse, l'absence de H3.3B est aussi associée à une augmentation de l'expression de l'ensemble des gènes des chromosomes sexuels comme des rétrotransposons RLTR10B et RLTR10B2. Ces changements d'expression se traduisent par une spermatogenèse altérée et une infertilité. Par des expériences de ChIP-seq, nous avons observé que H3.3 est fortement enrichie sur les piRNA, les rétrotransposons RLTR10B et RLTR10B2 et l'ensemble des chromosomes sexuels. Toutes ces expériences ont permis de mieux caractériser la fonction régulatrice de l'histone H3.3B au cours de la spermatogenèse. En particulier, elles démontrent que H3.3B, en fonction de sa localisation sur la chromatine, intervient dans la régulation positive ou négative de l'expression de régions chromatinienne définies. Ces résultats montrent l'importance des contrôles épigénétiques au cours de la spermatogenèse et ouvrent de nouvelles pistes dans la compréhension des causes d'infertilité masculine.

ABSTRACT:

In last decades, male fertility has been steadily declining worldwide. Even if environmental factors have an undeniable responsibility, the fact remains that both genetic and epigenetic alterations also seem to be widely implicated. The understanding of the epigenetic mechanisms that regulate male fertility is recent but essential to develop a new therapeutic approaches. In this context, the objective of my thesis work focused on the study of the role of histone variant H3.3 in spermatogenesis. H3.3 has the ability to replace the H3 canonical histone in chromatin thus modifying the epigenetic properties of chromatin. H3.3 is necessary for spermatogenesis but its role remains unclear. Used to several mouse models, my thesis work has shown that the H3.3B form is essential for male reproduction and especially for the meiosis/post-meiosis transition. During this transition, there is a strong regulation of piRNAs, retrotransposons and sex chromosomes. Our experiments reveal at the first time that the loss of H3.3B resulted in down-regulation of the expression of piRNA. In contrast, the absence of H3.3B is also associated with increased expression of all sex chromosom genes as well as of both RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons. These expression changes result in altered spermatogenesis and infertility. By ChIP-seq experiments, we observed that H3.3 is markedly enriched on the piRNA clusters, RLTR10B and RLTR10B2 retrotransposons and the whole sexual chromosomes. All these experiments allowed bettering characterizing the regulatory function of histone H3.3B during spermatogenesis. In particular, he demonstrates that H3.3B, depending on its chromatin localization, is involved in either up-regulation or down-regulation of expression of defined chromatin regions. These results show the importance of epigenetic controls during spermatogenesis and open new tracks for understanding the causes of male infertility.