

50376
1990
237

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

50376
1990
237

N° d'ordre : 599

THESE

présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

OPTION BIOCHIMIE

PAR

FREDERIC CHIRAT

**LES PROTEINES NUCLEAIRES BASIQUES
DE LA SPERMIOGENESE DU BELIER
*OVIS ARIES***

STRUCTURE PRIMAIRE , PHOSPHORYLATION



soutenu le 16 Novembre 1990 devant la Commission d'Examen

JURY

Président : Professeur J. MONTREUIL
Rapporteurs : Professeur Ph. CHEVAILLIER
Professeur A. VERBERT
Examineurs : Docteur B. RIBADEAU-DUMAS
Docteur P. SAUTIERE

A mes parents,

A mon épouse,

A mes frères,

A mes beaux-parents.

Nous remercions très vivement Messieurs les Professeurs Jean MONTREUIL, Philippe CHEVAILLIER, André VERBERT et Messieurs les Docteurs Bruno RIBADEAU-DUMAS et Pierre SAUTIERE de nous avoir fait l'honneur de juger nos travaux.

Ce travail a été réalisé sous la direction scientifique du Docteur P.SAUTIERE, Directeur de Recherche au CNRS, dans l'Unité de Recherche : Structure et Interaction des Protéines Associées au DNA des Eucaryotes et des Procaryotes (URA 409 CNRS - Directeur : Docteur P.SAUTIERE), au sein de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur J.VANLERENBERGHE).

Nous remercions vivement toutes les personnes, qui par leur participation à ce travail, nous ont permis de réaliser ce mémoire.

ABRÉVIATIONS

ADN	:	acide désoxyribonucléique
ADNc	:	ADN complémentaire
ADP	:	adénosine 5'-diphosphate
AMPc	:	adénosine 5'-monophosphate cyclique
ARNm	:	acide ribonucléique messenger
CLHP	:	chromatographie liquide haute performance
Da	:	Dalton
EDTA	:	acide éthylènediaminetétraacétique
GuCl	:	chlorhydrate de guanidine
NAD ⁺	:	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
pb	:	paire de bases (nucléique)
PCA	:	acide perchlorique
PTH	:	phénylthiohydantoïne
RNP	:	ribonucléoprotéine
SDS	:	dodécylsulfate de sodium
TFA	:	acide trifluoroacétique
TRIS	:	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane

Acides Aminés	Code à 3 lettres	Code à 1 lettre
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I</u>	
GÉNÉRALITÉS	4
I - 1 LA SPERMATOGENESE CHEZ LES MAMMIFERES	5
I - 1-1 Généralités	5
I - 1-2 Intérêt de l'étude des protéines nucléaires basiques	7
I - 2 ETUDE DES PROTEINES NUCLEAIRES BASIQUES ASSOCIEES A LA CHROMATINE DES DIFFERENTES CELLULES DE LA LIGNEE GERMINALE	10
I - 2-1 Les histones	10
I - 2-1-1 Les histones de type somatique	11
I - 2-1-2 Les variants somatiques d'his- tones fortement représentés dans le testicule	18
I - 2-1-3 Les variants d'histones spéci- fiques du testicule	24
I - 2-1-4 Rôles possibles des variants d'histones	34
I - 2-2 Les protéines spécifiques des spermatides	39
I - 2-2-1 Caractéristiques structurales des protéines de transition (TP)	40
I - 2-2-2 Structure et expression des gènes des protéines TP	49
I - 2-2-3 Rôle(s) biologique(s) éventuel(s) des protéines intermédiaires	51

I - 2-3	Les protéines spécifiques des spermatozoïdes : les protamines	53
I - 2-3-1	Caractéristiques structurales des protamines de type P1	53
I - 2-3-2	Caractéristiques structurales des protamines de type P2	54
I - 2-3-3	Modifications post-traductionnelles des protamines	60
I - 2-3-4	Structure du complexe nucléo-protamine	65
I - 2-3-5	Expression et régulation des gènes de protamines	72
I - 2-4	Cas particulier : la spermatogenèse humaine	76
I - 2-5	Mécanisme(s) possible(s) des différentes transitions protéiques	80

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS		82
II - 1	MATERIELS ET METHODES	84
II - 1-1	Préparation des protéines	84
II - 1-2	Réduction-alkylation des protéines	85
II - 1-3	Purification des protéines intermédiaires TP2 et 3	85
II - 1-3-1	Fractionnement des protéines PCA insolubles par chromatographie de gel filtration	85
II - 1-3-2	Purification par CLHP en échange d'ions	86
II - 1-4	Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide	86
II - 1-5	Coupures enzymatiques	88
II - 1-5-1	Coupure par l'endoprotéinase Lys-C	88
II - 1-5-2	Coupure par la pepsine	88
II - 1-5-3	Coupure par l'endoprotéinase Glu-C	89

II - 1-6	Fractionnement des peptides	89
II - 1-7	Composition en acides aminés des protéines et des peptides	89
II - 1-8	Dégradation récurrente d'Edman	90
II - 1-9	Etude des sites de phosphorylation	90
II - 1-9-1	Action de la phosphatase alcaline	90
II - 1-9-2	Transformation des résidus de phosphosérine en S-éthyl- cystéine	90
II - 2	RESULTATS ET DISCUSSION	92
II - 2-1	Etude de la protéine de transition TP1 de bélier	92
II - 2-1-1	Introduction	92
<u>PUBLICATION</u>		94
II - 2-1-2	Conclusion	134
II - 2-2	Etude des protéines intermédiaires TP2 et 3	135
II - 2-2-1	Purification des protéines TP2 et 3 par chromatographie de tamisage moléculaire	135
II - 2-2-2	Purification des protéines TP2 et 3 par CLHP d'échange d'ions	136
II - 2-2-3	Etude de la structure primaire de la protéine TP2 de bélier	142
II - 2-2-4	Etude de la structure primaire de la protéine 3 de bélier	150
II - 2-3	Etude de la phosphorylation de la prota- mine de bélier	161
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	168
	BIBLIOGRAPHIE	172

I N T R O D U C T I O N

Notre laboratoire s'est orienté, voici quelques années, vers l'étude des protéines nucléaires basiques associées à la chromatine durant la différenciation du spermatozoïde dans plusieurs espèces animales choisies parmi les mammifères, les poissons et les invertébrés marins. Nos travaux, qui font l'objet de cette thèse, ont porté sur l'étude des transitions nucléaires basiques qui surviennent au cours de la spermiogenèse du bélier *Ovis aries*.

Des travaux antérieurs, réalisés par notre laboratoire, avaient conduit à l'établissement de la structure primaire complète de la protamine isolée des spermatozoïdes de bélier (SAUTIERE *et al.*, 1984) et à la caractérisation de 4 protéines spécifiques des spermatides nommées P1,3,7 et T (DUPRESSOIR *et al.*, 1985).

Nous avons poursuivi ces travaux :

- en établissant la structure primaire complète de la protéine T et en identifiant ses sites de phosphorylation
- en élucidant partiellement la structure primaire des protéines P1 et 3
- en étudiant la phosphorylation de la protamine de bélier isolée du testicule.

Ces travaux ont été rendus possibles grâce à l'acquisition, par notre laboratoire, d'un équipement de microanalyse des protéines très performant (analyseur d'acides aminés, microséquenceur et CLHP). En outre, l'amélioration récente des techniques de spectrométrie de masse a permis l'identification de variants structuraux de la protéine T.

Nous nous devons cependant de souligner les difficultés rencontrées d'une part dans l'acquisition de testicules de béliers bons reproducteurs à la période favorable (octobre), et d'autre part dans l'obtention de quantités suffisantes de ces protéines présentes uniquement au cours de la différenciation des spermatides (stades 9 à 12), ce qui correspond à une période d'environ 4 jours dans la spermatogenèse du bélier.

CHAPITRE I

G É N É R A L I T É S

I - 1 LA SPERMATOGENÈSE CHEZ LES MAMMIFÈRES

I - 1-1 GENERALITES

La spermatogenèse est le processus biologique qui, à partir d'une cellule souche, la spermatogonie, conduit à une cellule hautement spécialisée, le spermatozoïde dont la fonction première est le transport du matériel génétique mâle depuis le testicule jusqu'à l'ovule qui sera fécondé. Ce processus qui se déroule dans les tubes séminifères des testicules, évolue selon une polarité centripète depuis la membrane basale jusqu'à la lumière de ces tubes. Les différents types cellulaires qui participent à ce processus complexe sont présentés dans la figure 1.

Tout d'abord, les spermatogonies qui sont les cellules souches immatures, vont subir une série de divisions mitotiques avant de donner les spermatocytes primaires. Ces cellules diploïdes entrent en méiose. La première division méiotique conduit aux spermatocytes secondaires qui, après la seconde division méiotique génèrent les spermatides : les cellules sont alors haploïdes. Le processus biologique qui conduit aux spermatozoïdes mûrs à partir des spermatides est la spermiogenèse.

Au cours de ce processus, les organites cellulaires sont affectés par diverses modifications. C'est ainsi que l'on observe :

- une condensation très forte du noyau cellulaire,
- la formation de l'acrosome à partir de l'appareil de Golgi,
- un regroupement des mitochondries pour former la pièce intermédiaire,

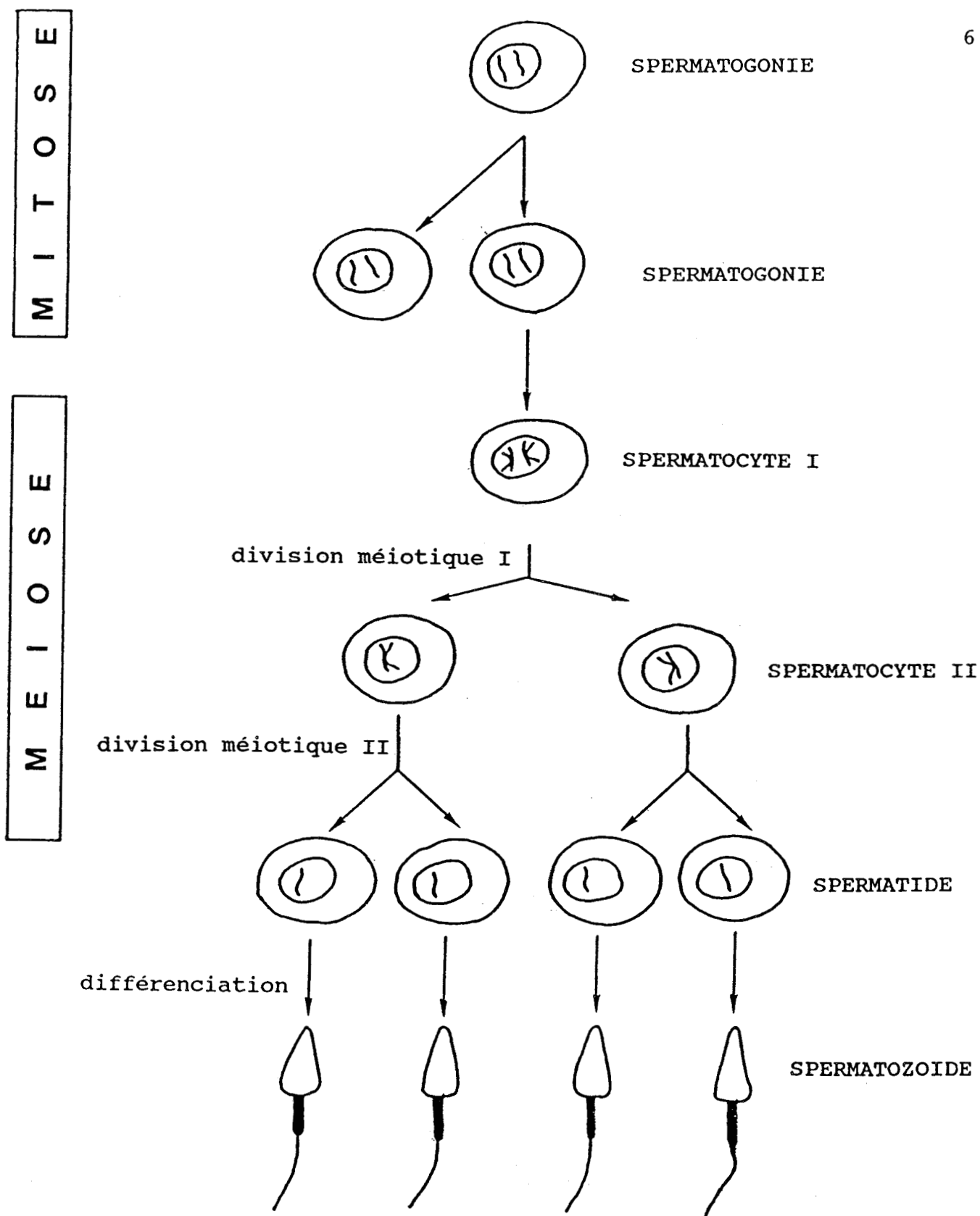


Figure 1: Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation du gamète mâle.

Les spermatogonies, après de multiples divisions mitotiques, génèrent les spermatocytes I qui entrent alors en méiose. À l'issue de la première division méiotique, ils sont transformés en spermatocytes II qui vont donner, après la seconde division méiotique, les spermatides haploïdes. En fin de spermiogenèse, les spermatides vont se transformer en spermatozoïdes.

- l'élimination d'une partie du cytoplasme sous la forme d'un corps résiduel,
- la division du centriole en deux éléments : le centriole proximal qui reste près du noyau et le centriole distal qui est à l'origine du flagelle.

Les spermatozoïdes quittent ensuite le testicule et passent dans l'épididyme où ils vont subir diverses maturations et acquérir la mobilité. Cependant, à l'issue du transit épидидymaire, les spermatozoïdes n'ont toujours pas de pouvoir fécondant. C'est au cours de leur migration dans les voies génitales femelles qu'ils acquièrent la capacité de pénétrer dans l'ovule : c'est le phénomène de capacitation.

La spermatogenèse apparaît donc très complexe car elle implique de très nombreux aspects tant morphologiques, physiologiques que biochimiques.

Notre laboratoire s'est orienté voici quelques années vers l'étude des différentes transitions protéiques observées durant la spermatogenèse.

I - 1-2 INTERET DE L'ETUDE DES PROTEINES NUCLEAIRES BASIQUES

Chez les mammifères, les poissons sélaciens (roussette) et les céphalopodes (seiche, calmar), la spermiogenèse est caractérisée par une double transition protéique. Dans le cadre de notre thèse, nous développerons uniquement les transitions protéiques qui prennent place durant la spermiogenèse des mammifères.

Ces transitions ont été corrélées à une condensation progressive de la chromatine qui passe d'un état diffus, transcriptionnellement actif à un état fortement condensé, transcriptionnellement inactif (Figure 2).

En effet, la première transition, qui concerne le remplacement des histones par les protéines intermédiaires, correspond à un premier degré de condensation de la chromatine. Celle-ci perd alors sa structure nucléosomale caractéristique et apparaît en microscopie électronique sous la forme de fibres lisses (LOIR et LANNEAU, 1978, 1984 ; LOIR *et al.*, 1985). La même observation a été faite chez le rat (PLATZ *et al.*, 1975 ; MEISTRICH *et al.*, 1981) et la souris (KIERSZENBAUM et TRES, 1975).

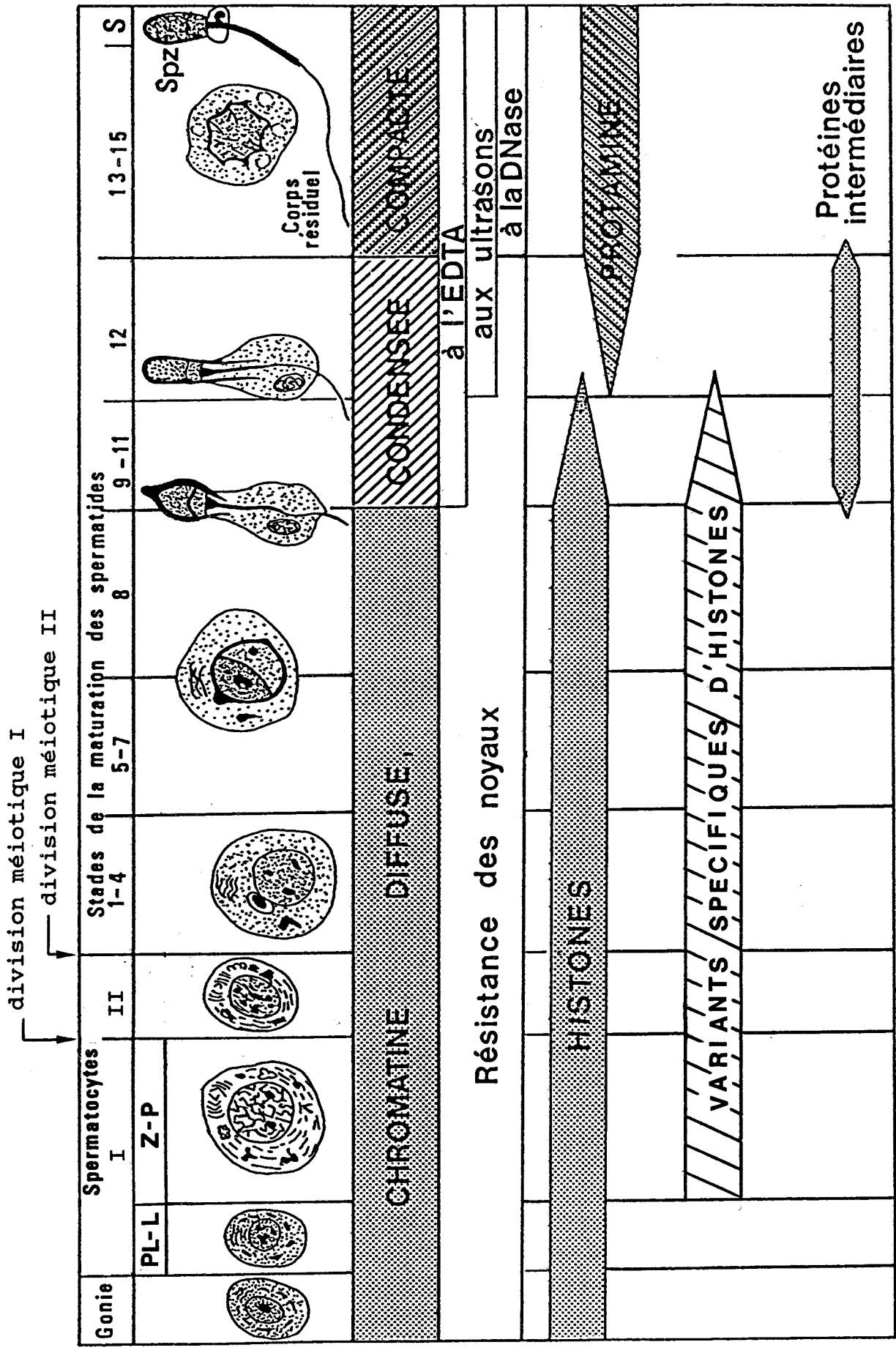
Différents résultats expérimentaux ont permis de corréler la disparition des fibres perlées à la disparition des histones et de montrer que l'apparition des fibres lisses, selon un gradient antéro-postérieur (LOIR *et al.*, 1985), était parallèle à l'apparition des protéines intermédiaires dans les noyaux.

La seconde transition correspond au remplacement des protéines intermédiaires par une ou deux protamine(s). Elle s'accompagne d'une nouvelle condensation de la chromatine qui apparaît alors sous la forme d'une masse compacte dans laquelle aucune structure particulière n'est visible (MEISTRICH *et al.*, 1976).

Comme cela est observé chez le bélier, la condensation progressive de la chromatine confère à celle-ci différentes propriétés de résistance vis-à-vis d'agents chimiques comme l'EDTA, d'agents physiques comme la sonication ou d'agents enzymatiques comme les DNases ou les protéases (Figure 2).

Figure 2: Les aspects morphologiques, ultrastructuraux et biochimiques de la spermatogenèse du bélier (Ovis aries). Les lettres PL, L, Z et P correspondent respectivement aux stades préleptotène, léptotène, zygotène et pachytène de la prophase de la première division méiotique permettant le passage des spermatocytes primaires aux spermatocytes secondaires.

A partir du stade 9 de la spermiogenèse, les cellules s'allongent progressivement jusqu'au stade des spermatozoïdes. Parallèlement à cette phase d'élongation, la chromatine diffuse passe à un état condensé. Le premier degré de condensation a été corrélé au remplacement des histones par les protéines intermédiaires. Puis la chromatine passe de l'état condensé à l'état compact. Le second degré de compaction a été, quant à lui, corrélé au remplacement des protéines intermédiaires par les protamines. Durant cette condensation progressive de la chromatine, les noyaux deviennent successivement résistants à l'EDTA, aux ultrasons et à la DNase.



Il apparaît donc tout à fait essentiel d'étudier d'une façon très approfondie les protéines nucléaires basiques qui interviennent durant la spermatogenèse afin de définir très précisément les différents mécanismes impliqués dans cette condensation chromatinienne.

Notre travail consiste à étudier plus particulièrement les caractéristiques structurales des protéines nucléaires basiques qui prennent place au cours de la spermiogenèse du bélier *Ovis aries*.

I - 2 ÉTUDE DES PROTÉINES NUCLÉAIRES BASIQUES ASSOCIÉES À LA CHROMATINE DES DIFFÉRENTES CELLULES DE LA LIGNÉE GERMINALE

I - 2-1 LES HISTONES

Depuis le stade des spermatogonies jusqu'au stade des spermatides jeunes, l'essentiel des protéines nucléaires basiques associées à l'ADN de ces cellules est constitué par les histones.

Malgré le haut degré de conservation des cinq classes d'histones, il est possible de distinguer, au cours de la spermatogenèse, au moins trois groupes différents d'histones :

- les histones de type somatique
- les variants d'histones fortement représentés dans le testicule
- les variants d'histones spécifiques du testicule.

I - 2-1-1 Les histones de type somatique

La découverte des histones remonte à une centaine d'années. Elles sont au nombre de cinq et ont une masse moléculaire comprise entre 11.000 Da pour l'histone H4 et 23.000 Da pour l'histone H1.

La séquence en acides aminés des cinq classes d'histones est connue et nous révèle que les histones H3 et H4 sont très conservées tandis que l'histone H1 montre une plus grande variabilité d'une espèce à l'autre et même d'un organe à l'autre chez une même espèce. Quant aux histones H2B et H2A, elles ont un degré de conservation intermédiaire.

En fonction du rapport Lys/Arg, les histones se répartissent en deux classes :






- les histones riches en lysine (H1 et H2B) dont le rapport Lys/Arg est supérieur à 2
- les histones riches en arginine (H2A, H3 et H4) dont le rapport Lys/Arg est compris entre 0,7 et 1,2.


La distribution des acides aminés basiques et hydrophobes détermine des domaines bien caractérisés dans les molécules d'histones dont la structure primaire apparaît dissymétrique (Tableau I).


Les histones entrent dans la constitution du nucléosome, structure élémentaire de la chromatine, qui est formé de l'association d'un octamère d'histones constitué de deux molécules de chacune des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4, d'une molécule d'histone H1 et d'un fragment d'ADN de 200 paires de bases environ. Cette structure est retrouvée dans toutes les cellules eucaryotes.

TABLEAU I

Caractéristiques structurales des 5 classes d'histones bovines (H1, H2A, H2B, H3, H4)

HISTONE	DOMAINES STRUCTURAUX	%Lys	%Arg	MASSE MOLECULAIRE	MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES
H4		11	14	11200	-Acetylation -Methylation
H3		10	13	15300	-Acetylation -Methylation -Phosphorylation
H2A		11	9	14000	-Acetylation -Ubiquitination -Phosphorylation
H2B		16	6	13800	-Acetylation -Phosphorylation -ADP-ribosylation -Ubiquitination
H1		29	1	23000	-Acetylation -ADP-ribosylation -Phosphorylation

 Domaine basique

 Domaine hydrophobe

Au sein du nucléosome, les interactions ADN-histones sont de nature électrostatique entre les charges positives des résidus de lysine et d'arginine et les charges négatives des groupes phosphate de l'ADN, tandis que les interactions histone-histone sont de nature hydrophobe (Figure 3). (EICKBUSH et MOUDRIANAKIS, 1978).

L'enroulement de la molécule d'ADN autour de l'octamère d'histones est présenté dans la figure 4-A (ALLAN *et al.*, 1980) ainsi que la localisation possible de l'histone H1 dans cet édifice macromoléculaire. Sa présence dans le nucléosome conduit à une fibre chromatinienne en zigzag (Figure 4-B) (WOODCOCK *et al.*, 1984). Ce modèle d'enroulement de l'ADN autour du nucléosome correspond au premier degré de condensation de l'ADN (Facteur de condensation ~ 6). La torsion de la fibre nucléosomale en un arrangement hélicoïdal d'un diamètre de 34 nm (Figure 5) conduit à un facteur de compaction voisin de 40. Le degré de compaction ultime, environ 10000, est atteint dans les chromosomes lors de la mitose. Les différentes étapes de cette condensation sont représentées dans la figure 6 (CHAHAL *et al.*, 1980).

Contrairement à ce que pourrait laisser penser l'exposé ci-dessus, le nucléosome n'est pas un complexe macromoléculaire inerte constitué une fois pour toute au début de la vie cellulaire. Les histones qui le constituent sont le siège de très nombreuses modifications post-traductionnelles (VAN HOLDE, 1988) (Tableau I). Ces modifications sont les suivantes:

- l'acétylation, au niveau du groupe α -aminé terminal des histones H1, H2A et H4 (irréversible) ou au niveau du groupe ϵ -aminé des résidus de lysine des histones H3, H4 et à un degré moindre des histones H2A et H2B.
- la phosphorylation au niveau du groupe hydroxyle des résidus de sérine des histones H2A, H2B, H3 et H1. Dans cette dernière, on observe également une phosphorylation de la thréonine.

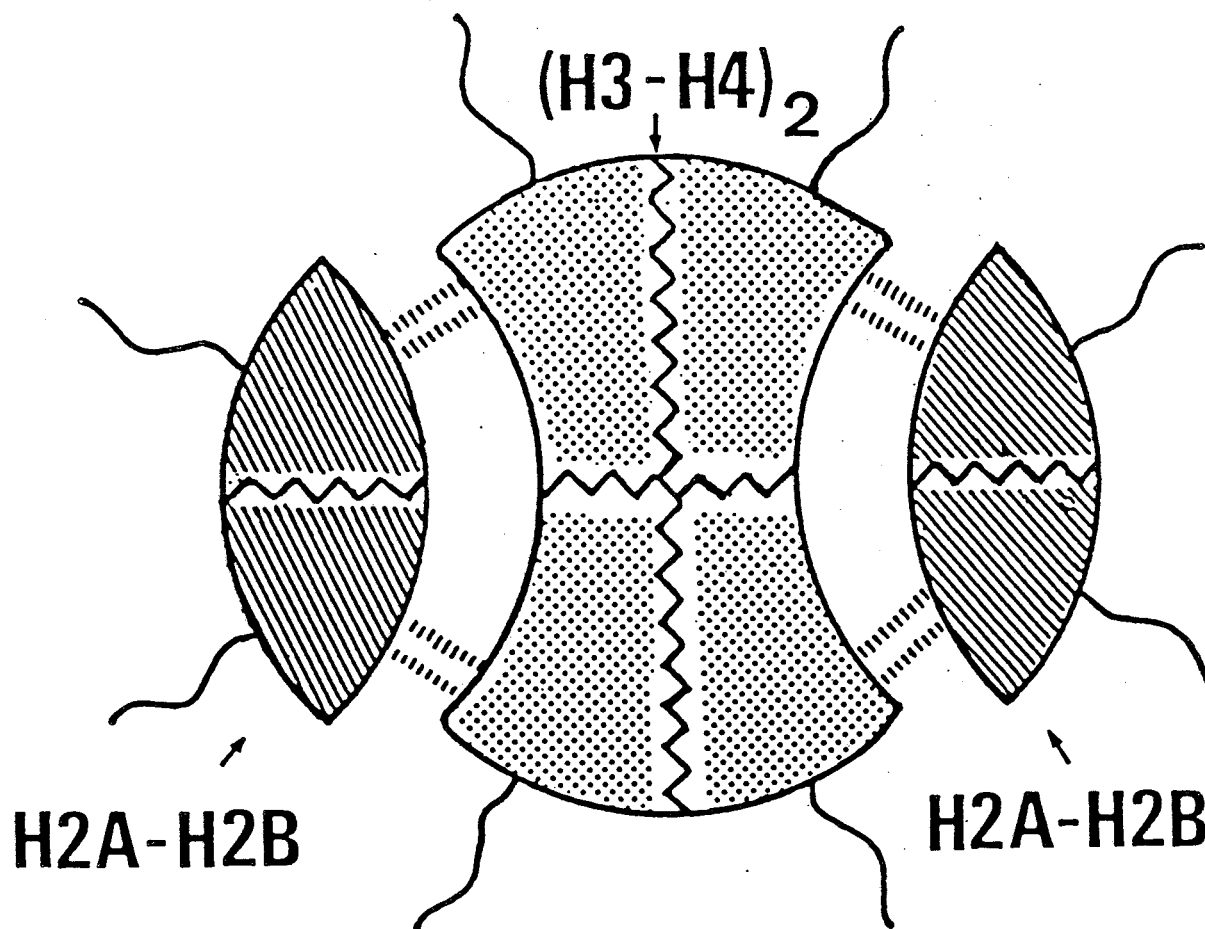
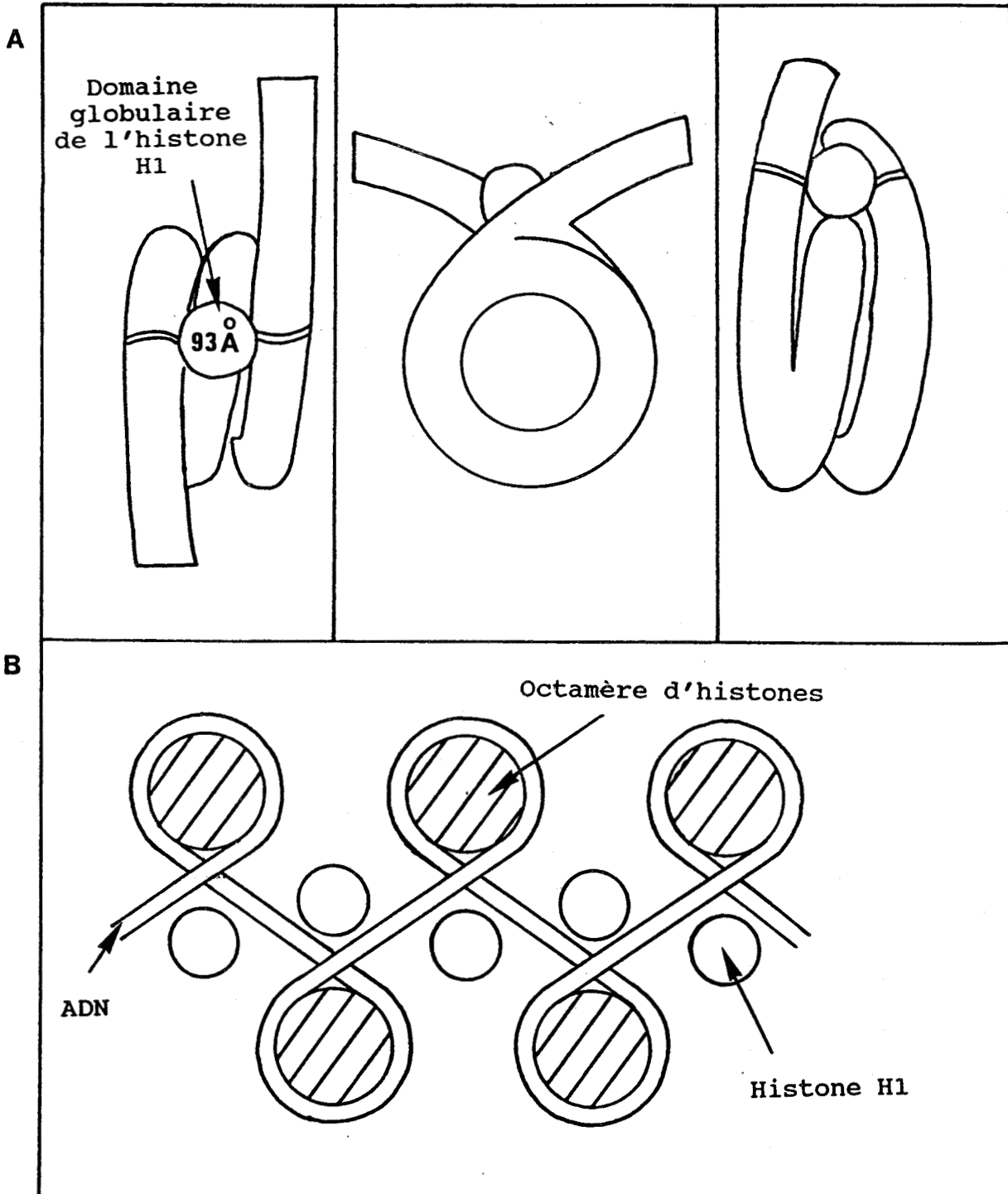


Figure 3: Représentation schématique des interactions histone-histone dans l'octamère d'histones composé du tétramère $(H3-H4)_2$ et de deux dimères $(H2A-H2B)$, selon EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (1978)

~~~~~ : interactions hydrophobes fortes

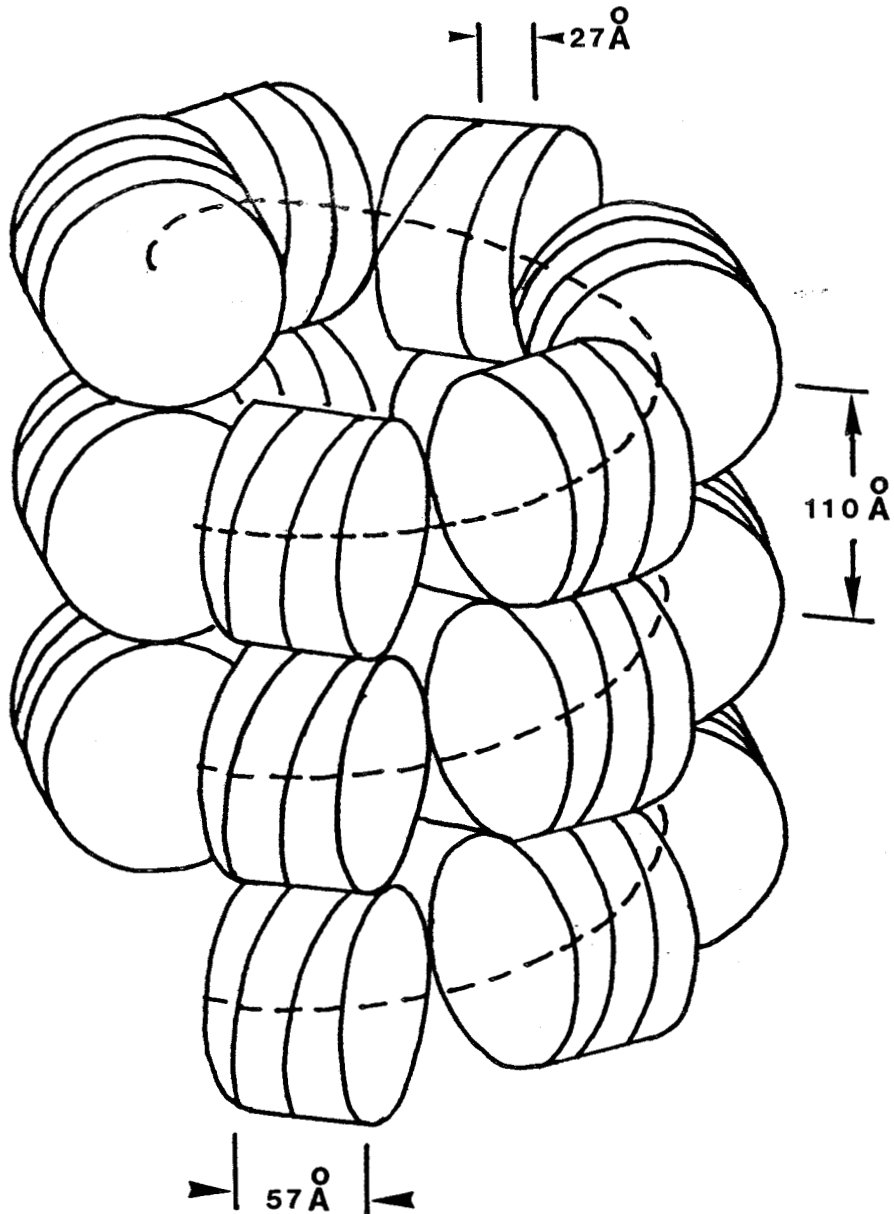
..... : liaisons hydrogène faibles





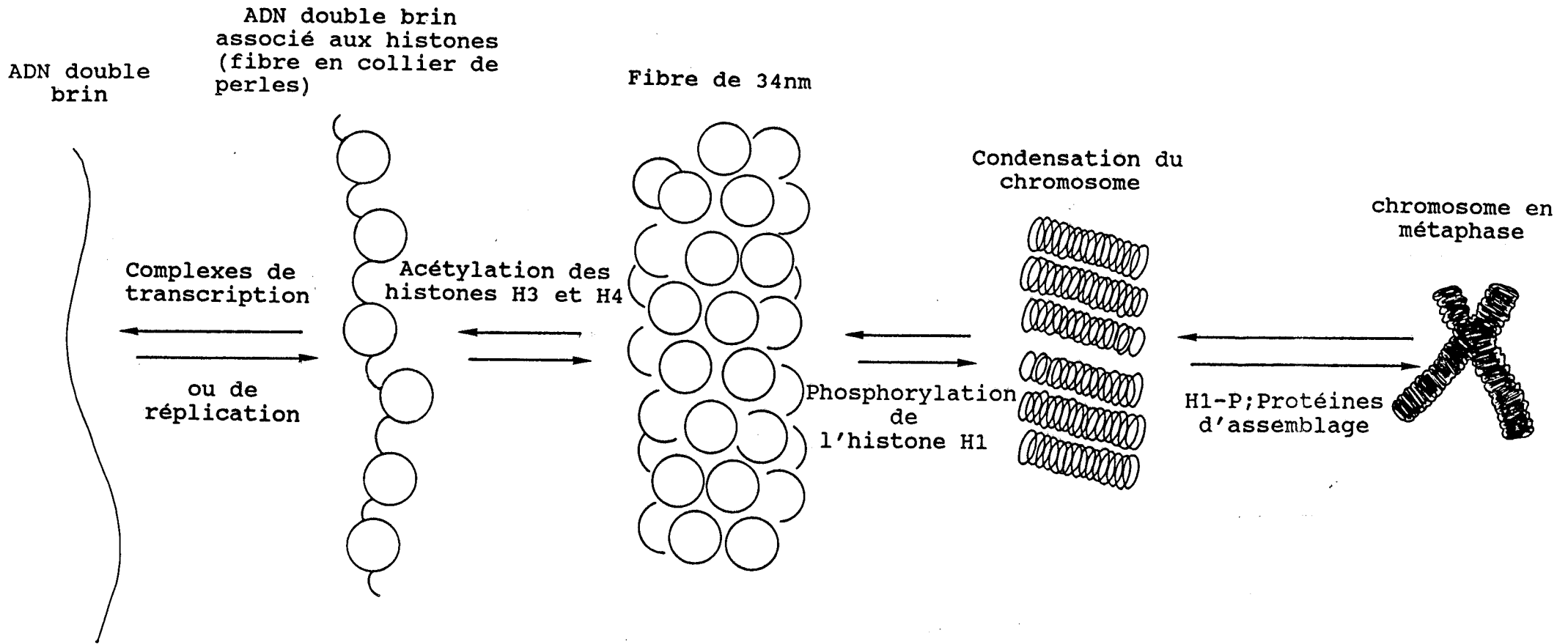
**Figure 4a:** Modèle proposé par ALLAN et al. en 1980 pour la localisation du domaine globulaire de l'histone H1 dans le chromatosome. L'histone H1 interagit par ses extrémités N- et C-terminales avec les fragments d'ADN "entrant" et "sortant" du nucléosome.

**b:** La présence de l'histone H1 conduit à une fibre chromatinienne en zigzag selon WOODCOCK et al. (1984)



**Figure 5:** Représentation schématique de la fibre de 34nm selon BUTLER en 1984.

Le solénoïde représente le mode d'arrangement le plus probable des nucléosomes dans la fibre. Les nucléosomes s'enroulent de façon hélicoïdale (6 nucléosomes par tour), avec un angle d'environ  $60^\circ$  entre les faces des nucléosomes adjacents.



**Figure 6:** Différents degrés de condensation de la chromatine qui passe d'un facteur de compaction égal à 1, pour l'ADN double brin, à un facteur de compaction égal à 10.000 dans le chromosome en métaphase. Les modifications post-traductionnelles des histones jouent un rôle important dans cette condensation chromatinienne (schéma selon CHAHAL et al. (1980))

- la méthylation, au niveau du groupe  $\epsilon$ -aminé des résidus de lysine des histones H3 et H4.
- l'ADP-ribosylation, au niveau du groupe  $\gamma$ -carboxylique des résidus d'acide glutamique des histones H1 et H2B ou au niveau du groupe  $\alpha$ -carboxylique du résidu de lysine en position C-terminale dans l'histone H1.
- l'ubiquitination qui a lieu sur le groupement  $\epsilon$ -aminé de la lysine 119 dans l'histone H2A et de la lysine 120 dans l'histone H2B.

Toutes ces modifications apparaissent à des moments privilégiés du cycle cellulaire. Même si la signification biologique exacte de chacune d'elles n'est pas encore connue, on peut penser qu'elles doivent contribuer à moduler les différentes interactions histone-histone et histone-ADN, soit en changeant la charge globale de la protéine, soit en modifiant sa conformation. Ceci peut se traduire par une stabilisation ou une déstabilisation du nucléosome lors d'événements clés comme la transcription ou la réplication.

#### I - 2-1-2 Les variants somatiques d'histones fortement représentés dans le testicule

Dans la cellule somatique, chaque histone, à l'exception de l'histone H4, possède un ou plusieurs variants structuraux. Ces variants se répartissent au sein de la cellule selon des proportions bien définies.

Au cours de la spermatogenèse, on assiste à une forte augmentation du taux de certains de ces variants qui sont appelés "variants fortement représentés dans le testicule". Jusqu'à présent, deux d'entre eux ont été caractérisés. Il s'agit de l'histone H1a et de l'histone H2A-X appartenant respectivement à la classe des histones H1 et à la classe des histones H2A.

\* *L'histone H1a*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'histone H1 diffère des autres histones par sa composition en acides aminés, sa masse moléculaire, sa position dans le nucléosome mais aussi par le nombre de ses variants présents dans la cellule. Six variants ont été caractérisés à ce jour et nommés H1a, H1b, H1c, H1d, H1e et H1°. Un septième variant, spécifique des érythrocytes nucléés, est appelé histone H5.

L'étude précise de la répartition de ces variants dans le testicule et le thymus de rat a permis de montrer que l'histone H1a était un variant mineur dans le thymus mais fortement représenté dans le testicule (KISTLER et GEROCH, 1975a; SEYEDIN et KISTLER, 1979a). Ceci a été confirmé ultérieurement par BUCCI *et al.* en 1982 et élargi à d'autres espèces en particulier à la souris (SEYEDIN et KISTLER, 1979b; RASHEED *et al.*, 1989). Cependant, chez le lapin, la même étude a montré que le variant H1a n'était pas plus abondant dans le testicule que dans les autres organes (SEYEDIN et KISTLER, 1979b).

L'analyse de la composition en acides aminés de l'histone H1a (SEYEDIN et KISTLER, 1979a; RASHEED *et al.*, 1989) (Tableau II) révèle un taux très important en lysine et alanine (quoique le taux d'alanine soit plus faible que dans les autres histones H1) et une absence de méthionine, d'histidine et de cystéine, ce qui est typique d'une histone H1. L'étude comparée de la composition en acides aminés de l'histone H1a chez la souris et chez le rat montre une différence notable dans le rapport : Lys/Arg qui est respectivement de 17 et 8,5. Ceci laisse donc présager une différence dans la structure primaire de ces deux molécules (RASHEED *et al.*, 1989).

**Tableau II**

Compositions en acides aminés de l'histone H1a isolée du testicule de souris (RASHEED et al., 1989), de l'histone H1a isolée du testicule de rat et de l'histone H1c isolée du thymus de rat (SEYEDIN et KISTLER, 1979a).

| Acides aminés | H1a de souris | H1a de rat | H1c de rat |
|---------------|---------------|------------|------------|
| Asx           | 3.3*          | 3.1        | 2.2        |
| Thr           | 6.1           | 6.4        | 5.3        |
| Ser           | 9.1           | 7.7        | 7.9        |
| Glx           | 4.2           | 5.0        | 4.3        |
| Pro           | 8.2           | 9.6        | 9.3        |
| Gly           | 5.6           | 5.7        | 7.9        |
| Ala           | 18.3          | 19.2       | 23.1       |
| Cys           | -             | -          | n.d        |
| Val           | 8.9           | 9.9        | 4.8        |
| Met           | -             | -          | -          |
| Ile           | 1.7           | 0.9        | 2.2        |
| Leu           | 4.7           | 4.4        | 5.1        |
| Tyr           | 0.4           | 0.3        | 0.4        |
| Phe           | 0.5           | 0.5        | 0.5        |
| His           | -             | -          | -          |
| Lys           | 27.3          | 24.4       | 23.4       |
| Arg           | 1.6           | 2.9        | 3.2        |

\* Les résultats sont exprimés en moles/100moles.

n.d : non déterminé

Comme tous les autres variants de l'histone H1, l'histone H1a existe sous forme phosphorylée dans les cellules en interphase (LENNOX *et al.*, 1982 ; LENNOX et COHEN, 1988). L'étude du nombre de groupes phosphate par molécule d'histone H1 a montré qu'il y avait deux groupes phosphate par molécule d'histone H1a (LENNOX et COHEN, 1983).

D'un point de vue plus général, les histones H1a et H1c se distinguent des autres variants de l'histone H1 par trois points (LENNOX, 1984) :

- leur plus faible conservation au cours de l'évolution,
- leur plus faible stabilité métabolique,
- leur plus faible degré de phosphorylation dans les cellules en interphase.

Des études, réalisées sur les différentes cellules de la spermatogenèse, ont montré que l'histone H1a apparaît dans le testicule en même temps que les spermatogonies (BUCCI *et al.*, 1982). Ces événements prennent place, chez le rat, au 5ème jour après la naissance (KUMAROO et IRVIN, 1980) et, chez la souris, au 7ème jour après la naissance (RASHEED *et al.*, 1989).

Du stade des spermatogonies au stade des spermatocytes pachytènes moyens, le taux cellulaire de l'histone H1a reste constant et représente 30% des histones H1 totales. Ce taux s'infléchit légèrement dans les spermatocytes pachytènes âgés (MEISTRICH *et al.*, 1985).

\* *L'histone H2A-X*

Une étude plus détaillée de la proportion des différents variants d'histone a montré, comme pour l'histone H1a, une augmentation importante d'un des quatre variants de l'histone H2A : H2A-X (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982 ; MEISTRICH *et al.*, 1985 ;

LENNOX et COHEN, 1988). Ce variant est également appelé protéine M2 dans l'érythrocyte de poulet (URBAN *et al.*, 1979), X2 chez le rat (BRANSON *et al.*, 1975 ; CHIU et IRVIN, 1980), H2A-4 chez la souris (ZWEIDLER, 1980) ou encore protéine A dans le testicule de souris (BHATNAGAR *et al.*, 1985).

Dans la cellule somatique, H2A-X et H2A-Z représentent 15 % de la fraction totale d'histone H2A alors que dans le testicule, le taux de l'histone H2A-X seule atteint 20 % (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982). Une quantification de l'histone H2A-X au cours des différentes phases de la méiose (MEISTRICH *et al.*, 1985) est en accord avec cette valeur.

L'analyse de la composition en acides aminés du variant H2A-X a montré son appartenance à la famille H2A avec toutefois des divergences marquées par rapport aux trois autres variants (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982) (Tableau III). Ces divergences ont d'ailleurs été vérifiées immunologiquement (BHATNAGAR *et al.*, 1985) par l'absence de sites antigéniques communs avec les autres membres de la famille H2A.

De plus, ces anticorps spécifiques anti-H2A-X ont permis de montrer que le variant H2A-X était présent aussi bien dans les tissus somatiques que dans le testicule de différents mammifères comme la souris, le rat, le lapin ... (BHATNAGAR *et al.*, 1985).

Ce variant, comme toutes les autres histones H2A (H2A-1, H2A-2, H2A-Z), subit des modifications post-traductionnelles. Trois modifications ont été recensées. Il s'agit de :

- l'ubiquitination (WEST et BONNER, 1980) dans la même proportion que celle observée pour les autres variants de l'histone H2A.
- la phosphorylation (JOSEPH *et al.*, 1983) où seule la forme monophosphorylée a pu être observée.
- l'acétylation (JOSEPH *et al.*, 1983).



**Tableau III**

Compositions en acides aminés des histones H2A.1 (variant somatique), H2A-X et TH2A isolées du testicule de rat (TROSTLE-WEIGE et al., 1982), ainsi que des histones H3 et TH3 (TROSTLE-WEIGE et al., 1984) également isolées du testicule de rat.

| Acides aminés | H2A.1 | H2A-X | TH2A | H3   | TH3  |
|---------------|-------|-------|------|------|------|
| Asx           | 7.4*  | 5.0   | 6.7  | 4.8  | 4.6  |
| Thr           | 3.0   | 3.6   | 3.8  | 6.9  | 7.8  |
| Ser           | 6.4   | 5.0   | 6.0  | 5.9  | 6.1  |
| Glx           | 10.8  | 9.8   | 11.7 | 10.3 | 11.3 |
| Pro           | 4.4   | 4.6   | 4.0  | 4.2  | 3.5  |
| Gly           | 11.2  | 11.6  | 12.1 | 6.7  | 6.6  |
| Ala           | 10.2  | 13.8  | 10.8 | 14.1 | 10.4 |
| Cys           | 0.0   | 0.0   | 0.0  | 1.8  | 3.1  |
| Val           | 5.4   | 7.9   | 5.6  | 4.4  | 5.1  |
| Met           | 0.2   | 0.4   | 0.3  | 0.8  | 1.1  |
| Ile           | 4.0   | 4.2   | 4.5  | 4.9  | 4.6  |
| Leu           | 11.0  | 9.6   | 10.5 | 8.4  | 8.5  |
| Tyr           | 3.0   | 2.6   | 2.2  | 2.0  | 1.5  |
| Phe           | 1.8   | 1.2   | 1.8  | 2.8  | 2.7  |
| His           | 3.2   | 2.1   | 3.5  | 1.5  | 2.1  |
| Lys           | 9.8   | 10.2  | 7.4  | 9.4  | 10.0 |
| Arg           | 8.2   | 7.8   | 8.6  | 11.4 | 11.7 |

\*Les résultats sont exprimés en moles/100moles.

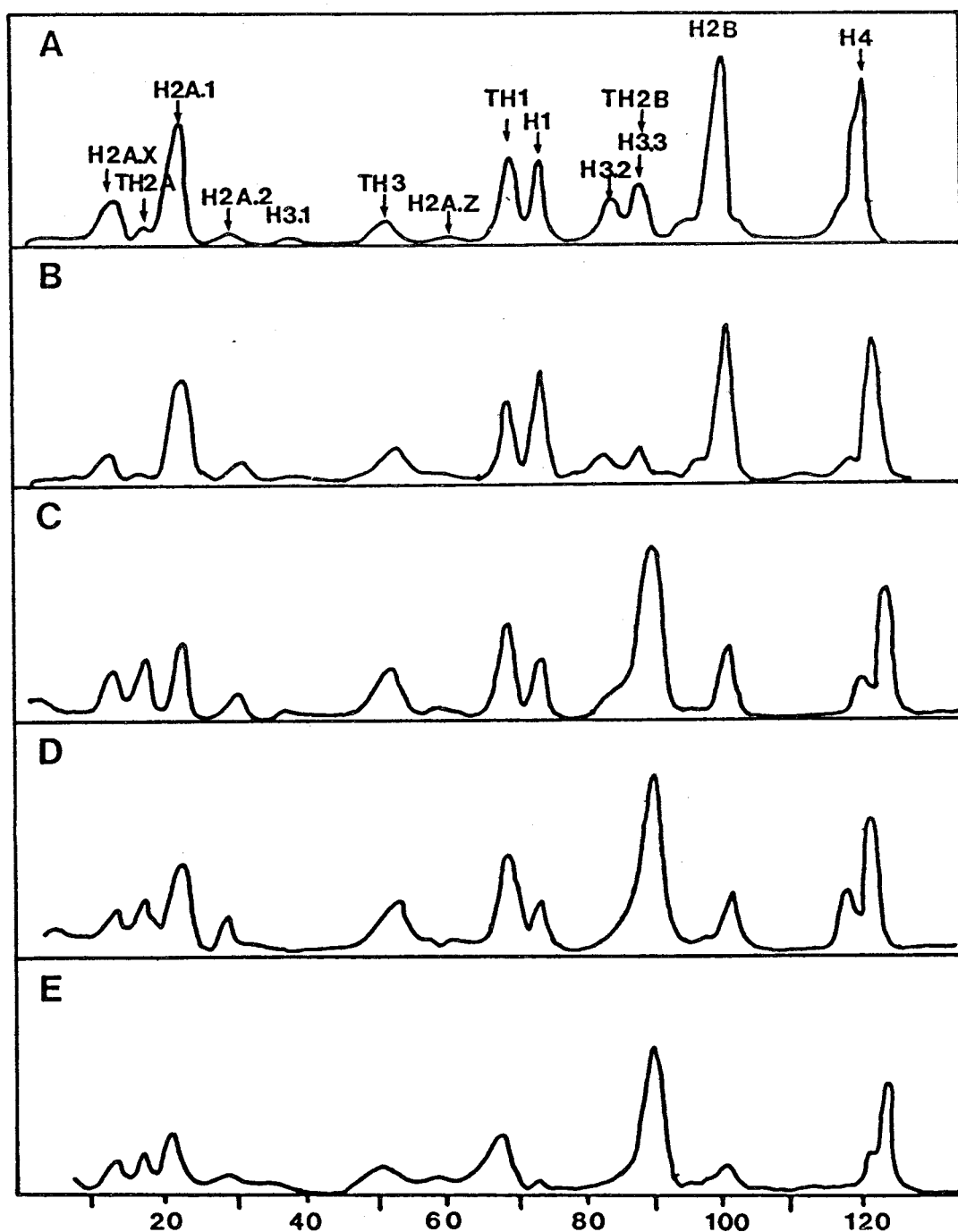
L'étude de la biosynthèse de ce variant a révélé que l'histone H2A-X était déjà présente dans le noyau des spermatogonies (MEISTRICH *et al.*, 1985). Elle s'accumule progressivement du 8ème au 20ème jour puis son taux, qui représente alors 20 % des histones H2A totales, reste constant (TROSTLEWEIGE *et al.*, 1982) (Figure 7). Cependant, même si le taux cellulaire de ce variant reste constant, sa biosynthèse diminue par rapport à celle des autres variants d'histones H2A ainsi que l'ont montré MEISTRICH *et al.* (1985). Il est intéressant de souligner que l'accumulation de l'histone H2A-X dans le testicule est parallèle à celle de l'histone H1a.

### I - 2-1-3 Les variants d'histones spécifiques du testicule

#### \* L'histone H1t

L'étude électrophorétique, en gel de polyacrylamide acide/urée, des différentes histones isolées du testicule de rat a permis de révéler l'existence d'un nouveau variant de l'histone H1 nommé X1 par BRANSON *et al.* en 1975 ou encore TF1 par SHIRES *et al.*, la même année. Cependant, l'analyse électrophorétique en milieu SDS a montré que la fraction X1 ou TF1 était composée de deux variants, l'histone TH1-XA et l'histone TH1-XB (LEVINGER *et al.*, 1978).

Des études ultérieures ont montré que l'histone TH1-XA correspondait à l'histone H1a (SEYEDIN et KISTLER, 1979a,b) et que l'histone TH1-XB correspondait à l'histone H1t (SEYEDIN et KISTLER, 1980). L'histone H1t représente 57 % des histones totales dans le spermatocyte pachytène (MEISTRICH *et al.*, 1985). Sa présence dans le testicule a été observée chez d'autres mammifères (SEYEDIN *et al.*, 1981) y compris l'homme (SEYEDIN et KISTLER, 1983).



**Figure 7:** Profils d'absorption, après coloration à l'amidoschwartz, des différents variants d'histones séparés en gel de polyacrylamide acide acétique/urée/triton. Les histones ont été extraites de 5 populations cellulaires différentes, présentes au cours de la spermatogenèse du rat, notées **A** (spermatogonies-A), **B** (spermatogonies-B), **C** (spermatocytes pachytènes jeunes), **D** (spermatocytes pachytènes moyens) et **E** (spermatocytes pachytènes âgés). (D'après MEISTRICH et al., 1985).

L'histone H1t diffère des autres variants somatiques par son insolubilité dans l'acide perchlorique 0,75 M, sa migration plus rapide en gel SDS, son taux d'arginine très supérieur à celui des histones H1 de type somatique (KUMAROO et IRVIN, 1980 ; SEYEDIN et KISTLER, 1980) et sa réactivité immunologique (MARKOSE et RAO, 1985).

Deux structures primaires complètes de l'histone H1t ont été établies (Figure 8). Il s'agit de l'histone H1t isolée du testicule de porc (COLE *et al.*, 1984) et de l'histone H1t de testicule de rat (COLE *et al.*, 1986). Il faut souligner que la structure primaire de cette dernière a été déduite de la séquence nucléotidique du gène correspondant. Les deux histones H1t diffèrent l'une de l'autre par leurs tailles (211 résidus pour l'histone H1t de porc et 207 résidus pour celle de rat) et par leurs structures primaires qui présentent environ 70 % de similitude. Toutefois, dans les deux cas, on note :

- une localisation de la majorité des résidus basiques dans les extrémités N- et C-terminales de la molécule où de nombreux changements sont observés.
- une zone centrale très conservée.

La figure 8 montre les homologues de séquence entre les deux histones H1t et une séquence consensus d'histone H1 somatique (COLE *et al.*, 1986). Les histones H1t se caractérisent surtout par l'accumulation des résidus d'arginine dans la région C-terminale. On ignore encore si ce taux d'arginine élevé pour une histone H1, entraîne des interactions plus fortes entre l'histone H1 et l'ADN comme cela est le cas pour l'histone H5.

L'histone H1t apparaît, pour la première fois, dans le noyau des spermatocytes pachytènes jeunes de testicules de rats âgés de 18 jours (KUMAROO et IRVIN, 1980 ; BUCCI *et al.*, 1982).

|                              |   |   |        |       |    |    |    |    |   |    |   |     |     |   |   |       |    |       |    |   |
|------------------------------|---|---|--------|-------|----|----|----|----|---|----|---|-----|-----|---|---|-------|----|-------|----|---|
|                              |   | 1 |        | 10    |    | 20 |    | 30 |   | 40 |   |     |     |   |   |       |    |       |    |   |
| <u>Histone H1t(porc)</u>     | : | A | ETAPAA | PADSV | PA | SV | EK | -  | P | PA | K | KRG | KKP | V | G | LTGTS | RK | APSAS | VS | K |
| <u>Histone H1t(rat)</u>      | : | S | ETAPAA | SSTLV | PA | PV | EK | -  | P | AT | K | RRG | KKP | - | G | MATA- | RK | PRGFS | VS | K |
| <u>Histone H1(consensus)</u> | : | S | ETAPAA | PAAPA | PA | -- | EK | T  | P | VK | K | KAA | KKP | - | G | AGAAK | RK | ASGPP | VS | E |

|    |    |    |     |    |   |    |   |    |   |                          |   |     |   |     |   |    |   |    |   |   |   |            |   |
|----|----|----|-----|----|---|----|---|----|---|--------------------------|---|-----|---|-----|---|----|---|----|---|---|---|------------|---|
|    |    | 50 |     | 60 |   | 70 |   | 80 |   | 90                       |   | 100 |   | 110 |   |    |   |    |   |   |   |            |   |
| LI | TE | A  | LSV | S  | Q | ER | A | G  | M | SLAALKKALAAAGYDVEKNSRIKL | G | LK  | S | LV  | G | KG | I | LV | Q | T | R | GTGASGSFKL | S |
| LI | PE | A  | LSM | S  | Q | ER | A | G  | M | SLAALKKALAAAGYDVEKNSRIKL | A | LK  | R | LV  | N | KG | V | LV | Q | T | K | GTGASGSFKL | S |
| LI | TK | A  | VAA | S  | K | ER | S | G  | V | SLAALKKALAAAGYDVEKNSRIKL | G | LK  | S | LV  | S | KG | T | LV | E | T | K | GTGASGSFKL | N |

|      |      |     |   |     |   |     |    |     |   |     |   |     |       |        |    |       |   |     |    |         |   |        |   |   |   |   |   |
|------|------|-----|---|-----|---|-----|----|-----|---|-----|---|-----|-------|--------|----|-------|---|-----|----|---------|---|--------|---|---|---|---|---|
|      |      | 120 |   | 130 |   | 140 |    | 150 |   | 160 |   | 170 |       |        |    |       |   |     |    |         |   |        |   |   |   |   |   |
| KKAA | PEPR | K   | G | K   | V | K   | KP | A   | A | AK  | T | KK  | LVL   | SRDSKS | PK | SAKAN | K | RA- | KK | SRTTAAQ | K | AARSGR | K | T | K | E | A |
| KKAA | SGND | K   | G | K   | G | K   | KS | A   | S | AK  | A | KK  | LGL   | SRASRS | PK | SSKT- | K | VV- | KK | PKATPT- | K | GSGSRR | K | T | K | G | A |
| KKAA | SGEA | K   | P | K   | K | K   | AG | A   | - | AK  | P | KK  | PAGAT | PKK-   | PK | KAAGA | K | KAV | KK | TPKKAP- | K | PKAAA- | K | P | K | V | A |

|   |       |     |            |      |    |     |          |     |      |     |      |     |     |   |         |
|---|-------|-----|------------|------|----|-----|----------|-----|------|-----|------|-----|-----|---|---------|
|   |       | 180 |            | 190  |    | 200 |          | 210 |      | 220 |      | 230 |     |   |         |
| K | VKQQR | K   | -----      | SPAK | AR | A   | AKPKAGNP | K   | LTQQ | K   | TNPR | KA  | TNR | K |         |
| K | GLQQR | K   | -----      | SPAK | AR | A   | TNSNSGKS | K   | MVMQ | K   | TDLR | KA  | AGR | K |         |
| K | SPKKA | K   | AAAKPKKAAK | SPAK | PK | A   | VKPKAAKP | K   | APKP | K   | AAKP | KA  | AKA | K | KTAAKKK |

**Figure 8** : Comparaison des séquences en acides aminés de l'histone H1t de testicule de porc (COLE et al., 1984) et de l'histone H1t de testicule de rat avec une séquence consensus d'histone H1 de type somatique (COLE et al., 1986).

Les séquences encadrées sont strictement identiques.

Cela a été vérifié par immunotransfert en utilisant des anticorps anti-H1t (MARKOSE et RAO, 1985) et par cyto-hybridation des ARNm de l'histone H1t en utilisant une sonde radioactive (GRIMES *et al.*, 1987). Dans les spermatocytes pachytènes jeunes, elle représente 10 % du total des histones H1. Dans les spermatocytes pachytènes moyens, ce taux s'élève à 35 % et atteint 57 % dans les spermatocytes pachytènes âgés (MEISTRICH *et al.*, 1985) (Figure 7, page 25). Dans ces dernières, la biosynthèse de l'histone H1t représente la seule synthèse d'histone H1.

\* *Les variants de l'histone H2B*

L'histone TH2B, initialement appelée X3 (BRANSON *et al.*, 1975), a été le premier variant d'une core histone découvert dans le testicule. D'abord identifiée dans le testicule de rat, elle a été ensuite identifiée dans le testicule d'autres mammifères comme la souris, le lapin, le singe (SHIRES *et al.*, 1975) et l'homme (TANPHAICHITR *et al.*, 1978).

L'analyse de la composition en acides aminés a d'une part confirmé la parenté structurale de ce variant à la famille H2B et d'autre part, révélé la présence d'un résidu de cystéine qui est normalement absent des histones H2B (SHIRES et CARPENTER, 1976).

Cependant, l'histone TH2B humaine se distingue de l'histone TH2B des autres mammifères par l'absence de cystéine comme cela a pu être montré à partir des résultats de la composition en acides aminés de la protéine (TANPHAICHITR *et al.*, 1978) et par l'étude des peptides tryptiques parmi lesquels aucun peptide renfermant de la S-carboxamidométhylcystéine n'a pu être mis en évidence (WATTANASEREE et SVASTI, 1983).

Nous reviendrons ultérieurement sur toutes les implications possibles de la présence de ce résidu dans le processus de condensation de la chromatine qui caractérise la spermiogenèse.

L'étude de l'histone TH2B (chez les autres mammifères) en électrophorèse sur gel de polyacrylamide, dans des conditions non réductrices, conduit à un dimère (TH2B)<sub>2</sub> qui apparaît sous la forme d'une double bande (CHIU et IRVIN, 1980). L'existence d'une seconde bande pourrait être due soit à la présence d'un variant de l'histone TH2B, soit à un processus de dimérisation double qui conduirait à deux molécules (TH2B)<sub>2</sub> conformationnellement distinctes. Cependant la mise en évidence de forme(s) acétylée(s) de l'histone TH2B (comme de l'histone H2B) (GRIMES et HENDERSON, 1984) pourrait être une autre explication possible de la présence de cette seconde bande.

Des quantifications précises du taux de TH2B dans les différents types cellulaires du testicule de rat et du testicule humain montrent que chez le rat, l'histone TH2B représente 61 % des histones H2B totales (CHIU et IRVIN, 1980) alors que chez l'homme, elle représente moins de 50 % (TANPHAICHITR *et al.*, 1978). Par contre, dans le spermatozoïde humain éjaculé, l'histone TH2B devient l'histone majeure (TANPHAICHITR *et al.*, 1978). Ces auteurs ont du reste remarqué que l'histone TH2B était beaucoup plus facilement extraite de la chromatine du spermatozoïde éjaculé que de celle des cellules testiculaires. Ce résultat suggère donc une diminution de l'affinité de l'histone TH2B pour l'ADN qui est vraisemblablement due au dépôt des protamines sur l'ADN. La présence d'histone TH2B résiduelle dans les spermatozoïdes humains éjaculés peut s'expliquer soit par la lenteur de la transition histone-protamine chez l'homme, soit par la difficulté des cellules à transporter l'histone TH2B, hors de leur noyau (TANPHAICHITR *et al.*, 1978).

L'obtention d'anticorps spécifiques (CHIU et IRVIN, 1984) à partir d'histone TH2B purifiée par chromatographie d'affinité sur un support de Sepharose-aminoéthylparachloromercuribenzoate (ANGURAVIRUTT et SVASTI, 1981) a permis de montrer que l'anticorps réagissait aussi bien avec l'histone TH2B pure qu'avec les mononucléosomes, prouvant ainsi la présence de ce variant dans le nucléosome. Ces anticorps ont d'ailleurs été utilisés pour purifier les mononucléosomes contenant l'histone TH2B. A partir de ces nucléosomes, toutes les tentatives de mise en évidence de l'histone H2B somatique ont échoué que ce soit par analyse électrophorétique ou par utilisation d'anticorps spécifiques (CHIU et IRVIN, 1986). Ceci signifie donc que l'histone TH2B remplace quantitativement l'histone H2B dans le nucléosome.

La structure primaire de l'histone TH2B, déduite de la séquence nucléotidique du gène correspondant (KIM *et al.*, 1987), fait apparaître 17 modifications de séquence par rapport à l'histone H2B de thymus de rat (MARTINAGE *et al.*, 1979). Quinze des 17 modifications sont localisées dans les 40 premiers résidus de la molécule (Figure 9).

Le résidu de cystéine, qui caractérise l'histone TH2B des mammifères à l'exception de l'homme, apparaît à la position 33, en remplacement d'un résidu de sérine.

La localisation de la majorité des résidus basiques dans la partie N-terminale de la protéine suggère que les histones H2B interagissent par cette extrémité avec l'ADN. On peut donc penser que les altérations de cette région de l'histone TH2B modifient les interactions histone-ADN et donc modifient la stabilité de la chromatine.



|                                |   |             |     |    |        |    |     |    |   |    |      |    |   |   |      |   |   |   |               |
|--------------------------------|---|-------------|-----|----|--------|----|-----|----|---|----|------|----|---|---|------|---|---|---|---------------|
|                                |   | 1           |     | 10 |        | 20 |     | 30 |   | 40 |      | 50 |   |   |      |   |   |   |               |
| <u>Histone TH2B (rat)</u>      | : | PEVSAKGTTIS | KKG | F  | KKAVTK | T  | QKK | E  | G | R  | KRKR | C  | R | E | ESYS | I | Y | I | YKVLKQVHPDTGI |
| <u>Histone H2B (rat)</u>       | : | PEP-AKSAPAP | KKG | S  | KKAVTK | A  | QKK | D  | G | K  | KRKR | S  | R | K | ESYS | V | Y | V | YKVLKQVHPDTGI |
| <u>Histone H2B ss (souris)</u> | : | --VRSV--PAP | KKG | S  | KKAVTK | A  | QKK | D  | G | K  | KRKR | S  | R | K | ESYS | V | Y | V | YKVLKQVHPDTGI |

|       |   |        |   |                                                           |  |    |  |    |  |     |  |     |  |              |
|-------|---|--------|---|-----------------------------------------------------------|--|----|--|----|--|-----|--|-----|--|--------------|
|       |   | 60     |   | 70                                                        |  | 80 |  | 90 |  | 100 |  | 110 |  | 120          |
| SSKAM | S | IMNSFV | T | DIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK |  |    |  |    |  |     |  |     |  |              |
| SSKAM | G | IMNSFV | N | DIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK |  |    |  |    |  |     |  |     |  |              |
| SSKAM | G | IMNSFV | N | DIFERIAGEASRLAHYNKRSTITSREIQTAVRLLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK |  |    |  |    |  |     |  |     |  | ILWNKFYYLPSF |

**Figure 9:** Comparaison des séquences en acides aminés des histones TH2B de testicule de rat (KIM et al.,1987),H2B de thymus de rat (MARTINAGE et al.,1979) et H2Bss (spécifique des spermatides) de testicule de souris (MOSS et al.,1989).

Les séquences encadrées sont strictement identiques.

L'étude de l'expression du gène de l'histone TH2B, grâce à une sonde radioactive, montre que ce gène est exprimé à partir du 14ème jour de la vie de l'animal (KIM *et al.*, 1987), soit légèrement plus tard que ce qu'avaient observé BROCK *et al.* en 1980 : ces auteurs avaient détecté l'histone TH2B dans les testicules de rats âgés de 11 jours. L'histone TH2B atteint son maximum au 20ème jour (correspondant aux spermatoctes pachytènes). L'élévation progressive de son taux s'accompagne d'une diminution du taux de l'histone H2B somatique (Figure 7, page 25). Ce parallélisme suggère donc un remplacement direct des formes somatiques par le variant spécifique (MEISTRICH *et al.*, 1985) qui représente 90 % du total des histones H2B dans les spermatoctes pachytènes âgés (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982). Sa synthèse est indépendante de celle de l'ADN (BROCK *et al.*, 1980).

L'histone H2Bss : Récemment, un ARNm codant pour une histone H2B a été isolé dans les spermatides de souris et nommé H2Bss (H2B spécifique des spermatides) (MOSS *et al.*, 1989). Ceci est surprenant, car à ce stade de la spermiogenèse, toute synthèse d'histones a cessé. Le séquençage de l'ADNc correspondant a permis de déterminer la séquence en acides aminés de ce nouveau variant (Figure 9) qui, en dépit d'une parenté structurale étroite avec une histone H2B de type somatique, possède une extrémité C-terminale prolongée de 12 résidus. Sur ces 12 résidus, 7 sont hydrophobes dont un résidu de tryptophane qui n'a jamais été caractérisé dans une histone. Nous reviendrons sur cette queue hydrophobe lorsque nous discuterons du rôle biologique de ces variants.

\* *L'histone TH2A*

Si les histones H1t et TH2B ont fait l'objet d'un certain nombre d'études qui ont conduit à l'élucidation de leur structure primaire, il n'en est pas de même pour l'histone TH2A qui

a été caractérisée uniquement dans le testicule de rat (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982). L'analyse de sa composition en acides aminés ne révèle qu'un taux de lysine légèrement inférieur à celui de l'histone H2A somatique. La carte peptidique établie après hydrolyse de l'histone TH2A par la trypsine montre qu'il existe quelques différences dans la structure primaire de cette protéine comparée à celle d'une histone H2A de type somatique. Le tableau III (page 23) présente les compositions en acides aminés des histones H2A-1, H2A-X et de l'histone TH2A.

L'analyse électrophorétique du contenu en histones des cellules germinales isolées à différents stades de maturation du testicule montre que l'histone TH2A est absente des testicules de 8 et 12 jours et apparaît dès le 16ème jour de la vie de l'animal, dans les spermatocytes pachytènes jeunes (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982). Elle atteint très rapidement son taux maximum (25 % des histones H2A totales) et son augmentation s'accompagne d'une diminution du taux de l'histone H2A-1, un variant somatique associé à la réplication (Figure 7, page 25).

\* *L'histone TH3*

L'histone TH3, comme l'histone TH2A, a été seulement caractérisée par sa mobilité électrophorétique, sa composition en acides aminés (Tableau III, page 23) et sa carte peptidique de l'hydrolysate tryptique. Par rapport à l'histone H3 somatique, deux différences mineures apparaissent dans la composition, l'une concernant le taux de cystéine et l'autre le taux d'alanine (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1984). Aucune structure primaire de cette histone n'est connue à ce jour.

Une étude de la synthèse de l'histone TH3 dans le testicule a été entreprise chez le rat en fonction de l'âge de l'animal. Elle révèle que l'histone TH3 apparaît dans les testicules de 8 jours et qu'il y a une accumulation notable jusqu'au 16ème jour (TROSTLE-WEIGE, 1982, 1984) (Figure 7, page 25). L'histone TH3 représente entre 20 et 41 % du total des histones H3. Sa synthèse est active dans les spermatogonies mais négligeable dans les spermatocytes (MEISTRICH *et al.*, 1985).

#### I - 2-1-4 Rôles possibles des variants d'histones

##### *\* Les variants d'histones de type somatique*

Quel que soit le variant considéré, variant somatique, variant fortement représenté dans le testicule ou variant spécifique du testicule, aucun rôle précis ne lui a encore été attribué. Cependant, en étudiant le contenu en histones de cellules subissant différents événements (méiose, différenciation ...), il est possible aujourd'hui d'avoir une idée sur la fonction biologique de ces variants.

C'est ainsi qu'en corrélant la synthèse des variants à la réplication de l'ADN, ZWEIDLER (1984) a classé ces variants en quatre groupes :

- les variants strictement associés à la réplication : H2A-1, H2B-1, H3-1 et H3-2.
- les variants partiellement associés à la réplication : H2A-2 et H2B-1.
- les variants non associés à la réplication : H2A-3 et H3-3.
- autres variants : H2A-4 et H2A-Z.

De même, il a été noté que l'histone H1° était présente dans la chromatine où la réplication était réprimée ou encore que la présence de l'histone H5 était corrélée à la perte de capacité de la cellule pour la réplication et la transcription.

Le rôle biologique des différents variants de l'histone H1 a été particulièrement étudié. Ainsi, en plus des différences de structure primaire qui existent entre les variants somatiques de l'histone H1, BUCCI *et al.* (1982) ont indiqué que ces variants différaient également l'un de l'autre par :

- leur mode d'interaction avec l'ADN comme en témoigne la protection différentielle de la chromatine contre la digestion de l'ADN par la nucléase micrococcale.
- leur mode d'interaction avec les protéines non histones comme les protéines HMG, en particulier HMG 1 et 2.
- leur degré de phosphorylation.

Il apparaît donc vraisemblable que les changements observés dans le rapport molaire de chacun des variants de l'histone H1 à différents stades de la vie cellulaire, influencent la conformation de la chromatine et donc sa fonctionnalité. De plus, il a été reporté que les fractions d'histone H1 différaient dans leur capacité à former la structure d'ordre supérieur de la chromatine (fibre de 34 nm de diamètre). Ainsi, les histones H1a et H1c, à l'inverse des histones H1b, H1d et H1e ne pourraient pas promouvoir cette structure de 34 nm (LENNOX, 1984 ; LENNOX et COHEN, 1988). Ces différences de propriétés entre les variants d'histones H1 s'expliqueraient par les nombreuses modifications de séquence observées au niveau des extrémités N- et C-terminales de certains variants. On sait en effet que ces régions sont impliquées dans des interactions protéine-ADN. Ces modifications structurales affecteraient donc les interactions histone H1-ADN et, éventuellement celles pouvant exister avec des spires voisines d'ADN.

Il y a donc un consensus général qui se dégage, à savoir que la structure de la chromatine dépendrait en grande partie de la nature des variants de l'histone H1 présents dans la cellule. La phosphorylation, qui est la principale modification post-synthétique affectant cette histone, entraînerait également des modifications conformationnelles importantes (LENNOX *et al.*, 1982 ; LENNOX et COHEN, 1983).

En ce qui concerne plus spécifiquement les variants H1a et H1c, dont le taux cellulaire augmente durant la spermatogenèse, ils ont subi les modifications structurales les plus importantes au cours de l'évolution des espèces et ont un taux de phosphorylation ainsi qu'une stabilité métabolique plus faibles que ceux des autres variants de l'histone H1 (LENNOX, 1984). On pense donc que ces variants pourraient engendrer une ouverture de la structure chromatinienne nécessaire aux recombinaisons génétiques (LENNOX, 1984). De plus leur stabilité métabolique plus faible permettrait une élimination plus facile et plus rapide du noyau lors de la mise en place des protéines intermédiaires (LENNOX et COHEN, 1988).

\* *Les variants d'histones spécifiques du testicule*

Pour attribuer un rôle à chacun des variants spécifiques du testicule, une approche identique à celle des variants somatiques d'histones a été utilisée. A partir de populations cellulaires enrichies, les différentes histones présentes ont été étudiées et les résultats obtenus ont été corrélés avec un événement cellulaire particulier. C'est ainsi que d'une façon générale, les variants spécifiques apparaissent associés à la méiose. Ces variants pourraient donc être impliqués dans :

- la reprogrammation du génome pour l'expression des gènes codant pour les protéines intermédiaires ou pour des enzymes spécifiques qui interviendraient plus tardivement au cours de la spermiogenèse (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982 ; BHATNAGAR *et al.*, 1983).

- la déstabilisation de la chromatine, pour permettre l'élimination des histones et la mise en place des protéines intermédiaires (TROSTLE-WEIGE *et al.*, 1982 ; BHATNAGAR *et al.*, 1983). D'autres mécanismes concernant le remplacement des histones ont été proposés. Nous y reviendrons ultérieurement.

Plusieurs arguments permettent d'étayer ce qui vient d'être dit. Tout d'abord, la comparaison des structures primaires des variants d'histones H1 et H2B (somatiques et spécifiques du testicule) a montré que la majorité des modifications structurales était localisée dans les zones d'interactions protéine-ADN, à savoir les régions N- et C-terminales pour l'histone H1 et la région N-terminale pour l'histone H2B. On peut donc penser que ces changements dans la structure primaire modifient ces interactions (COLE *et al.*, 1984, 1986 ; MARKOSE et RAO, 1985 ; KIM *et al.*, 1987).

Ensuite, des études de dichroïsme circulaire, de dénaturation thermique et de digestion enzymatique de la chromatine par la nucléase de microcoque ou par la DNase I, ont montré que la stabilité de la chromatine, isolée des spermatocytes pachytènes, était plus faible que celle de la chromatine isolée de foie de rat (RAO *et al.*, 1983).

Concernant l'histone H1t, certains auteurs pensent qu'elle serait plus spécifique de la méiose que de la spermatogenèse. En effet, elle pourrait permettre aux chromosomes de former des structures plus fortement condensées nécessaires à leur ségrégation lors de la méiose (LENNOX et COHEN, 1988). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait, comme le suggèrent SEYEDIN et KISTLER (1980), mener la même étude dans les ovocytes. Malheureusement, chez la femelle des mammifères, la méiose est très longue et le nombre de cellules qui la subissent est très faible.

En ce qui concerne l'histone H2Bss (spécifique des spermatozoïdes) la présence d'une queue terminale très hydrophobe ressemble très fortement à celle des protéines destinées à être sécrétées. Quoique habituellement cette séquence soit éliminée dans la protéine mature, certaines protéines intégrées à la membrane gardent ce peptide signal. Or, il a été observé que la condensation de la chromatine était initiée au niveau de l'enveloppe nucléaire, sous-jacente à l'acrosome et à la fosse d'implantation. Cette zone pourrait correspondre aux sites d'attachement des chromosomes individuels à la membrane nucléaire. Si la protéine H2Bss joue un rôle dans l'organisation de la chromatine avant sa condensation, elle pourrait être localisée à la périphérie des noyaux spermiogéniques (MOSS *et al.*, 1989).

Lors de l'étude de la synthèse des différents variants spécifiques, nous avons vu que l'histone TH3 était déjà présente dans les spermatogonies à un taux très élevé. Quant aux histones TH2A et TH2B, associées l'une à l'autre dans le nucléosome, elles apparaissent plus tardivement. Ce décalage dans la biosynthèse pourrait permettre, dans un premier temps, la mise en place dans le nucléosome de l'histone TH3 qui est associée à l'histone H4 dont la synthèse est continue. Dans un second temps, les histones H2A et H2B seraient remplacées par les variants spécifiques correspondants. Ceci éviterait ainsi d'avoir à dissocier complètement le nucléosome (TROSTLEWEIGE *et al.*, 1984).

La restructuration des nucléosomes préméiotiques nécessite une synthèse abondante des histones en absence de synthèse d'ADN. Chez le rat, cette condition est remplie, au moins en partie, par le regroupement des différents gènes d'histones. Cela pourrait expliquer, par exemple, que le gène de l'histone H4 soit très étroitement associé à celui de l'histone H1t (GRIMES *et al.*, 1987).



A la lecture de cet exposé, il est clair qu'une étude beaucoup plus poussée serait nécessaire pour d'une part, déterminer le rôle exact de chacun des variants afin d'avoir une idée beaucoup plus précise sur les relations structure-fonction et d'autre part, sur un plan génétique, déterminer les différents facteurs de régulation qui agissent sur l'expression des gènes des différents variants. Ces variants d'histones spécifiques, qui sont mis en place lors de la prophase méiotique, vont rester associés à la chromatine jusqu'au début de la phase d'élongation des spermatides. A ce stade de la spermiogenèse, ils vont être totalement ou en partie (chez l'homme) remplacés par les protéines intermédiaires encore appelées protéines de transition ou protéines spécifiques des spermatides.

#### I - 2-2 LES PROTEINES SPECIFIQUES DES SPERMATIDES

Parmi les trois familles de protéines nucléaires basiques connues à ce jour, celle des protéines spécifiques des spermatides est la moins étudiée. Ces protéines sont également appelées protéines de transition (TP) ou encore protéines intermédiaires.

Chez les mammifères, seuls les modèles rat, souris et bélier ont fait l'objet de travaux approfondis. Chez ces espèces, quatre protéines de transition ont été caractérisées. Elles ont été nommées TP1, TP2, TP3 et TP4 chez le rat et la souris (KISTLER *et al.*, 1973 ; GRIMES *et al.*, 1975, 1977 ; MEISTRICH *et al.*, 1978 ; BALHORN *et al.*, 1984), et protéines P1, 3, 7 et T chez le bélier (DUPRESSOIR *et al.*, 1985).

I - 2-2-1 Caractéristiques structurales des protéines de transition (TP)

\* *Les protéines de type TP1*

Structures primaires. De ces quatre groupes de protéines, le groupe des protéines TP1 est le mieux connu. La composition en acides aminés de la protéine TP1 de rat (KISTLER *et al.*, 1973) et de taureau (FARAONE MENELLA *et al.*, 1988) est présentée dans le tableau IV. Ces protéines sont caractérisées par :

- un taux élevé de résidus basiques ( $\sim 44\%$ )
- un rapport Lys/Arg voisin de 1 (0,95)
- un taux élevé de résidus hydroxylés ( $\sim 22\%$  dont  $15\%$  de résidus de sérine).

La composition en acides aminés de la protéine T isolée du testicule de bélier (DUPRESSOIR *et al.*, 1985) ressemble très fortement à celle des protéines TP1 de rat et de souris (Tableau IV).

Dès 1975, KISTLER *et al.* ont établi la structure primaire complète de la protéine TP1 de rat (54 résidus). Depuis cette date, seules quatre autres structures primaires ont été étudiées. Il s'agit de la protéine TP1 humaine (LUERSSSEN *et al.*, 1988), de souris (KLEENE *et al.*, 1988), de taureau et de verrat (KREMLING *et al.*, 1989). A l'inverse de la protéine TP1 de rat, ces quatre structures primaires ont été déduites de la séquence du gène codant pour ces protéines.

La comparaison de la structure primaire de ces cinq protéines de transition (Figure 10) montre qu'il existe un très haut degré de conservation entre ces différentes protéines. En effet, il n'existe que onze points de mutations. Ceci suggère dès à présent un rôle important de ces protéines.

**TABLEAU IV**

Compositions en acides aminés des protéines de transition TP1 de taureau (FARAONE MENELLA et al., 1988) et de rat (KISTLER et al., 1973) et de la protéine T de bœuf (DUPRESSOIR et al., 1985)

| Acides aminés | TP1 Taureau | TP1 Rat | Protéine T Bœuf |
|---------------|-------------|---------|-----------------|
| Asx           | 7.2*        | 7.4     | 9.1             |
| Thr           | 2.0         | 3.7     | 5.5             |
| Ser           | 15.0        | 14.4    | 14.8            |
| Glx           | 2.5         | -       | 2.3             |
| Pro           | n.d         | 2.9     | 2.3             |
| Gly           | 11.8        | 11.1    | 8.0             |
| Ala           | 3.5         | 3.6     | 2.4             |
| Cys           | -           | -       | 3.8             |
| Val           | 3.1         | 1.7     | 2.2             |
| Met           | 0.5         | 1.2     | -               |
| Ile           | 0.2         | -       | -               |
| Leu           | 5.1         | 5.5     | 5.5             |
| Tyr           | 3.4         | 2.9     | 2.0             |
| Phe           | 0.2         | -       | 1.8             |
| His           | 5.0         | 5.4     | 3.4             |
| Lys           | 18.5        | 19.5    | 18.9            |
| Arg           | 19.4        | 20.4    | 20.5            |

\*Les résultats sont exprimés en moles/100moles

n.d : non déterminé

|         | 1                | 10             | 20                              | 30                | 40               | 50                                     |
|---------|------------------|----------------|---------------------------------|-------------------|------------------|----------------------------------------|
| Homme   | STSRK <b>KLK</b> | SH <b>GMRR</b> | S <b>K</b> S R S <b>PHKGVKR</b> | G <b>GSKRKYRK</b> | GN <b>LKSRKR</b> | G <b>DDA</b> N <b>RN</b> Y <b>RSHL</b> |
| Verrat  | STSRK <b>KLK</b> | SH <b>GMRR</b> | G <b>K</b> N R A <b>PHKGVKR</b> | G <b>GSKRKYRK</b> | GS <b>LKSRKR</b> | C <b>DDA</b> N <b>RN</b> Y <b>RSHL</b> |
| Taureau | STSRK <b>KLK</b> | SQ <b>GMRR</b> | G <b>K</b> N R T <b>PHKGVKR</b> | S <b>GSKRKYRK</b> | SS <b>LKSRKR</b> | C <b>DDA</b> N <b>RN</b> L <b>RSHL</b> |
| Rat     | STSRK <b>KLK</b> | TH <b>GMRR</b> | G <b>K</b> N R A <b>PHKGVKR</b> | G <b>GSKRKYRK</b> | SS <b>LKSRKR</b> | G <b>DDA</b> S <b>RN</b> Y <b>RSHL</b> |
| Souris  | STSRK <b>KLK</b> | TH <b>GMRR</b> | G <b>K</b> N R A <b>PHKGVKR</b> | G <b>GSKRKYRK</b> | SV <b>LKSRKR</b> | G <b>DDA</b> S <b>RN</b> Y <b>RSHL</b> |

**Figure 10:** Comparaison des séquences en acides aminés des protéines de transition TP1 isolées de testicule humain (LUERSEN et al., 1988), de verrat (KREMLING et al., 1989), de taureau (KREMLING et al., 1989), de rat (KISTLER et al., 1975b; HEIDARAN et KISTLER, 1987b; KREMLING et al., 1989) et de souris (KLEENE et al., 1988).  
Les séquences encadrées sont strictement identiques

On note également que dans ces protéines les acides aminés basiques et hydroxylés sont répartis d'une façon relativement homogène tout le long de la molécule.

S'il est difficile de distinguer un domaine particulier dans ces protéines, la zone centrale (séquence 29 à 42) se distingue cependant du reste de la molécule par son caractère basique très marqué (65 % d'acides aminés basiques). Cette zone renferme de un à trois résidus de sérine et un résidu de tyrosine en position 32.

L'extinction de la fluorescence de la tyrosine à 276 nm a permis de conclure que le noyau aromatique des deux résidus de tyrosine présents dans la protéine TP1 de rat en positions 32 et 50 s'intercalait entre les bases de l'ADN (SINGH et RAO, 1987). Ce phénomène d'intercalation du noyau phénolique de la tyrosine avait déjà été décrit par DIMICOLI et HELENE en 1974 à partir d'un peptide synthétique Lys-Tyr-Lys. Cette propriété d'intercalation aurait pour conséquence une déstabilisation de la chromatine. Cette hypothèse est confirmée par la diminution du point de fusion de l'ADN lorsque celui-ci est associé à la protéine TP1 (SINGH et RAO, 1987). Ceci a conduit ces auteurs à nommer la protéine TP1 : "DNA-melting protein".

Modifications post-traductionnelles. Deux modifications post-traductionnelles pouvant affecter ces protéines ont été décrites : la phosphorylation et l'ADP-ribosylation. La phosphorylation des protéines de transition a été observée chez le rat (HEIDARAN *et al.*, 1988) et chez le bélier (DUPRESSOIR *et al.*, 1985) ; dans ce dernier cas, la protéine T est présente sous trois formes : non phosphorylée, mono- et diphosphorylée. Par ailleurs, l'ADP-ribosylation a été décrite dans

la protéine TP1 de taureau (FARAONE MENELLA *et al.*, 1988). Cette protéine est un substrat pour la poly (adénosine diphosphate ribose) synthétase qui utilise le  $\text{NAD}^+$  comme donneur de l'adénosine ribose diphosphate. Environ 5 % de la radioactivité totale incorporée par les protéines nucléaires le sont par la protéine TP1.

\* *Les protéines de type TP2*

Comparée à la protéine TP1, la protéine TP2 est moins connue. Cette protéine a été caractérisée pour la première fois en 1975 dans les spermatides allongées du rat (GRIMES *et al.*, 1975). La composition en acides aminés de la protéine TP2 de rat est présentée dans le tableau V ainsi que celle de la protéine P1 de bélier.

On note, comme pour les protéines T et TP1, une grande similitude entre la composition en acides aminés de la protéine TP2 de rat et la protéine P1 de bélier. Outre son taux élevé en résidus basiques (32 %), la protéine TP2 de rat se caractérise par sa richesse en résidus de sérine (22 %), de proline (13 %) et la présence d'environ 5 % de cystéine. Cette protéine, soumise à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 15 %, a une mobilité identique à celle de l'histone H2A. Débarrassée de cette histone, la protéine TP2 de rat apparaît sous la forme de deux bandes distinctes qui, après hydrolyse acide totale, présentent une composition en acides aminés strictement identique à celle établie initialement (GRIMES *et al.*, 1975). Ce résultat suggère donc que la protéine TP2 pourrait subir une modification post-traductionnelle comme par exemple l'acétylation ou la phosphorylation (GRIMES *et al.*, 1975). Cependant, l'isolement de deux mRNA codant pour deux protéines TP2 de souris qui ne diffèrent que par la longueur

TABLEAU V

Compositions en acides aminés de la protéine TP2 de rat (GRIMES et al., 1977) et de la protéine P1 de béliet (DUPRESSOIR et al., 1985).

| Acides aminés | TP2 Rat | P1 Bélier |
|---------------|---------|-----------|
| Asx           | 4.3*    | 6.1       |
| Thr           | 6.6     | 4.2       |
| Ser           | 14.2    | 20.1      |
| Glx           | 4.8     | 8.4       |
| Pro           | 12.0    | 6.4       |
| Gly           | 5.8     | 5.5       |
| Ala           | 4.7     | 2.4       |
| Cys           | 4.4     | 5.3       |
| Val           | 2.8     | 3.2       |
| Met           | 3.1     | 1.5       |
| Ile           | 0.3     | 0.9       |
| Leu           | 2.3     | 2.4       |
| Tyr           | 1.8     | 2.3       |
| Phe           | 0.2     | -         |
| His           | 8.3     | 8.5       |
| Lys           | 9.9     | 8.3       |
| Arg           | 14.2    | 18.6      |

\*Les résultats sont exprimés en moles/100moles

de la chaîne polypeptidique, pourrait également expliquer cette différence de mobilité électrophorétique de la protéine TP2 de rat (KLEENE et FLYNN, 1987).

Les deux seules structures primaires de protéine TP2 connues à ce jour, ont été déduites de la séquence nucléotidique des gènes codant pour ces protéines. Il s'agit de la protéine TP2 de souris (KLEENE et FLYNN, 1987) et de la protéine TP2 de rat (LUERSSSEN *et al.*, 1989). Ces deux structures, présentées dans la figure 11, montre d'une part la très grande similitude de structures primaires qui existe entre ces deux protéines (86 % d'homologie) et d'autre part, l'existence de deux domaines. Le premier, comprenant les 80 premiers résidus de la molécule, est riche en cystéine, sérine, thréonine, histidine et proline. Le second domaine, couvrant le reste de la séquence, est hautement basique puisque environ 50 % des résidus basiques de la molécule y sont accumulés. Cela suggère donc que la protéine TP2 interagit avec l'ADN par son extrémité C-terminale (KLEENE et FLYNN, 1987 ; COLE et KISTLER, 1987). Cependant, comme pour les autres familles de protéines spécifiques des spermatides, les modalités exactes de ces interactions avec l'ADN ne sont pas connues.

Enfin, il faut signaler que la protéine TP2 de rat possède une extrémité N-terminale bloquée et que la nature du groupement bloquant est inconnue.

*\* Les protéines de type TP3 et TP4*

Si l'on excepte la composition en acides aminés de la protéine TP3 de rat (GRIMES *et al.*, 1977), présentée dans le tableau VI, les deux dernières familles de protéines spécifiques des spermatides sont totalement méconnues.



TP2 souris : DTKMQSL--  
 1 10 20 30 40 50 60  
 PTTHPHPHSSSRPQSHT S NQC NQCT CSHHCRSCSQAGH AG SSSSPSPGPP M KHPK  
TP2 Rat : GGHTRRGRA  
 PTTHPHPHSSSRPQSHT N NQC A--- CSHHCRSCSQAGH PS SSSSPSPGPP T KHPK

70 80 90 100 110  
 PSV HSR H SP A RPSHRGSCPKNRKT F EG K VSKRKAVRRRKRTRHRAKRRSSGRRYK  
 TPM HSR Y SP S RPSHRGSCPKNRKT L EG N VSKRKAVRRRKRTRHRAKRRSSGRRYK

**Figure 11:** Comparaison des séquences en acides aminés déduites des séquences nucléotidiques des gènes correspondant aux protéines TP2 de souris (KLEENE et FLYNN, 1987) et de rat (LUERSEN et al., 1989).

Les séquences encadrées sont strictement identiques.

**TABLEAU VI**

Compositions en acides aminés de la protéine de transition TP3 de rat (GRIMES et al., 1977) et de la protéine 3 de bœuf (DUPRESSOIR et al., 1985).

| Acides aminés | TP3 Rat | Protéine 3 Bœuf |
|---------------|---------|-----------------|
| Asx           | 5.0*    | 5.3             |
| Thr           | 2.5     | 5.8             |
| Ser           | 10.2    | 7.2             |
| Glx           | 10.8    | 9.1             |
| Pro           | 3.3     | 5.0             |
| Gly           | 21.0    | 4.8             |
| Ala           | 4.0     | 5.6             |
| Cys           | 3.4     | 2.8             |
| Val           | 3.7     | 4.8             |
| Met           | 0.9     | 3.5             |
| Ile           | 2.0     | 0.9             |
| Leu           | 3.5     | 4.4             |
| Tyr           | 2.4     | 2.7             |
| Phe           | 0.8     | 2.0             |
| His           | n.d.    | 0.4             |
| Lys           | 1.8     | 13.7            |
| Arg           | 24.1    | 24.1            |

\*Les résultats sont exprimés en moles/100 moles

n.d : non déterminé

La protéine TP3 se caractérise par son taux élevé en résidus basiques (26 % dont 24 % d'arginine), de glycine (21 %) et de sérine (10 %), ainsi que par la présence de cystéine.

Quant à la protéine TP4, elle n'a fait l'objet que d'une caractérisation partielle (MEISTRICH *et al.*, 1980). Il s'agit, comme les trois autres protéines intermédiaires, d'une protéine basique (24 % d'arginine, 10 % d'histidine et 8 % de lysine) riche en sérine (13 %) et qui contient de la cystéine. Son poids moléculaire a été estimé à 20 KDa après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS. En gel acideurée, elle migre avant l'histone H4.

Chez le bélier, la protéine 3, caractérisée uniquement par sa composition en acides aminés (DUPRESSOIR *et al.*, 1985) ne semble pas correspondre à la protéine TP3 de rat (Tableau VI).

#### I - 2-2-2 Structure et expression des gènes des protéines TP

##### \* Gène(s) de la protéine TP1

La grande similitude observée au niveau de la structure primaire des protéines de transition de type TP1 se retrouve également au niveau des séquences nucléotidiques des gènes correspondants. La taille des ARNm (environ 600 pb) est identique chez 9 espèces de mammifères différents (homme, rat, souris, taureau, verrat, bélier, lapin, cochon d'inde et hamster (Golden et Russian) (KREMLING *et al.*, 1989). Le gène codant pour la protéine TP1 de rat renferme un intron dans la partie codante de l'extrémité C-terminale de la protéine TP1 (HEIDARAN *et al.*, 1989). L'examen de la séquence des différents ARNm indique qu'en dépit de la dégénérescence du

code génétique, en particulier pour l'arginine, la sérine et la leucine, chaque acide aminé individuel est codé par le même codon (KREMLING *et al.*, 1989). Le fait le plus intéressant est l'apparition post-méiotique des messagers. Ils sont absents des spermatocytes pachytènes mais décelables dans les spermatides rondes (KREMLING *et al.*, 1989 ; KLEENE et FLYNN, 1987 ; KLEENE *et al.*, 1983). Grâce à des études histologiques, HEIDARAN *et al.*, en 1988, ont montré que ces ARNm apparaissent durant le stade 7 de la spermiogenèse du rat. Or, la protéine TP1 n'est présente qu'aux stades 12 et 13 et disparaît rapidement après le stade 14. Ce long laps de temps, entre l'apparition des ARNm et la synthèse de la protéine, suggère donc un stockage du messenger dans le cytoplasme avant sa traduction. S'il est clair que ces messagers sont régulés au niveau traductionnel, le contrôle de la traduction de ces ARNm présents dans le cytoplasme, sous la forme de particules ribonucléoprotéiques, n'est pas encore parfaitement élucidé. Un certain nombre d'observations permettent cependant d'en avoir une idée.

Chez les animaux adultes, on a observé que le messenger était associé avec les polysomes et présentait une polyadénylation variable, typique des ARNm traductionnellement actifs, tandis que chez les jeunes animaux, le messenger était présent sous une forme non polysomale avec une polyadénylation uniforme (140 résidus environ) (HEIDARAN et KISTLER, 1987a). Ce résultat signifie donc qu'au moment de la traduction de l'ARNm une déadénylation de la queue poly (A) intervient. Une situation similaire a d'ailleurs été décrite à propos du messenger de la protéine mP1 de souris (KLEENE *et al.*, 1984).

Cependant, les preuves directes concernant un éventuel rôle de la longueur de la queue poly (A) dans la régulation de la traduction des ARNm n'ont pas encore été établies. L'hypothèse selon laquelle cette régulation serait davantage

liée à un masquage de l'ARNm par des protéines plutôt qu'à une modification covalente du messenger mérite, au même titre, une étude approfondie (HEIDARAN *et al.*, 1988). Cette régulation peut paraître plus complexe encore si l'on considère que les ARNm codant pour les protéines intermédiaires apparaissent parallèlement à ceux codant pour les protamines de type P1 et P2 dans le cas de la souris. Cela implique donc que le mécanisme de régulation des différents ARNm doit être différentiel et séquentiel (HECHT et PENSHOW, 1987).

\* *Gène(s) de la protéine TP2*

La protéine TP2 apparaît dans la cellule quelques jours après les ARNm, ce qui suggère, là encore, un stockage de ces ARNm sous la forme de particules ribonucléo-protéiques. De plus, comme pour le messenger de la protéine TP1, celui de la protéine TP2 est absent des cellules méiotiques mais apparaît en grande quantité sous la forme polyadénylée dans les cellules haploïdes jeunes. Cette queue poly (A) subit un raccourcissement lors de la traduction des ARNm.

I - 2-2-3 Rôle(s) biologique(s) éventuel(s) des protéines intermédiaires

Comme pour les variants d'histones (variants spécifiques du testicule ou variants fortement représentés dans le testicule) aucune preuve directe n'existe en faveur d'une fonction biologique des protéines TP. Cependant, il est possible d'en avoir une idée en corrélant leur apparition avec des événements cellulaires particuliers. Or, deux événements concomitants au remplacement des histones par les protéines inter-

médiateurs surviennent : la condensation de la chromatine qui perd sa structure nucléosomale et l'élongation des noyaux. Il a donc été suggéré, dans un premier temps, que les protéines intermédiaires intervenaient dans l'un de ces deux événements, voire éventuellement dans les deux.

Cependant, les résultats obtenus à partir d'études autoradiographiques (MEISTRICH *et al.*, 1981) et d'observations en microscopie optique (HEIDARAN *et al.*, 1988) montrent que le processus d'élongation des noyaux et de condensation de la chromatine est antérieur à la synthèse de la protéine TP1 qui est la première protéine spécifique des spermatides à apparaître en quantité abondante dans les noyaux.

D'autres fonctions biologiques ont été proposées. Ainsi, les protéines de transition pourraient être impliquées dans :

- le déplacement des histones avant la mise en place définitive de la ou des protamines (KISTLER *et al.*, 1974 ; KLEENE et FLYNN, 1987 ; HEIDARAN *et al.*, 1988 ; SINGH et RAO, 1987).
- l'arrêt de la transcription dans les spermatides, soit en rendant inaccessible le brin d'ADN portant l'information génétique, soit en déplaçant les composés essentiels à la transcription (GRIMES *et al.*, 1977).
- le maintien de la chromatine dans un état inactif après élimination de toutes les protéines associées à l'ADN des cellules (MEISTRICH *et al.*, 1981).
- la mise en place de la ou des protamines sur l'ADN en interagissant directement sur le complexe ADN-protamine (BALHORN *et al.*, 1984).

La pluralité des fonctions proposées pour les protéines intermédiaires montre bien que leur rôle exact n'est pas encore connu.

I - 2-3 LES PROTEINES SPECIFIQUES DES SPERMATOZOÏDES : LES  
PROTAMINES

L'apparition des protamines constitue la seconde transition protéique observée au cours de la spermiogénèse. Ces protéines apparaissent en remplacement des protéines de transition. Le nombre de protamines présentes dans le noyau des spermatozoïdes éjaculés diffère selon les mammifères :

- chez le rat, le bélier, le taureau, le verrat et le lapin, une seule protamine de type 1 (protamine P1) a été caractérisée.
- chez la souris, le hamster et l'étalon, deux protamines sont présentes, l'une de type 1, l'autre de type 2 (protamine P2).
- dans le spermatozoïde humain, où 70 % environ des protéines nucléaires basiques sont des protamines, on distingue quatre protamines, une de type 1 et trois de type 2.

I - 2-3-1 Caractéristiques structurales des protamines de  
type P1

Les protamines de mammifères de type P1 se caractérisent par un taux très élevé de résidus basiques, en particulier d'arginine (> 50 %). Elles se distinguent des autres protamines, en particulier de celles de poissons, par la présence de résidus de cystéine (15%).

La comparaison de la structure primaire des protamines P1 isolées chez le taureau (COELINGH *et al.*, 1972 ; LEE *et al.*, 1986 ; MAZRIMAS *et al.*, 1986), le verrat (TOBITA *et al.*, 1983a ;

MAIER *et al.*, 1988), le bélier (SAUTIERE *et al.*, 1984), la souris (KLEENE *et al.*, 1985), l'homme (Mc KAY *et al.*, 1985 ; GUSSE *et al.*, 1986 ; AMMER *et al.*, 1986 ; LEE *et al.*, 1987a), l'étalon (BELAÏCHE *et al.*, 1987 ; AMMER et HENSCHEN, 1987), le rat (AMMER et HENSCHEN, 1988a) et le lapin (AMMER et HENSCHEN, 1988b) montre qu'il existe un très haut degré de conservation entre ces molécules (Figure 12).

Cette étude comparative des différentes structures primaires permet de distinguer trois domaines dans la séquence de la protamine P1.

Le premier domaine correspond à la zone N-terminale (résidus 1 à 12) qui est très conservée et qui contient au moins quatre résidus hydroxylés parmi lesquels la tyrosine en position 3 et la sérine aux positions 10 et 12 sont invariables. Le deuxième domaine représente la zone centrale qui s'étend du résidu 13 au résidu 40 et qui se caractérise par sa très haute basicité et son taux élevé en résidus de cystéine. Le troisième domaine correspond à la partie C-terminale de la molécule qui, à l'inverse des autres domaines, se caractérise par sa plus grande variabilité.

#### I - 2-3-2 Caractéristiques structurales des protamines de type P2

Comme nous l'avons signalé précédemment, chez la souris (BELLVE *et al.*, 1975), le hamster (BOWER *et al.*, 1987), l'étalon (BELAÏCHE *et al.*, 1987) et l'homme (KOLK et SAMUEL, 1975 ; PONGSAWASDI et SVASTI, 1976), les protéines de transition sont remplacées à la fois par une protamine P1 et par une ou plusieurs protamines P2.



|         | 1   | 10    | 20  | 30  | 40 | 50   |     |      |       |       |     |     |      |     |   |     |    |      |
|---------|-----|-------|-----|-----|----|------|-----|------|-------|-------|-----|-----|------|-----|---|-----|----|------|
| Homme   | : A | RYRCC | RSQ | S R | SR | YYRQ | R Q | R S- | RRRRR | RSCQT | RRR | AMR | -CCR | -PR | Y | RP- | RC | RRH  |
| Taureau | : A | RYRCC | LTH | S G | SR | CRRR | R R | R RC | RRRRR | RFGRR | RRR | RV- | CCR  | --- | Y | TVI | RC | TRQ  |
| Bélier  | : A | RYRCC | LTH | S R | SR | CRRR | R R | R RC | RRRRR | RFGRR | RRR | RV- | CCR  | --- | Y | TVV | RC | TRQ  |
| Verrat  | : A | RYRCC | RSH | S R | SR | CRPR | R R | R CR | RRRRR | CCPRR | RRR | AV- | CCR  | --- | Y | TVI | RC | RRC  |
| Étalon  | : A | RYRCC | RSQ | S Q | SR | CRRR | R R | R RC | RRRRR | RSVRQ | R-R | -V- | CCR  | --- | Y | TVL | RC | RRRR |
| Souris  | : A | RYRCC | RSK | S R | SR | CRRR | R R | R CR | RRRRR | CCR   | RRR | --- | CCR  | RRS | Y | TI- | RC | KKY  |
| Rat     | : A | RYRCC | RSK | S R | SR | CRRR | R R | R CR | RRRRR | CCR   | RRR | --- | CCR  | RRS | Y | TF- | RC | KRY  |
| Lapin   | : V | RYRCC | RSQ | S R | SR | CRRR | R R | R CR | RRRRR | CCQ-- | RRR | VRK | CCR  | T-- | Y | TL- | RC | RRY  |

**Figure 12:** Comparaison des séquences en acides aminés des protamines de type P1 de l'homme (Mc KAY et al., 1985; AMMER et al., 1986; LEE et al., 1987), de taureau (COELINGH et al., 1972; LEE et al., 1986; MAZRIMAS et al., 1986), de bélier (SAUTIERE et al., 1984), de verrot (TOBITA et al., 1983a; MAIER et al., 1988), d'étalon (BELAICHE et al., 1987; AMMER et al., 1987), de souris (KLEENE et al., 1985), de rat (AMMER et al., 1988a) et de lapin (AMMER et al., 1988b). Les séquences encadrées sont strictement identiques.

La composition en acides aminés des protamines P2 se distingue de celle des protamines P1 par un taux élevé d'histidine et un taux plus faible, voire nul, de tyrosine. Cependant, la distinction P1, P2 ne peut reposer sur ce seul critère car les deux variants de la protamine 2 d'étalon sont riches en tyrosine et pauvres en histidine. Cette distinction entre le type 1 et le type 2 s'observe ensuite au niveau de la structure primaire de ces protamines. Cinq structures primaires de protamines de type 2 sont actuellement connues. Il s'agit des deux protamines humaines HP2 et HP3 (GUSSE *et al.*, 1986 ; Mc KAY *et al.*, 1986 ; AMMER *et al.*, 1986 ; DOMENJOURD *et al.*, 1988), de la protamine mP2 de souris (YELICK *et al.*, 1987 ; BELLVE, 1988) et des deux variants St2a et St2b de la protamine 2 d'étalon (PIRHONEN *et al.*, 1990) (Figure 13).

A l'inverse des protamines P1, l'extrémité N-terminale des protamines P2 est très variable alors que l'extrémité C-terminale apparaît plus conservée. La zone centrale des protamines P1 et P2 est quant à elle bien conservée et extrêmement basique. De plus, on note dans ces deux types de molécules une répartition identique des résidus de cystéine. Quant à la comparaison des structures primaires des protamines P2 (Figure 13) elle montre que la protamine mP2 de souris diffère des protamines humaines HP2 et HP3 par la longueur de sa chaîne protéique (62 acides aminés contre 57 et 54 acides aminés, respectivement).

Alors que les protamines P1 forment une classe protéique homogène, il n'en est pas de même pour les protamines P2. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, trois protamines différentes de type 2 (HP2, HP3 et HP4) sont présentes dans les spermatozoïdes humains. La composition en acides aminés de ces protamines montre une très grande similitude. La structure primaire des protamines HP2 et HP3 révèle qu'elles ne

|      |               |    |    |    |    |    |   |    |        |    |   |     |    |    |       |      |    |    |    |   |    |   |    |    |         |     |    |
|------|---------------|----|----|----|----|----|---|----|--------|----|---|-----|----|----|-------|------|----|----|----|---|----|---|----|----|---------|-----|----|
|      | 1             | 10 |    | 20 |    | 30 |   | 40 |        | 50 |   | 60  |    | 70 |       |      |    |    |    |   |    |   |    |    |         |     |    |
| HP2  | : -RTHGQSHYR- | RR | H- | CS | RR | RL | H | R  | IHRRQH | RS | C | RRR | K- | R  | RSC-- | RHRR | RH | RR | GC | R | -T | R | K- | R  | -----T  | CRR | H  |
| HP3  | : ----GQSHYR- | RR | H- | CS | RR | RL | H | R  | IHRRQH | RS | C | RRR | K- | R  | RSC-- | RHRR | RH | RR | GC | R | -T | R | K- | R  | -----T  | CRR | H  |
| mP2  | : --RGHHHRH-  | RR | -- | CS | RK | RL | H | R  | IHKR-R | RS | C | RRR | R- | R  | HSC-- | RHRR | RH | RR | GC | R | RS | R | R- | R  | RRCRCRK | CRR | HH |
| St2a | : ARTTAGSYRRY | RR | RC | CS | PR | RL | Y | R  | LRRRRY | RS | S | RRR | RR | R  | PCRRR | RHRR | VC | RR | VR | R | RR | R | -- | -- | --C---- | CRR | R  |
| St2b | : ----AGSYYSY | RR | RR | CS | PR | RL | Y | R  | LRRRRY | RS | S | RRR | RR | R  | PCRRR | RHRR | VC | RR | VR | R | RR | R | -- | -- | --C---- | CRR | R  |

**Figure 13:** Comparaison des séquences en acides aminés des protamines de type 2 humaines HP2 et HP3 (GUSSE et al., 1986; Mc KAY et al., 1986; AMMER et al., 1986; DOMENJOURD et al., 1988), de souris mP2 (YELICK et al., 1986; BELLVE, 1988) et d'étalon St2a et St2b (PIRHONEN et al., 1990).  
Les séquences encadrées sont strictement identiques.

différent que par la présence du tripeptide additionnel Arg-Thr-His du côté N-terminal de la protamine HP2. Ce résultat suggère donc un mécanisme de protéolyse permettant le passage de HP2 à HP3. Cependant, l'hypothèse de l'existence de deux gènes différents, l'un codant pour HP2 et l'autre pour HP3, ne peut être écartée. Si cette question reste posée chez l'homme, la situation semble plus claire chez la souris. En effet, la protamine mP2 est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 106 acides aminés (YELICK *et al.*, 1987). La structure primaire de ce précurseur pmP2, déduite de la séquence nucléotidique d'un clone d'ADNc montre que la protamine mP2 est obtenue après clivage de la liaison His<sub>43</sub>-Arg<sub>44</sub> du précurseur (Figure 14). L'existence de ce processus de protéolyse est en accord avec le fait que seule la protamine mP2 est retrouvée dans les spermatozoïdes éjaculés et non pas le mélange pmP2, mP2.

En outre, deux observations - l'isolement du précurseur pmP2 à partir des spermatides résistantes aux ultrasons et l'apparition de la protamine mP2 une journée après la protamine mP1, en dépit d'une synthèse simultanée - ont permis à YELICK *et al.* (1987) de postuler que le précurseur se fixe d'abord sur l'ADN avant d'être protéolysé. Il reste à déterminer si la protéolyse intervient en une ou plusieurs étapes.

Même si le variant St2a de la protamine P2 d'étalon est plus long de quatre résidus côté N-terminal que le variant St2b (PIRHONEN *et al.*, 1989), la notion de précurseur est plus difficile à soutenir car le passage de St2a à St2b par un mécanisme de protéolyse ne peut expliquer les 3 changements ponctuels observés dans les 15 premiers résidus de la molécule.

A partir des trois modèles - homme, souris, étalon - qui viennent d'être présentés, on peut apprécier l'hétérogénéité de la famille des protamines P2 et la complexité des mécanismes conduisant à leur formation.

1            10            20            30            40    ▼            50            60            70  
 pmP2 : VRYRMRS PSEGPHQPGQDHEREEQGQGLSPERVEDYGRTH RGHHHRHRRCSRKRLHRIHKRRRSCR  
  
 mP2 : ----- RGHHHRHRRCSRKRLHRIHKRRRSCR  
  
                   80            90            100  
 RRRRHSCRHRRRHRRGCRRSRRRRRCRCRKCRHHH  
  
 RRRRHSCRHRRRHRRGCRRSRRRRRCRCRKCRHHH

**Figure 14** : Structures primaires de la protamine mP2 de souris et de son précurseur pmP2 (YELICK et al., 1987).  
 Le clivage, indiqué par ▼, de la liaison peptidique His<sub>43</sub>-Arg<sub>44</sub> du précurseur pmP2 conduit à la protamine mP2 mature.

### I - 2-3-3 Modifications post-traductionnelles des protamines

Les protamines de mammifères se caractérisent essentiellement par leur richesse en arginine, en cystéine et en résidus hydroxylés. L'oxydation des groupes thiols altère la solubilité de ces protéines tandis que la phosphorylation des résidus hydroxylés, sérine essentiellement, modifie leur migration électrophorétique.

Selon leur origine , testicule ou spermatozoïde éjaculé, les protamines sont affectées à des degrés différents par ces deux modifications. En effet, les protamines issues de préparations testiculaires apparaissent en électrophorèse sur gel de polyacrylamide sous la forme de deux ou plusieurs bandes correspondant chacune à un degré de phosphorylation différent, alors que celles extraites des spermatozoïdes apparaissent sous la forme d'une seule bande. De même, le nombre de ponts disulfure établis entre les molécules de protamines isolées des spermatozoïdes éjaculés est beaucoup plus important que le nombre de ponts disulfure établis entre les protamines isolées du testicule.

Il y a donc deux événements essentiels qui interviennent au niveau des protamines : la phosphorylation-déphosphorylation des résidus de sérine et l'oxydation des résidus de cystéine pour l'établissement de ponts disulfure intra- et interchaîne.

*\* le mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation des protamines*

Quels que soient les mammifères étudiés, les protamines isolées à partir de préparations testiculaires apparaissent toutes phosphorylées. Cependant le nombre de groupes phosphate

présents par molécule varie considérablement d'une espèce à l'autre : il est de un chez le lapin, le taureau (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1978), le bélier (CHIRAT, non publié) et l'homme (GUSSE *et al.*, 1986), de deux chez la souris, le hamster et le cobaye et de quatre chez le rat (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1978 ; KISTLER *et al.*, 1976). Il est intéressant de noter que chez le rat, la forme non phosphorylée représente la fraction mineure de la protamine isolée du testicule.

La détermination du nombre de molécules de phosphate par molécule de protamine isolée à partir de différentes populations cellulaires, a montré que ce nombre était plus élevé dans les spermatides vieilles que dans les spermatides jeunes. Ce résultat tend à montrer que la phosphorylation de la protamine interviendrait après le dépôt des protamines sur la chromatine (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1975, 1978). La présence de groupements phosphate sur les molécules de protamines a deux conséquences sur le complexe protamine-ADN.

D'une part, on observe la diminution du point de fusion de l'ADN complexé avec la protamine phosphorylée. Cette diminution est d'autant plus importante que le degré de phosphorylation est élevé (WILLMITZER *et al.*, 1977).

D'autre part, la phosphorylation diminue la stoechiométrie de la formation du complexe. En effet, la clupéine Z (protamine du hareng) non phosphorylée, interagit avec l'ADN par l'intermédiaire de 21 résidus d'arginine, alors que la forme triphosphorylée n'interagit que par 15 résidus d'arginine (WILLMITZER *et al.*, 1977).

L'ensemble de ces résultats montre donc que la phosphorylation des molécules de protamine entraîne une diminution des interactions entre l'ADN chargé négativement et la protamine chargée positivement. Cette diminution des interactions

électrostatiques est confirmée par les études de dissociation du complexe protamine-ADN par les sels. En effet, chez la truite, la dissociation du complexe protamine non phosphorylée-ADN, nécessite une concentration en NaCl comprise entre 0,9 M et 1,2 M, alors que la dissociation du complexe protamine phosphorylée-ADN ne nécessite qu'une concentration en NaCl comprise entre 0,6 M et 0,9 M (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1978). Deux hypothèses ont été émises pour expliquer ces résultats. La première serait que la phosphorylation entraîne un raccourcissement des molécules de protamines du fait de la formation de boucles résultant des répulsions électrostatiques entre les phosphates des protamines et ceux de l'ADN. Cette hypothèse expliquerait donc la stoechiométrie du complexe protamine-ADN. La seconde serait que la zone N-terminale des protamines P1 particulièrement affectée par la phosphorylation, n'interagit plus avec l'ADN. La zone d'ADN non couverte pourrait donc l'être par une autre molécule de protamine provenant d'un sillon adjacent, créant ainsi un véritable réseau de mailles dans le noyau. Ces deux hypothèses ont été proposées par WILLMITZER *et al.* en 1977. Aucun argument en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses n'a pu être apporté à ce jour.

Plusieurs fonctions biologiques de la phosphorylation ont également été proposées. La phosphorylation pourrait être impliquée soit dans le transport des protéines basiques, de leur site de synthèse vers le noyau (INGLES *et al.*, 1967), soit dans le positionnement correct des protamines sur l'ADN (sur le petit ou le grand sillon par exemple) afin de permettre la formation correcte des ponts disulfure (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1975, 1978).



D'une façon générale, lors du transit épидидymaire des spermatozoïdes, on observe chez tous les mammifères une déphosphorylation complète des protamines, excepté chez l'homme où les protamines P1 et P2 sont encore partiellement phosphorylées dans les spermatozoïdes éjaculés (BELLVE *et al.*, 1975 ; GUSSE *et al.*, 1986 ; PRUSLIN *et al.*, 1987).

\* *Formation des ponts disulfure*

Le nombre de ponts disulfure qui se forment dans le testicule entre les protamines est faible. Par contre, durant le transport épидидymaire et parallèlement à la déphosphorylation, ce nombre augmente. Cela a été montré en faisant agir sur les noyaux des spermatozoïdes, prélevés à différents endroits de l'épididyme, de l'iodoacétamide non marqué. Ces noyaux étaient ensuite réduits et alkylés par de l'iodoacétamide marqué au carbone 14 (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1975). Ces auteurs ont montré que la radioactivité était beaucoup plus importante au niveau de la partie distale de l'épididyme qu'au niveau de la partie proximale. L'utilisation d'iodoacétamide marqué au carbone 14 a permis de déterminer qu'il y avait 5,3 molécules de cystéine marquée après réduction et alkylation. Ainsi, tous les résidus de cystéine sont engagés dans des ponts disulfure (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1974). Ces résultats montrent bien que durant le transit épидидymaire, le nombre de ponts disulfure augmente.

On peut se demander pourquoi les ponts disulfure ne s'établissent pas dès la synthèse des molécules de protamine. Pour expliquer ce fait, CALVIN, en 1976, a proposé que l'environnement très basique des résidus de cystéine pouvait entraîner une ionisation de leur fonction thiol sous la forme  $\text{Cys-S}^-$ , apportant ainsi d'autres charges négatives sur les molécules de protamine.

L'interaction ultérieure des protamines avec l'ADN entraînerait une neutralisation des charges positives des groupes guanidinium des résidus d'arginine et une restitution des groupes thiol qui pourraient alors être oxydés sous la forme de ponts disulfure.

Quoique l'on ne connaisse pas encore les positions respectives des résidus de cystéine impliqués dans chaque pont disulfure, il est cependant possible, grâce aux travaux de TOBITA *et al.* (1983b), de se faire une idée relativement précise sur l'ordre d'établissement de ces ponts. Ces auteurs ont étudié, à partir de noyaux de spermatozoïdes éjaculés de ver rat, la sensibilité des ponts disulfure à la réduction en fonction du temps et du rapport molaire réducteur/protamine.

Les compositions en acides aminés des différents peptides obtenus après alkylation des protamines suivie d'un clivage enzymatique, ont montré qu'il était possible de classer les ponts disulfure en trois catégories :

- les ponts sensibles, situés dans la partie N-terminale de la protamine (cystéines 5 et 6).
- les ponts insensibles, situés dans la partie C-terminale (cystéines 47 et 50).
- les ponts de sensibilité inhabituelle, situés dans la zone centrale de la molécule (cystéines 14,21,38 et 39).

L'insensibilité des ponts S-S dans la partie C-terminale suggère donc qu'ils sont enfouis à l'intérieur de la chromatine et qu'ils sont probablement formés au début de la phase d'empaquetage de la chromatine. A l'inverse, les ponts S-S les plus sensibles, dans les séquences polyarginine où sont impliqués les résidus de cystéine 28 et 29 (l'un et l'autre absents chez le taureau), sont probablement formés au stade final de l'empaquetage de la chromatine.

Si les preuves directes manquent encore pour déterminer avec précision le rôle de ces ponts disulfure, chacun s'accorde à penser qu'ils sont impliqués dans le maintien de la chromatine dans son état de compaction maximale et qu'ils assurent donc la protection de l'information génétique vis-à-vis des DNases (CALVIN, 1976).

Pour expliquer la compaction extrême de la chromatine lors de la phase finale de la spermiogenèse, trois événements sont donc à prendre en compte. Il s'agit de l'apparition des protamines dans les noyaux, du mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation des résidus hydroxylés et de l'établissement des ponts disulfure. Le seul modèle disponible à ce jour qui relie entre eux ces trois événements chez les mammifères, reste le modèle de BALHORN (1982).

#### I - 2-3-4 Structure du complexe nucléoprotamine

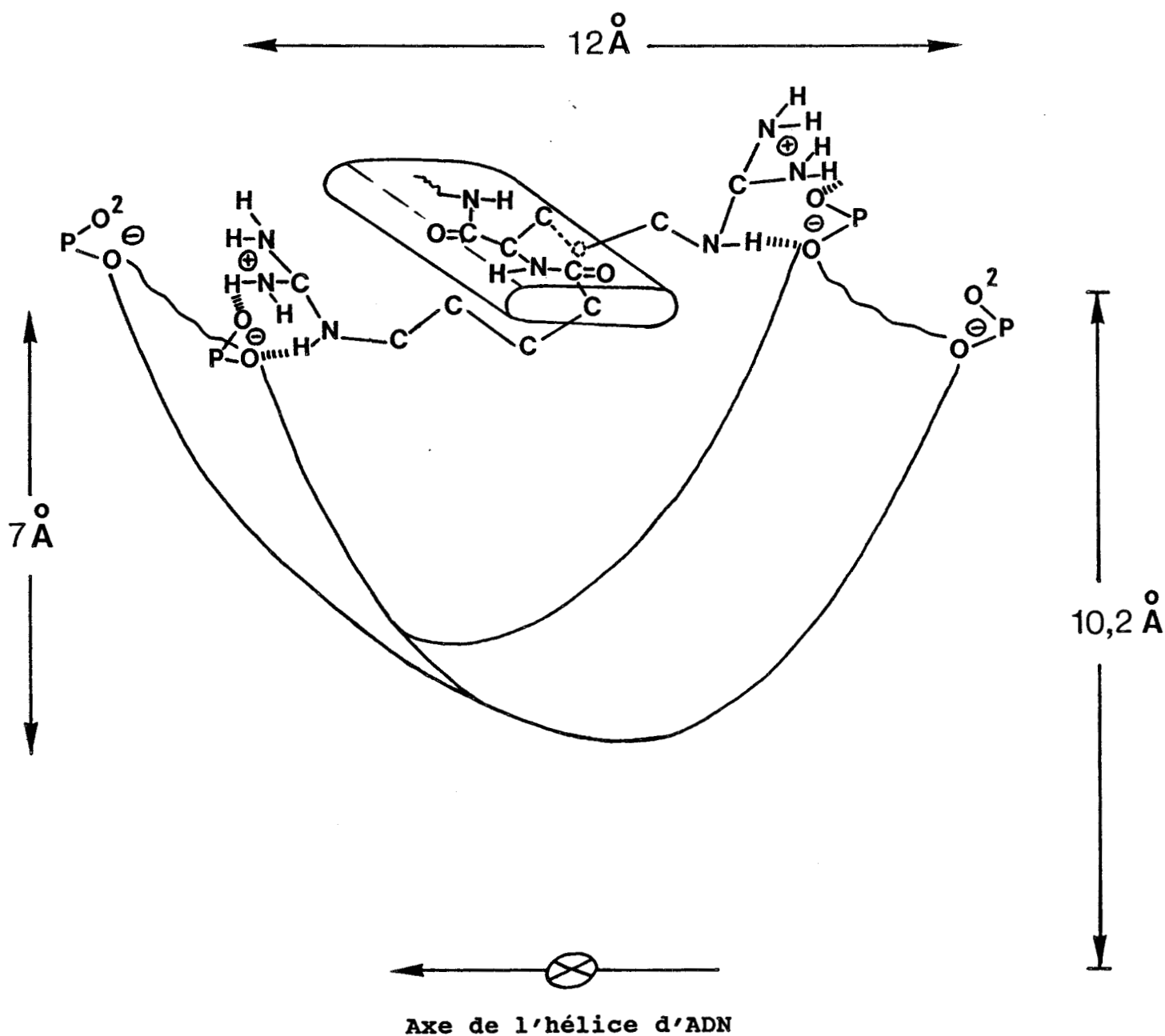
##### \* *Le modèle de BALHORN*

Ce modèle a été proposé en 1982 à partir de la séquence en acides aminés de la protamine de taureau déterminée par COELINGH *et al.* (1972). Récemment, une correction a été apportée à cette séquence par MAZRIMAS *et al.* (1986). La séquence corrigée diffère de la précédente par le tripeptide Cys<sub>39</sub>-Arg-Arg<sub>41</sub>. Nous ne retiendrons donc pas dans la présentation du modèle de BALHORN les aspects qui se trouvent remis en question par cette correction.

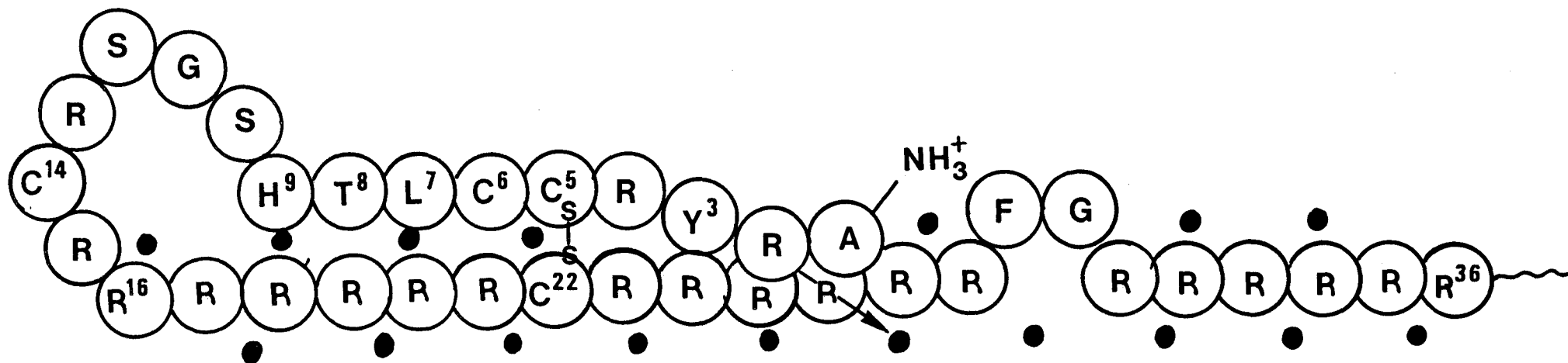
L'un des aspects fondamentaux de ce modèle, qui implique la fixation de toutes les molécules de protamine sur l'ADN, est que la séquence centrale polyarginine adopte une conformation étendue et se lie à l'ADN dans le sillon mineur (BALHORN, 1982).

La liaison peptidique étant plane, les radicaux guanidinium de deux résidus d'arginine adjacents sont projetés de part et d'autre du plan. Ainsi un groupe guanidinium se fixe sur un brin d'ADN alors que l'autre se fixe sur le brin opposé par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques et de liaisons hydrogène (Figure 15). Ces différentes interactions entraînent une diminution de l'angle O-P-O, ce qui a pour conséquence de faire passer l'ADN d'une conformation B à une conformation B\*, comme cela a été observé dans les différents complexes protamine-ADN étudiés (HERSKOVITS et BRAHMS, 1976). La phosphorylation des résidus hydroxylés dans la séquence N-terminale (résidus 1 à 15) qui se caractérise par sa relative pauvreté en arginine, entraîne un repliement de cette région au-dessus du segment polyarginine lié à l'ADN, ce qui permet aux deux résidus d'arginine en position 2 et 4 respectivement, de se lier avec deux groupes phosphate restés libres sur l'ADN (Figure 16). Après fixation de ces résidus d'arginine, les résidus hydroxylés sont alors déphosphorylés. Du fait de ce repliement, la cystéine 5 est amenée à proximité de la cystéine 22, ce qui permet la formation d'un premier pont disulfure intrachaine (Figure 16). La séquence de ces différentes étapes est présentée dans la figure 17.

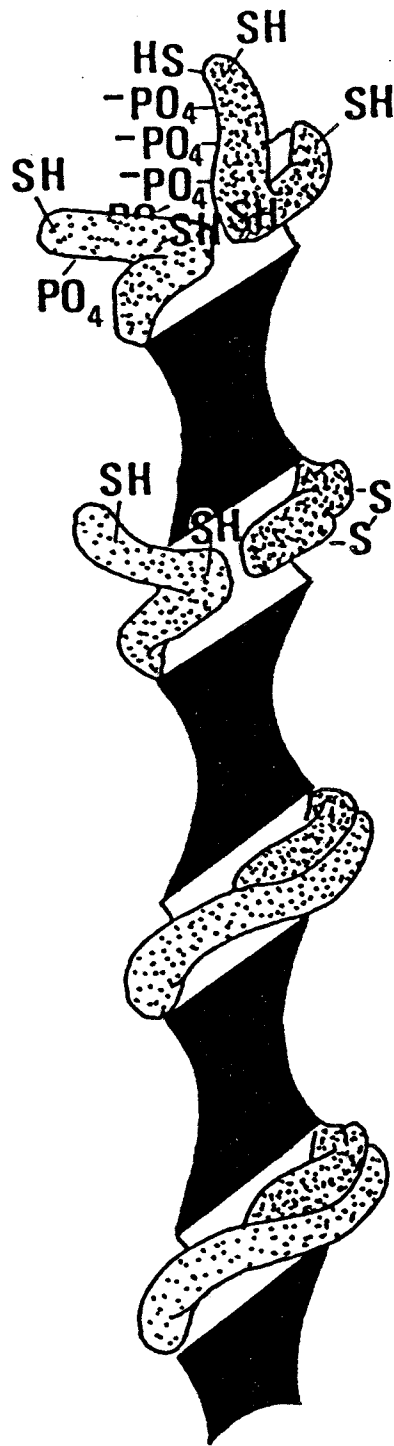
La cystéine 38 ou la cystéine 39 d'une molécule de protamine peut ensuite réagir avec la cystéine 14 pour former un second pont disulfure qui lui, est interchaîne. En ce qui concerne les liaisons hydrogène et hydrophobes qui pourraient s'établir entre certains résidus de la région C-terminale, au delà du résidu de cystéine 39, et de la région N-terminale d'une molécule voisine de protamine, les propositions de BALHORN doivent être complètement reconsidérées.



**Figure 15** : Représentation schématique des interactions électrostatiques entre les groupes guanidinium des arginines et les groupes phosphate de l'ADN selon BALHORN (1982). La liaison peptidique étant plane, les radicaux guanidinium de 2 résidus d'arginine adjacents sont projetés de part et d'autre du plan. Ainsi, un groupe guanidinium se fixe sur un brin d'ADN alors que l'autre se fixe sur le brin opposé.



**Figure 16** : Représentation schématique du repliement de l'extrémité N-terminale de la protamine P1 de taureau sur le segment polyarginine selon BALHORN (1982).  
 La phosphorylation des résidus hydroxylés de la zone N-terminale de la protamine entraînerait un repliement de cette région au-dessus du segment polyarginine lié à l'ADN. Les résidus d'arginine en position 2 et 4 se lient avec 2 groupements phosphate de l'ADN alors que les 2 cystéines en position 5 et 22 sont amenées à proximité l'une de l'autre. Ce rapprochement permet l'établissement d'un premier pont disulfure intrachaine.



**Figure 17** : Représentation schématique des 3 étapes conduisant au complexe nucléoprotamine selon BALHORN (1982):

- Dépôt des molécules de protamines phosphorylées dans le sillon mineur de l'ADN.
- Déphosphorylation des résidus hydroxylés (sérine, thréonine) de la région N-terminale des protamines.
- Etablissement des différents ponts disulfure intra- et interchaînes.

Chaque protamine est donc liée à sa voisine par un pont disulfure, bloquant ainsi la protamine autour de l'ADN. Dès lors que sont complètement neutralisés les groupes phosphate de l'ADN, la disparition de la répulsion électrostatique entre les chaînes entraîne une compaction de l'ADN (Figure 18).

Pour réduire le volume du complexe ADN-protamine à son minimum, la portion de protamine saillante du sillon mineur (incluant les segments N- et C-terminaux qui interagissent avec la séquence polyarginine) est positionnée dans le sillon majeur d'une molécule d'ADN adjacente.

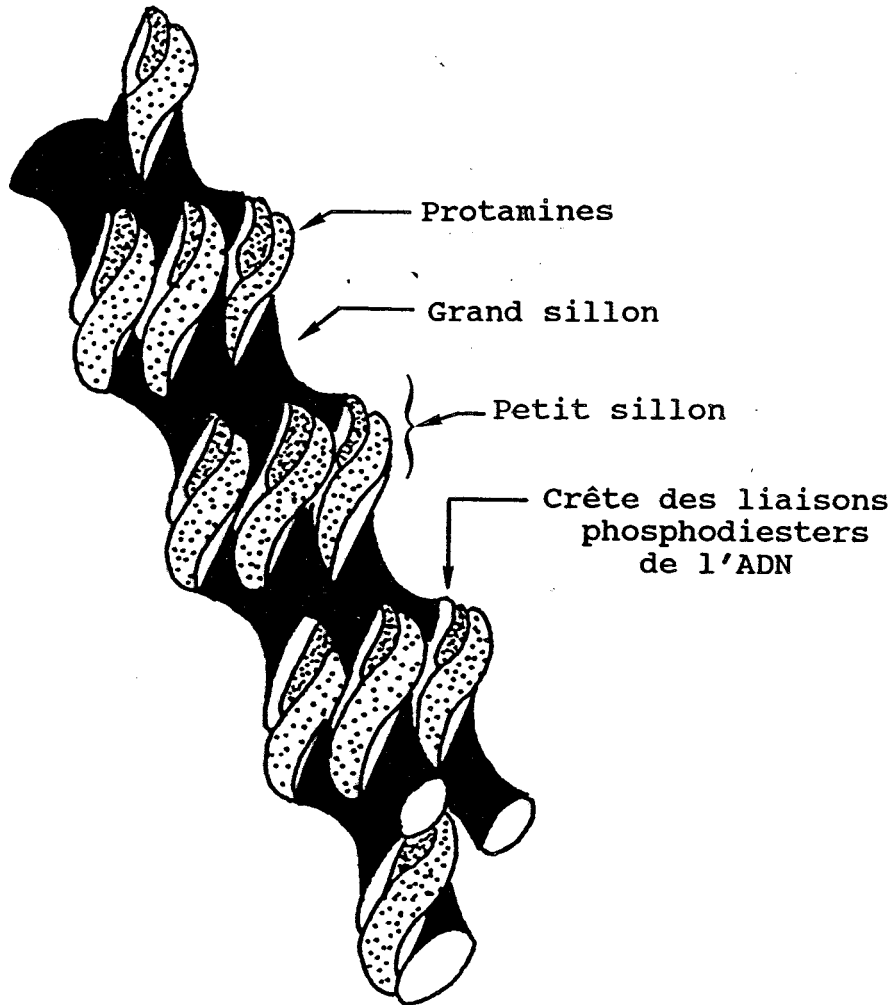
\* *Discussions autour du modèle de BALHORN*

Le modèle que nous venons de présenter est séduisant car il tient compte à la fois des interactions électrostatiques entre les résidus d'arginine et les groupes phosphate de l'ADN, de la phosphorylation des résidus hydroxylés et de l'établissement de ponts disulfure entre les molécules de protamine. Il repose sur deux postulats essentiels :

- la fixation des molécules de protamine dans le sillon mineur de l'ADN.
- la conformation étendue de la protamine, ce qui permet à celle-ci d'établir de nombreuses liaisons avec le squelette phosphodiester de l'ADN.

L'utilisation de sulfate de diméthyle qui permet la méthylation de l'azote 7 de la guanine dans le sillon majeur et la méthylation de l'azote 3 dans le sillon mineur a permis de montrer que les molécules de protamine associées à l'ADN inhibaient la méthylation de l'azote 7. Ce résultat suggère donc une fixation des molécules de protamine dans le sillon majeur de l'ADN (MIRZABEKOV *et al.*, 1977), et remet ainsi en question le premier postulat du modèle de BALHORN.





**Figure 18** : Après la formation des différents ponts disulfure, chaque molécule de protamine se trouve liée à sa voisine par un pont disulfure. La neutralisation complète des groupes phosphate entraîne la disparition de la répulsion électrostatique entre les chaînes et la compaction de l'ADN (BALHORN, 1982).

De même, à partir d'un modèle théorique d'interactions protamine-ADN selon lequel la protamine se fixerait dans le grand sillon de l'ADN, FITA *et al.* en 1983 ont montré qu'il y avait un accord parfait entre les valeurs d'intensités réfractées théoriques et celles obtenues expérimentalement par diffraction des rayons X.

Le second postulat du modèle de BALHORN se trouve également remis en question par les travaux de AUSIO *et al.* en 1984 qui ont montré, sur la base de la dissociation des complexes ADN-thynnine par les sels, qu'il n'y avait que quatre liaisons électrostatiques pleines entre les protamines et l'ADN. Ce résultat contraste donc avec celui obtenu à partir du modèle proposé chez les mammifères ( $\sim 20$  liaisons électrostatiques).

L'ensemble de ces données expérimentales montre d'une façon claire que les modalités d'interactions entre la protamine et l'ADN sont loin d'être connues. Or, ces modalités apparaissent essentielles pour comprendre la compaction de la chromatine et éventuellement pour expliquer des anomalies de condensation de la chromatine observées chez certains sujets infertiles.

#### I - 2-3-5 Expression et régulation des gènes de protamines

##### \* Gènes de protamine P1

Comme les gènes des protéines de transition TP1, ceux des protamines P1 contiennent un intron d'environ 90 nucléotides (KRAWETZ *et al.*, 1988, 1989 ; JOHNSON *et al.*, 1988a). Cet intron, séparant l'extrémité C-terminale de la protamine du reste de la molécule, conférerait une stabilité aux ARNm de protamine grâce à sa richesse en GC (KRAWETZ *et al.*, 1988).

Chez l'homme, il n'y a qu'une seule copie des gènes de protamines et ces gènes sont localisés sur le chromosome 16 (KRAWETZ *et al.*, 1989 ; VIGUIE *et al.*, 1990), comme pour la souris (HECHT *et al.*, 1986).

Les gènes des protamines P1 sont exprimés pendant la phase haploïde de la spermatogenèse comme ceux des protéines de transition TP1. En effet, chez le rat, les ARNm apparaissent pour la première fois dans les testicules d'animaux âgés de 35 jours. Des observations réalisées en microscopie sur des coupes testiculaires, il ressort qu'à cet âge, 10 à 15 % des cellules spermatogoniales sont composées de spermatides (KLEMM *et al.*, 1989). La même corrélation entre l'apparition des premières spermatides et l'apparition des ARNm de protamine P1 a également été faite chez le taureau (LEE *et al.*, 1987b). Cette spécificité cellulaire a été confirmée en préparant des populations cellulaires enrichies, d'une part en spermatocytes pachytènes et d'autre part, en spermatides. Aucun ARNm de protamine P1 n'a pu être détecté dans les spermatocytes pachytènes (LEE *et al.*, 1987b) alors que ce messager est détecté dans les spermatides.

De grandes quantités d'ARNm sont présentes sous la forme de particules ribonucléoprotéiques (RNP) dans le cytoplasme des spermatides rondes de souris où la synthèse de protamine de type P1 n'a pas encore eu lieu. La moitié de ces ARNm sont présents sous la forme polysomale dans les spermatides en voie d'élongation où la protamine P1 de souris peut être détectée. Ces observations militent en faveur de la régulation traductionnelle des ARNm de la protamine P1 (KLEENE *et al.*, 1983, 1984). Les ARNm sont stockés pendant 2 à 8 jours dans les spermatides de souris.

Comme cela avait déjà été observé pour les protéines de transition TP1, les ARNm codant pour la protamine P1 apparaissent sous deux tailles différentes (KLEENE *et al.*, 1984 ; KLEMM

*et al.*, 1989 ; KRAWETZ *et al.*, 1989). Les ARNm non polysomaux ont une taille d'environ 600 nucléotides alors que les ARNm polysomaux ont une taille d'environ 500 nucléotides. Cette différence est due à un raccourcissement de la queue poly (A) jusqu'à environ 30 nucléotides (KLEENE *et al.*, 1984).

La polyadénylation des ARNm intervient particulièrement au niveau des spermatides. En effet, le taux de polyadénylation des ARNm dans les spermatides est deux fois plus élevé que dans les spermatocytes pachytènes et six à neuf fois plus élevé que dans les cellules somatiques (KLEENE *et al.*, 1983). Par ailleurs, la déadénylation partielle apparaît comme un phénomène qui affecte l'ARNm des protéines traduites durant la spermiogenèse des mammifères comme par exemple les  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubulines ou encore les actines cytoplasmiques (KLEENE *et al.*, 1983).

Si certains auteurs pensent que cette réduction de la queue poly (A) peut constituer le signal de traduction des ARNm, on ne sait toujours pas si cette déadénylation est en fait une cause ou une conséquence de la traduction.

La construction de gènes de fusion entre le gène de la protamine mP1 de souris et le gène de l'hormone de croissance humaine, et l'étude de leur expression dans des souris transgéniques ont permis de montrer que :

- l'extrémité 5' des gènes de la protamine mP1 de souris serait impliquée dans leur expression spécifique dans les spermatides,
- 156 nucléotides de la séquence 3'OH non traduite du gène de mP1 seraient responsables de la régulation de la traduction des ARNm de la protamine mP1 (BRAUN *et al.*, 1989).

Cependant, d'autres facteurs pourraient intervenir dans la régulation traductionnelle des ARNm comme par exemple la structure secondaire des ARNm (KRAWETZ *et al.*, 1988).

\* Gènes de protamine P2

Alors que le gène de la protamine P1 est exprimé chez tous les mammifères, le gène de la protamine P2 est exprimé seulement chez l'homme, le hamster, la souris et l'étalon. Chez la souris, la protamine P2 est en quantité deux fois plus importante que la protamine P1 (BALHORN *et al.*, 1984 ; JOHNSON *et al.*, 1988a). Ce gène, comme celui de la protamine P1 contient un intron d'environ 105 nucléotides (JOHNSON *et al.*, 1988a). Chez l'homme, le gène de la protamine P2 est localisé sur le chromosome 16, comme le gène de la protamine P1 (VIGUIE *et al.*, 1990).

Des études d'hybridation avec l'ADNc de la protamine 2 de souris ont montré que le gène de la protamine P2 était transcrit chez le rat (BOWER *et al.*, 1987 ; JOHNSON *et al.*, 1988a ; BUNICK *et al.*, 1990), le hamster (BOWER *et al.*, 1987) mais également chez le porc, le taureau, le singe, le bélier, le chat (MAIER *et al.*, 1990) et le chien (JOHNSON *et al.*, 1988b). Chez le rat et le hamster, BOWER *et al.* (1987) ont montré par la technique de Northern blot que l'ARNm était présent au niveau des polysomes. La séquence en acides aminés de la protamine 2 de rat, déduite de la séquence nucléotidique du gène correspondant, a montré un haut degré de similitude avec la protamine mP2 de souris (TANHAUSER et HECHT, 1989). Mais il faut rappeler que la protamine P2 de rat n'a jamais été observée dans les spermatozoïdes de rat.

Comparé au taux d'ARNm de la protamine mP2 de souris, le taux d'ARNm de la protamine P2 est cinq fois plus faible chez le hamster et cinquante fois plus faible chez le rat (BOWER *et al.*, 1987). Pour certains auteurs, l'absence de protamine P2 chez certaines espèces est difficilement explicable par le taux très faible de transcription des gènes correspondants. L'existence d'une seule protamine dans le spermatozoïde de certains mammifères a suscité plusieurs hypothèses. Ainsi chez le rat, la séquence de la protamine P2 déduite de la séquence nucléotidique d'un ADNc (KLEMM *et al.*, 1989) a montré la présence d'un résidu d'acide glutamique en position 43 dans

le précurseur . Or dans la séquence du précurseur de la protamine P2 de souris, le résidu d'histidine que l'on trouve en position 43 est le site de clivage du précurseur, clivage qui permet la libération de la protamine P2.

Chez le rat, la substitution His → Glu pourrait donc inhiber le clivage du précurseur prP2 et par voie de conséquence la libération de la protamine rP2 (BUNICK *et al.*, 1990).

Chez le vererrat, on a remarqué que la séquence Arg-Leu-His-Arg-Ile-His était absente. La non fonctionnalité de la protamine P2 chez cet animal, résulterait à la fois de l'absence de cette séquence et des très nombreux remplacements de résidus basiques par des acides aminés neutres ou hydrophobes (MAIER *et al.*, 1990).

Le rôle de la protamine P2 reste à définir.

#### I - 2-4 CAS PARTICULIER : LA SPERMATOGENESE HUMAINE

Chez l'homme, en plus des protamines présentes dans le spermatozoïde éjaculé, on trouve cinq protéines nommées HPI1, HPI2, HPI3, HPS1, HPS2, qui représentent 10 à 15 % des protéines nucléaires basiques totales et dont la mobilité électrophorétique en gel de polyacrylamide, la taille et le taux de résidus basiques apparaissent intermédiaires entre ceux des histones et des protamines (GUSSE *et al.*, 1986) (Tableau VII). Pour ces raisons ces protéines ont été nommées protéines intermédiaires. Cette dénomination peut cependant prêter à confusion avec les protéines de transition décrites précédemment et qui sont aussi appelées protéines intermédiaires ou encore protéines spécifiques des spermatides. En effet, les protéines

**TABLEAU VII**

Compositions en acides aminés des 5 protéines intermédiaires HPI1, HPI2, HPI3, HPS1 et HPS2 isolées du spermatozoïde humain (GUSSE et al., 1986).

| Acides<br>aminés | Protéines |      |      |      |      |
|------------------|-----------|------|------|------|------|
|                  | HPI1      | HPI2 | HPI3 | HPS1 | HPS2 |
| Asx              | 0.8*      | 0.9  | 2.2  | -    | -    |
| Thr              | 3.2       | 3.4  | 3.7  | 4.0  | 4.2  |
| Ser              | 7.9       | 6.2  | 8.9  | 6.3  | 5.8  |
| Glx              | 13.0      | 11.5 | 10.0 | 9.8  | 8.3  |
| Pro              | 1.8       | 2.0  | 2.8  | 2.3  | 1.9  |
| Gly              | 6.1       | 4.9  | 6.8  | 5.4  | 3.2  |
| Ala              | 1.3       | 1.7  | 2.5  | -    | -    |
| Cys              | 6.1       | 8.7  | 7.8  | 7.8  | 9.2  |
| Val              | 3.4       | 2.7  | 2.2  | 2.9  | 3.0  |
| Met              | 0.8       | -    | 0.7  | -    | -    |
| Ile              | 0.8       | 0.9  | 1.1  | 1.3  | 1.3  |
| Leu              | 3.4       | 2.4  | 2.1  | 2.8  | 1.5  |
| Tyr              | 3.5       | 3.8  | 3.8  | 3.2  | 3.4  |
| Phe              | -         | -    | -    | -    | -    |
| His              | 10.9      | 9.5  | 8.7  | 13.6 | 14.3 |
| Lys              | 1.6       | 3.2  | 2.4  | 3.0  | 2.7  |
| Arg              | 35.3      | 37.9 | 34.0 | 37.3 | 40.5 |

\*Les résultats sont exprimés en moles/100 moles

intermédiaires isolées des spermatozoïdes humains correspondent en réalité à des pro-protamines alors que chez les autres mammifères, les protéines intermédiaires n'ont aucune parenté structurale avec les protamines.

Les protéines intermédiaires des spermatozoïdes humains sont riches en arginine (34 à 40 %), histidine (9 à 14 %), acide glutamique/glutamine (8 à 13 %) et cystéine (6 à 9 %). (Tableau VII).

Les données structurales acquises sur les protéines HPI1, HPS1 et HPS2 à partir de leur composition en acides aminés, de leur séquence amino-terminale et de l'analyse électrophorétique de leurs fragments obtenus après hydrolyse par l'endoprotéinase Lys-C et l'endoprotéinase Glu-C indiquent sans ambiguïté que ces protéines peuvent être considérées comme des précurseurs des protamines HP2 et HP3 (SAUTIERE *et al.*, 1988 ; MARTINAGE *et al.*, 1989, 1990 ; CHEVAILLIER *et al.*, 1990) (Figure 19).

Par ailleurs, il reste à caractériser les protéines HPI2 et HPI3 du spermatozoïde humain qui pourraient constituer des formes intermédiaires entre HPI1 et HPS1. La caractérisation ultérieure des protéases, vraisemblablement impliquées dans ce processus de maturation, devrait permettre de savoir si la protéolyse procède selon un mécanisme ordonné ou aléatoire.

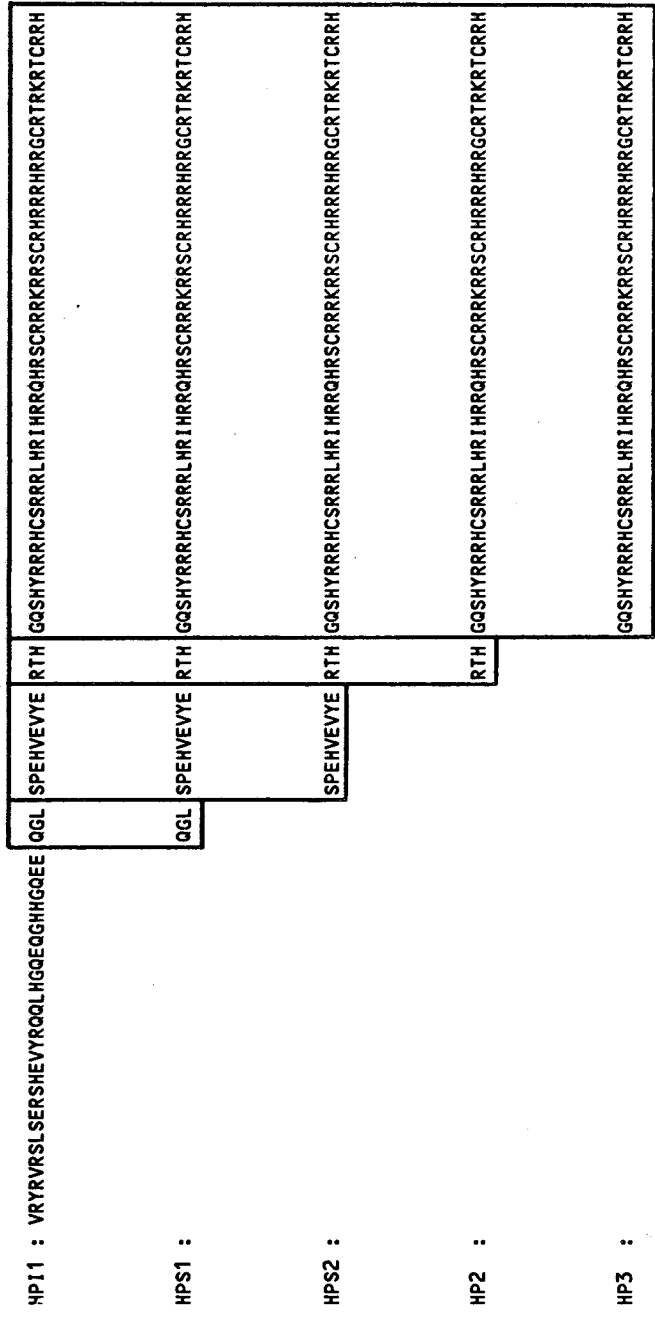
En conclusion, tandis que le spermatozoïde éjaculé de la plupart des mammifères renferme une ou deux protamines non phosphorylées, le spermatozoïde humain contient une grande diversité de protéines nucléaires basiques (PUWARAVUTIPANICH et PANYIM, 1975). On y trouve en effet :

- des histones de type somatique ainsi que le variant TH2B (20 %).



HP11 : VRYR VRS L SE RS H EYR Q QLHGQ EQG HGGQEE QGLSPE H VE V Y E RTH GQS H YR R RH- CSR R RLHRTH R R QH RSCRRR K R R SCRHRHRHRGCR TRK R T----- CRRH  
 pmp2 : VRYR MRS L P SE GP H QGPG Q DHERE EQG QG---- QGLSPE R VE D Y G RTH RGH N HH R HRR CSR K RLHRTH K R R- RSCRRR R R H SCRHRHRHRGCR RSR R RRCRCRK CRRH HH

a



b

**Figure 19 :** a. Comparaison des séquences en acides aminés du précurseur HPI1 de la protamine 2 humaine (MARTINAGE et al., 1990) et du précurseur pmp2 de la protamine 2 de souris (YELICK et al., 1987).  
 b. Schéma montrant les relations structurales entre les protamines HP2, HP3 et les précurseurs HPI1, HPS1 et HPS2 (MARTINAGE et al., 1990).

- cinq protéines intermédiaires (10 %).
- quatre protamines (70 %) (une de type P1, trois de type P2) dont deux sont encore partiellement phosphorylées (HP1 et HP2).

La spermatogenèse humaine apparaît donc incomplète.

#### I - 2-5 MECANISME(S) POSSIBLE(S) DES DIFFERENTES TRANSITIONS PROTEIQUES

Nous venons de présenter d'une façon qui se voulait exhaustive, les caractéristiques structurales des différentes protéines nucléaires basiques identifiées lors des deux transitions protéiques qui interviennent dans la spermiogenèse des mammifères.

La question que l'on peut se poser maintenant est de savoir quels sont les mécanismes impliqués dans ces différentes transitions protéiques. Ces mécanismes sont au nombre de trois.

Le premier correspond aux modifications post-traductionnelles des histones : la phosphorylation des résidus de sérine de l'histone H1 (MARUSHIGE *et al.*, 1969) et l'acétylation des groupes  $\epsilon$  NH<sub>2</sub> de la lysine. Cette dernière modification, bien étudiée chez le rat, affecte particulièrement l'histone H4 qui est hyperacétylée dans les spermatides en élongation (GRIMES *et al.*, 1983). Cette hyperacétylation précède de peu l'élimination de toutes les histones. Ce mécanisme ne peut expliquer à lui seul le remplacement complet des histones.

Le second mécanisme pourrait être un mécanisme de compétition entre les histones et les protéines de transition pour leur interaction avec l'ADN comme cela a été évoqué par WONG et MARUSHIGE en 1975 concernant le déplacement direct des histones de la chromatine par les protamines. La compétition entre ces deux

types de protéines est due à la différence dans leur richesse en arginine : les protéines de transition ont un taux d'arginine supérieur à celui des histones. Or cet acide aminé a une grande affinité pour l'ADN avec lequel il peut établir, outre les liaisons électrostatiques, cinq liaisons de type hydrogène tandis que la lysine ne peut en établir que deux (AUSIO *et al.*, 1984). Ceci suggère que la richesse en arginine des protéines de transition favorise leur interaction avec l'ADN au détriment de celle des histones.

Enfin, la mise en évidence de petits peptides basiques dans le noyau suggère l'existence d'un mécanisme de protéolyse des histones (MARUSHIGE *et al.*, 1978). Les protéases impliquées dans ce mécanisme ont fait l'objet d'études dont les résultats sont contradictoires. Selon BODE *et al.* (1977), ces protéases ne seraient pas d'origine nucléaire, mais plutôt mitochondriale. A l'opposé, les travaux de MARUSHIGE et MARUSHIGE (1983) ont démontré que l'activité protéolytique ne provenait pas de l'acrosine mais qu'elle était fortement liée à la chromatine. Ces auteurs ont suggéré que la protéase hydrolyserait préférentiellement les histones acétylées et qu'elle existerait dans d'autres tissus tels que le foie, mais sous forme inactive.

En conclusion, les modifications post-traductionnelles des histones, l'affinité supérieure des protéines de transition pour la fixation sur l'ADN et la protéolyse des histones pourraient expliquer le remplacement de celles-ci par les protéines de transition.

En ce qui concerne le remplacement des protéines de transition par les protamines, on peut envisager des mécanismes similaires à ceux qui sont impliqués dans le remplacement des histones par les protéines de transition, mais des arguments solides à l'appui de ces hypothèses font encore défaut. De nombreuses questions restent donc posées concernant le mécanisme intime de ces transitions.

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

En 1985, après avoir élucidé la structure primaire complète de la protamine de bélier (*Ovis aries*) isolée des spermatozoïdes éjaculés (SAUTIERE *et al.*, 1984), notre laboratoire s'est intéressé aux protéines intermédiaires présentes dans les spermatides de bélier. Quatre protéines intermédiaires, nommées P1, 3, 7 et T ont été caractérisées (DUPRESSOIR *et al.*, 1985).

La comparaison des compositions en acides aminés des protéines intermédiaires isolées du testicule de bélier avec celles des autres protéines intermédiaires isolées à partir des testicules d'autres mammifères a montré que la protéine T du bélier appartenait à la famille des protéines de transition de type TP1 et que la protéine P1 de bélier appartenait à la famille des protéines de transition de type TP2.

Quant à la protéine 3 de bélier, elle ne présente aucune similitude de composition en acides aminés avec la protéine de type TP3 décrite chez le rat (GRIMES *et al.*, 1977). Enfin, aucune étude structurale valable n'a pu être entreprise sur la protéine 7 : cette protéine préparée par chromatographie d'échange d'ions est obtenue fortement contaminée par la forme diphosphorylée de la protéine T (TP1).

Nos travaux, présentés dans cette thèse, concernent l'étude de la structure primaire des protéines TP1, TP2 et 3. Ainsi, la séquence complète en acides aminés de la protéine TP1 de bélier a été établie et les sites de phosphorylation de la forme monophosphorylée de cette protéine ont été identifiés.

Quant aux études structurales des protéines 3 et TP2, elles n'ont pu être menées à leur terme en raison des difficultés qui ont été évoquées au début de ce mémoire.

## II - 1 MATÉRIELS ET MÉTHODES

### II - 1-1 PREPARATION DES PROTEINES

Les testicules de bélier sexuellement mature ont été obtenus à la Station de Fertilité mâle de l'INRA à Nouzilly-Tours. Immédiatement après excision, ils ont été congelés dans l'azote liquide, puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le protocole opératoire utilisé comprend deux étapes : la préparation des noyaux et l'extraction des protéines nucléaires basiques (DUPRESSOIR *et al.*, 1985).

L'extraction des protéines s'effectue elle-même en deux étapes. La première correspond à l'extraction des histones par HCl 0,4 M et la seconde correspond à l'extraction des protéines intermédiaires (TP1, TP2, 3 et 7) et de la protamine.

Sur un critère de solubilité dans l'acide perchlorique 0,75 M, on distingue les protéines intermédiaires PCA-solubles (protéine 7 et protéine TP1) et les protéines intermédiaires PCA insolubles (protéines TP2 et 3). La protamine est retrouvée dans cette dernière fraction.

Une modification a cependant été apportée à ce protocole : il s'agit de l'addition d'iodoacétamide (concentration finale 10 mM) dans tous les tampons (LOIR et LANNEAU, 1984).

## II - 1-2 REDUCTION-ALKYLATION DES PROTEINES

Les protéines intermédiaires (PCA solubles et insolubles) et la protamine sont dissoutes dans la solution suivante : Tris/HCl 0,1 M pH 8.0, GuCl 6 M et 2-mercaptoéthanol 0,1 M. La solution protéique est incubée à 37°C pendant 2 heures sous agitation et atmosphère d'azote. L'iodoacétamide solide est ajouté en fin d'incubation pour atteindre la concentration de 0,5 M et le pH est réajusté à 8.0. Le milieu réactionnel est alors incubé à 37°C pendant 2 heures sous agitation à l'obscurité et sous azote. La solution est ensuite dialysée contre de l'eau distillée dans un tube à dialyse Spectrapor 3000, puis lyophilisée.

## II - 1-3 PURIFICATION DES PROTEINES INTERMEDIAIRES TP2 ET 3

### II - 1-3-1 Fractionnement des protéines PCA insolubles par chromatographie de gel filtration

Les protéines PCA insolubles réduites et alkylées (60 mg) sont dissoutes dans 4 ml de tampon urée 4 M, NaCl 1,5 M, pH 3.0 et déposées sur une colonne de gel filtration TSK HW 50S (2,6 x 100 cm) équilibrée dans le même tampon (débit 8 ml/h). Des fractions de 4 ml sont collectées. Le repérage des protéines est effectué par turbidimétrie à 400 nm. Les fractions protéiques sont ensuite dessalées par gel filtration sur une colonne de Sephadex G25 (4,6 x 30 cm) éluée par HCl 0,01 M avec un débit de 60 ml h<sup>-1</sup>. Le repérage des protéines est effectué par mesure de la densité optique de l'éluat à 226 nm. Les fractions protéiques sont ensuite rassemblées et lyophilisées.

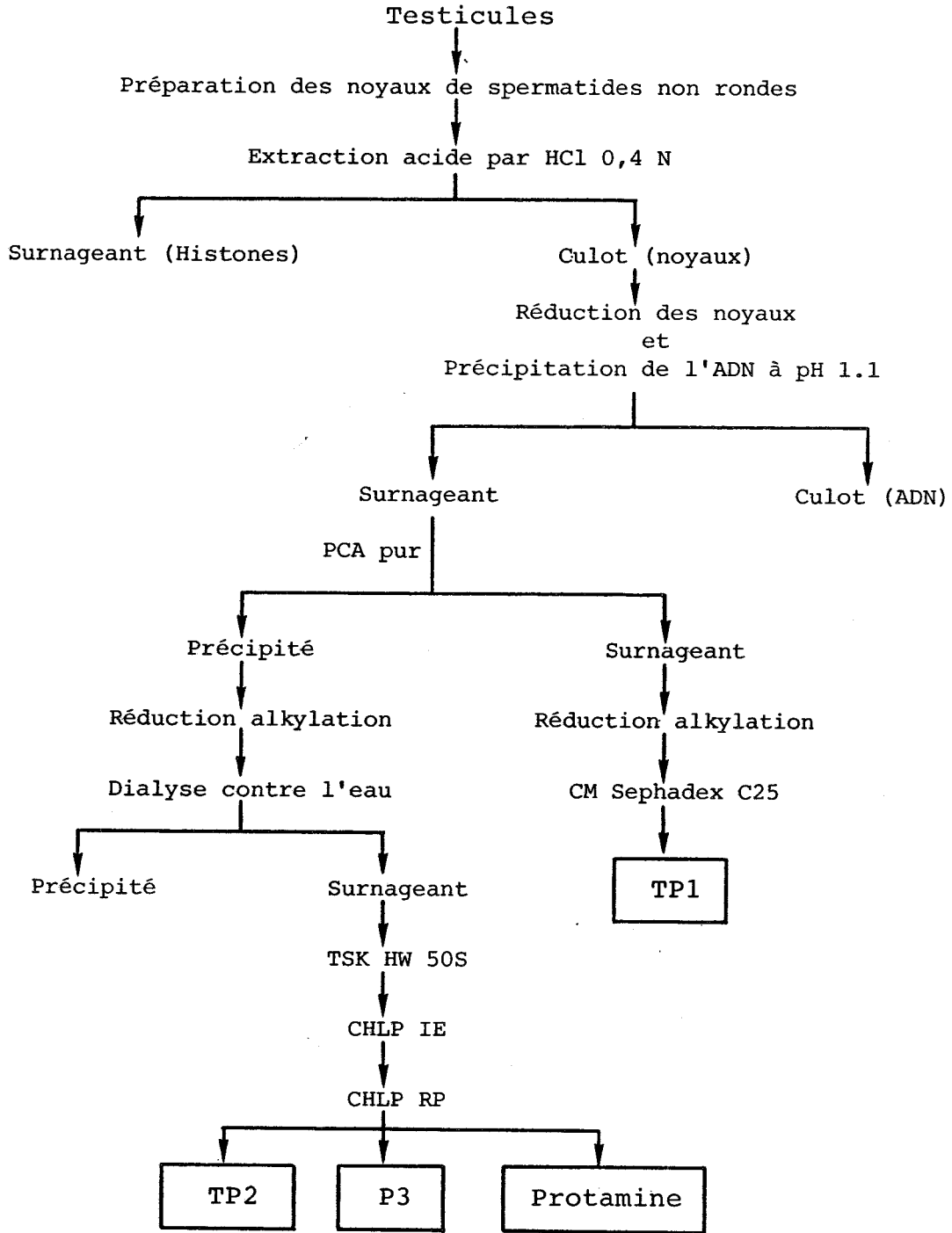
## II - 1-3-2 Purification par CLHP en échange d'ions

Le système CLHP utilisé est le système Gold Beckman piloté par un microordinateur Tandon. Les fractions enrichies en protéine TP2 ou 3 sont dissoutes dans le tampon acétate de sodium 50 mM, urée 4 M, pH 6,0 et déposées sur une colonne Spherogel TSK-CM 2SW (Altex) équilibrée dans un tampon acétate de sodium 50 mM, de pH 6,0. L'élution des protéines est réalisée par un gradient de concentration en  $MgCl_2$  de 0 à 0,7 M. Le débit de la colonne est de 1 ml/min et des fractions de 0,5 ml sont collectées. La densité optique de l'éluat est mesurée à 230 nm. Le dessalage des fractions protéiques est ensuite réalisé par CLHP en phase inverse sur une colonne C18  $\mu$ Bondapak (Waters). Le débit est de 1 ml/min et des fractions de 0,5 ml sont collectées. L'élution des protéines est effectuée par un gradient d'acétonitrile. La densité optique de l'éluat est mesurée à 220 nm. Les fractions intéressantes sont rassemblées et lyophilisées. Un schéma de la préparation et de la purification des protéines est présenté dans la figure 20.

## II - 1-4 ANALYSE ELECTROPHORETIQUE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

La séparation électrophorétique des protéines intermédiaires a été réalisée en gel de polyacrylamide en milieu acide acétique/urée dans les conditions décrites par PANYIM et CHALKLEY en 1969. Les gels renferment 17 % d'acrylamide et de l'urée à la concentration de 2,5 M ou 6,25 M. Une pré-électrophorèse de 2 heures est réalisée avant le dépôt des protéines. La durée de la séparation est de 1 heure pour un minigel (8 x 10 cm) ou de 3 heures pour un gel standard (16 x 16 cm). La migration s'effectue en milieu acide acétique 0,9 M.





**Figure 20** : Schéma de la préparation des protéines nucléaires basiques spécifiques des spermatides de bélier nommées P1,3 et T. (D'après DUPRESSOIR et al., 1985)

Après migration électrophorétique, la révélation des protéines se fait par immersion du gel pendant une nuit dans une solution de bleu de Coomassie G250 à 4 % dans le mélange éthanol/acide acétique/eau (45/10/45, v/v/v). La décoloration est assurée par lavages successifs dans la solution suivante : eau/éthanol/acide acétique (775/125/100, v/v/v).

## II - 1-5 COUPURES ENZYMATIQUES

### II - 1-5-1 Coupure par l'endoprotéinase Lys-C

La protéine 3 (10 nmoles) est dissoute dans 400  $\mu$ l de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0. La protéine est digérée avec l'endoprotéinase Lys-C (Boehringer, E.C.3.4.21.50) à 37°C pendant 2 heures en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/100 (p/p). La réaction est stoppée par addition d'une goutte d'acide formique à 70%. L'hydrolysate est ensuite évaporé à sec.

### II - 1-5-2 Coupure par la pepsine

La protéine 3 (10 nmoles), dissoute dans 400  $\mu$ l d'acide formique à 5 %, est digérée par la pepsine (Worthington, E.C.3.4.23.1) à 37°C pendant 1 heure en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/100 (p/p). L'hydrolysate est ensuite évaporé à sec.

### II - 1-5-3 Coupure par l'endoprotéinase Glu-C

La protéine TP2 (10 nmoles) est dissoute dans 400  $\mu$ l de tampon acétate d'ammonium 0,05 M, pH 4,0. La protéine est digérée pendant 16 heures à 37°C par l'endoprotéinase Glu-C (Boehringer, E.C.3.4.21.19), isolée de *Staphylococcus aureus* souche V8, en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/50 (p/p). L'hydrolysat est évaporé à sec.

### II - 1-6 FRACTIONNEMENT DES PEPTIDES

Les peptides issus des différentes hydrolyses enzymatiques ont été fractionnés par CLHP en phase inverse sur une colonne C18  $\mu$ Bondapak (Waters). L'élution est assurée par un gradient d'acétonitrile avec un débit de 1 ml/min. L'élution des peptides est suivie par mesure de la densité optique à 220 nm. Des fractions de 500  $\mu$ l sont collectées, rassemblées et évaporées à sec.

### II - 1-7 COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PROTEINES ET DES PEPTIDES

Les protéines et les peptides ont été hydrolysés par l'HCl 6 M à 110°C pendant 24 heures dans des tubes purgés à l'azote et scellés sous vide. Une goutte de phénol à 1 % est ajoutée à l'acide pour éviter la destruction de la tyrosine. La séparation et la quantification des acides aminés libérés sont réalisées sur l'analyseur d'acides aminés Beckman 6300.

## II - 1-8 DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

Le séquençage automatique de la structure primaire des protéines et des peptides a été réalisé sur le séquenceur phase gazeuse Applied Biosystems 470A couplé à un analyseur de PTH amino-acides Applied Biosystems 120A, équipé d'un intégrateur-calculateur CR4A Shimadzu. Le programme utilisé est le programme standard 03RPTH.

## II - 1-9 ETUDE DES SITES DE PHOSPHORYLATION

### II - 1-9-1 Action de la phosphatase alcaline

La protamine phosphorylée est dissoute dans le tampon suivant : Tris/HCl 50 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 1 mM et ZnCl<sub>2</sub> 0,5 mM et traitée pendant 3 heures à 37°C par la phosphatase alcaline isolée d'*Escherichia coli* (Sigma, E.C.3.1.3.1.), en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/6 (p/p). La réaction est stoppée par addition d'HCl concentré (concentration finale : 0,25 M). Le tube est refroidi dans la glace et la protéine précipitée par 6 volumes d'acétone. Après 1 heure à -20°C, la protéine est récupérée par centrifugation pour être ensuite soumise à l'analyse électrophorétique.

### II - 1-9-2 Transformation des résidus de phosphosérine en S-éthylcystéine

Les résidus de phosphosérine présents dans la protamine ont été transformés en S-éthylcystéine selon le protocole de MEYER *et al.* (1986), modifié par SWIDERECK *et al.* (1988).

2 nmoles de protamine de bélier S-carboxamidométhylée sont traites par 25  $\mu$ l de la solution suivante :

- 65  $\mu$ l de NaOH 5 M
- 60  $\mu$ l d'éthylmercaptan
- 100  $\mu$ l d'éthanol absolu
- 400  $\mu$ l d'eau distillée

Le mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 1 heure en atmosphère d'argon. La protéine est ensuite vapore à sec et resolubilise dans 80  $\mu$ l d'HCl 0,01 M. La solution obtenue est ensuite dpose sur une pastille de fibre de verre traite au polybrène. Cette pastille après séchage est introduite dans la cartouche du séquenceur phase gazeuse Applied Biosystems 470A.

## II - 2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

### II - 2-1 ETUDE DE LA PROTEINE DE TRANSITION TP1 DE BELIER

#### II - 2-1-1 Introduction

Durant la spermiogenèse des mammifères, les variants d'histones de type somatique, les variants d'histones fortement représentés dans le testicule et les variants d'histones spécifiques du testicule sont entièrement remplacés dans les spermatides par quatre protéines de transition encore appelées protéines intermédiaires.

La première structure primaire d'une protéine TP1 a été obtenue par KISTLER *et al.* (1975b) à partir de la protéine TP1 isolée du testicule de rat. C'est d'ailleurs la seule structure primaire qui ait été déterminée par la dégradation récurrente d'Edman. Quatre autres structures primaires de protéines TP1 ont été élucidées depuis, mais toutes ont été déduites de la séquence nucléotidique du gène correspondant.

Des modifications post-traductionnelles affectant (ou pouvant affecter) la protéine TP1 ont été décrites : il s'agit de la phosphorylation (DUPRESSOIR *et al.*, 1985 ; HEIDARAN *et al.*, 1988) et de l'ADP-ribosylation (FARAONE MENELLA *et al.*, 1988). Toutefois, ces travaux se sont bornés à signaler ces modifications sans en établir la localisation. Deux formes phosphorylées de la protéine TP1 de bélier ont été décrites mais seule la forme monophosphorylée a été obtenue à l'état pur, la forme diphosphorylée étant contaminée par une autre protéine de transition, la protéine 7.

Nous avons donc entrepris l'étude de la structure primaire de la protéine TP1 non phosphorylée afin de la comparer aux autres structures primaires de protéines TP1 connues. Nous avons ensuite identifié les sites de phosphorylation de cette protéine dans la forme monophosphorylée. L'identification sans équivoque de ces sites a été réalisée après transformation des résidus de phosphosérine en S-éthylcystéine.

Par ailleurs, l'utilisation de la spectrométrie de masse a confirmé la structure primaire établie mais a surtout permis de mettre en évidence deux variants structuraux de la protéine TP1 dans le testicule de bélier.

Ces résultats sont présentés dans la publication :

Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids. Mass spectrometric characterization, primary structure and phosphorylation sites of two variants.

CHIRAT, F., MARTINAGE, A., BRIAND, G., KOUACH, M., VAN DORSSELAER, A., LOIR, M. and SAUTIERE, P.

European Journal of Biochemistry (soumis pour publication).

NUCLEAR TRANSITION PROTEIN 1 FROM RAM ELONGATING SPERMATIDS.  
MASS SPECTROMETRIC CHARACTERIZATION, PRIMARY STRUCTURE AND  
PHOSPHORYLATION SITES OF TWO VARIANTS.

Frédéric Chirat<sup>1</sup>, Arlette Martinage<sup>1</sup>, Gilbert Briand<sup>1</sup>,  
Mostafa Kouach<sup>1</sup>, Alain Van Dorsselaer<sup>2</sup>, Maurice Loir<sup>3</sup> and  
Pierre Sautière<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unité de Recherche Associée n°409 au Centre National de la  
Recherche Scientifique, Université de Lille II, Institut de  
Recherches sur le Cancer, Place de Verdun 59045 Lille - France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie Organique des Substances Naturelles,  
Unité de Recherche Associée n°31 au Centre National de la  
Recherche Scientifique, 5, Rue Blaise Pascal 67084 Strasbourg  
France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Physiologie des Poissons, Institut National de  
la Recherche Agronomique, Campus de Beaulieu, Avenue du Général  
Leclerc 35042 Rennes - France.



Correspondence should be addressed to : Pierre Sautière

URA 409 CNRS, Université de Lille II, Institut de Recherches  
sur le Cancer, Place de Verdun F-59045 LILLE Cédex (France).

Phone : (33) 20 52 97 00      FAX : (33) 20 52 70 83

Subdivision of the table of contents for publication : (2) Protein  
chemistry and structure.

Abbreviations :

Pth : Phenylthiohydantoin

RP-HPLC : Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography

TP1 : Transition Protein 1

Enzymes :

Carboxypeptidase A (E.C.3.4.17.1)

Endoproteinase Lys-C (E.C.3.4.21.50)

Thermolysin (E.C.3.4.24.4)

- 3 -

SUMMARY

The ram transition protein TP1 is present in spermatid cell nuclei as non-, mono- and diphosphorylated forms. Its primary structure was determined by automated Edman degradation of S-carboxamidomethylated protein and of peptides generated by cleavage with thermolysin and endoproteinase Lys-C.

The ram TP1 is a small basic protein of 54 residues and structurally very close to other mammalian TP1. The mass spectrometric data obtained from the protein and its fragments reveal that ram TP1 is indeed a mixture of two structural variants ( $M_r$  6346 and 6300 respectively) in five-to-one ratio approximately. These variants differ only by the nature of the residue at position 27 (Cys in the major variant and Gly in the minor variant). The study of phosphorylation sites has shown that four different serine residues could be phosphorylated in the mono-phosphorylated TP1, at positions 8, 35, 36 or 39 respectively.

From previous physical studies, it has been postulated that the tyrosine 32 surrounded by two highly conserved basic

- 4 -

clusters was responsible for the destabilization of chromatin by intercalation of its phenol ring between nucleic acid bases of DNA.

The presence of three phosphorylatable serine residues in the very conserved sequence 29-42 is another argument for the involvement of this region in the interactions with DNA.



## INTRODUCTION

Spermatogenesis involves a progressive differentiation of the germ cells towards a terminal stage represented by the mature spermatozoa.

In mammals, the first part of spermiogenesis, where the spermatid development takes place, is quiescent relative to change in chromatin structure, while the second part of this stage is characterized by a progressive condensation of the diffuse chromatin to a highly compact and transcriptionally inactive structure [1-6].

This condensation is correlated with a double protein transition. The first transition corresponds to the complete removal and replacement of histones (somatic and testis-specific variants) by several spermatid specific basic proteins [7-9] which are themselves eliminated and replaced by one [10-16] or two protamines [17-23] during the second transition.

While histones and protamines have been extensively studied, little is known about spermatid specific proteins also called transition proteins.

In rat and mouse four transition proteins [7,8] named TP1, 2, 3 and 4 have been identified. Among them, only TP1 and TP2 have been fully characterized.

Rat and mouse TP1 are low molecular weight basic proteins (54 residues), rich in arginine (20 %), lysine (19 %) and serine (14 %) and devoid of cysteine [24-27].

TP2 is larger than TP1 (116 and 117 residues in rat and mouse respectively) [28-29]. This protein is characterized by a high amount of serine (22 %) and proline (19 %) and by the presence of cysteine (about 5 %).

Little is known about transition proteins in other mammalian species. In man, bull and boar, a transition protein related to TP1 has been identified and sequenced [30,31]. As rat and mouse TP1, human TP1 lacks of cysteine, while boar and bull TP1 contain one cysteine residue.

In ram, four transition proteins called P1, 3,7 and T have been purified and characterized [9]. The amino acid composition and the C-terminal sequence (27 residues) of ram protein P1 (F.Chirat, unpublished results) clearly indicate a close structural relationship between this protein and rat and mouse TP2. On the other hand, the amino acid composition of ram protein T [9] is very similar to those of the other mammalian TP1. Moreover, this protein was shown to be mono- and diphosphorylated at a small extent [9].

In this paper, we report the complete primary structure of the ram protein T and the different sites of phosphorylation identified in the monophosphorylated form of the protein. Since the sequence analysis of ram protein T has shown a close structural relationship with known mammalian TP1 proteins [31], the ram protein T will be named from now, for the sake of clarity, ram transition protein 1 or ram TP1.

## MATERIALS AND METHODS

Portions of this paper (including Materials and Methods, Figures S1-S3 and Tables I-II) are presented in the Supplementary section.

## RESULTS

Ram transition protein TP1 is present in elongating spermatid nuclei in three forms : non-, mono- and diphosphorylated [9]. These forms were separated by fractionation on a CM-Sephadex C25 column, of the 0.75 M perchloric acid-soluble cysteine-containing proteins extracted from EDTA-resistant spermatid nuclei. Prior to ion-exchange chromatography, the spermatidal proteins were reduced and alkylated with iodoacetamide.

The non- and monophosphorylated forms of TP1 were obtained in highly purified state, while the diphosphorylated form coeluted with the spermatidal protein 7.



### Mass spectrometry of the S-carboxamidomethylated protein

Electrospray Mass Spectrometry (ESMS) of the non-phosphorylated form of TP1 yields two molecular masses of 6460 Da and 6357 Da (Fig.1 and Table I). The found molecular mass of 6460 corresponds to the presence of two S-carboxamidomethylated cysteine residues. The other component with a molecular mass of 6357 is in agreement with the replacement of one cysteine residue by a glycine residue.

From these data, the two components were estimated to be present in a five-to-one ratio.

### Amino acid sequence

The strategy and sequence data which allowed us to elucidate the complete sequence of ram TP1 are presented in Fig.2. The elution diagrams of the peptides derived from the protein and the table providing sequence data are given in the Supplementary section (Figures S1 and S2, Table I).

The amino-terminal sequence of TP1 was determined up to residue 38 by microsequencing of the S-carboxamidomethylated protein (Table I in the Supplementary section).

The digestion of the S-carboxamidomethylated protein with carboxypeptidase A for 15 min released 0.9 nmol leucine and 0.5 nmol histidine per nmol of protein.

The remainder of the sequence was unambiguously established by sequencing peptides derived from hydrolysis of the S-carboxamidomethylated protein with thermolysin and endoproteinase Lys-C.

Cleavage of the protein with thermolysin generated six peptides (Th1 to Th6) which altogether account for the total number of amino acids of the TP1 molecule (54 residues) (Table I). The carboxy-terminal sequence of the peptide Th6 was found to be identical to the sequence His-Leu provided by the carboxypeptidase A digestion of the protein. Therefore Th6 has to be assigned to the carboxy-terminal position in the sequence of the protein.

Among the peptides derived from the cleavage of the protein with endoproteinase Lys-C, only three peptides K1, K2 and K3 were

useful in providing the necessary overlaps for the alignment of the thermolysin peptides Th4, Th5 and Th6 (Supplementary section, Table I). The peptides K1 and K2 were obtained unseparated in equal amount as shown by the amino acid composition. The correct assignment of the Edman data of the two peptides was possible only because the sequence at this point was previously established from the S-carboxamidomethylated protein.

Mass spectrometry of S-carboxamidomethylated thermolysin peptides

Th3 and Th5

Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FABMS) of peptide Th3 (residues 23-31) yielded two molecular masses of 1117,6 and 1014,6 (Figure 3 and Table I).

The difference - 103 - between these two masses is identical to that observed between the two molecular masses determined for the S-carboxamidomethylated protein TP1.

Plasma Desorption Mass Spectrometry ( $^{252}\text{Cf}$  PDMS) of peptide Th5 (residues 37-49) gave a single mass of 1633,8 which nicely

corroborates the sequence determined by automated Edman degradation. It must be emphasized that FABMS failed to give the mass of this peptide.

#### Identification of the phosphorylation sites in ram TP1

The phosphorylation sites were identified in the monophosphorylated form of the ram transition protein TP1. Due to the low amount of protein available, no mass determination of phosphorylated TP1 by ESMS was carried out.

The S-carboxamidomethylated derivative of the monophosphorylated protein, cleaved by thermolysin in the same conditions that the non-phosphorylated protein (see Supplementary section), yielded seven peptides. The elution diagram of these peptides appears in Fig.S1-B. By comparison with the elution profile of thermolysin peptides generated from the non-phosphorylated protein (Fig.S1-A) an additional peptide designated by Thx is present in the thermolysin digest of the phosphorylated protein. In parallel with the appearance of this peptide, a decrease of the height of the peaks corresponding to peptides Th4 and Th5 can be observed.

The amino acid analysis of the 24h-hydrolysate of each thermolysin peptide derived from the phosphorylated protein shows a complete identity with the homologous peptide generated from the non-phosphorylated protein. The additional peptide Thx corresponds to the sequence 32-49 of TP1, which covers the peptides Th4 (residues 32-36) and Th5 (residues 37-49).

It must be emphasized that peptides Th2 and Thx were obtained cross contaminated, as evidenced by sequence determination (Table II, in the Supplementary section). In the other hand, in the thermolysin digest of the phosphorylated TP1, only peptides Th2 and Thx were found to contain phosphoamino acid(s) upon amino acid analysis of a 2h-hydrolysate.

These two peptides were treated according to the procedure described by Meyer *et al.* [32] in order to convert the phosphoserine residues into S-ethyl cysteine residues.

The automated Edman degradation of derivatized peptides Th2 and Thx (Table II in the Supplementary section) led us to conclude

that serine residues at positions 8, 35, 36 and 39 of the ram TP1 are partially phosphorylated in the monophosphorylated form of the protein.

In the course of this sequence analysis, we have not observed the two peaks characteristic of the phenylthiohydantoin derivative of the carboxamidomethylated cysteine expected at position 12 (Cys 43 in TP1), but another peak with a retention time identical to that of Pth S-ethyl cysteine. To check the possibility that the procedure of Meyer *et al.* [32] devised to transform the phosphoserine residues in S-ethyl cysteine residues, could also affect the S-carboxamidomethylated cysteine, we have submitted to automated Edman degradation the peptide Th3, VKRGCSKRRK (Table I in Supplementary section) (residues 23-31) generated from the non-phosphorylated TP1, which contains one S-carboxamidomethylated cysteine at position 27. This peptide was sequenced twice, before and after derivatization according to the procedure of Meyer *et al.* [32]. The sequence data, presented in the figure S3 obviously show that the S-carboxamidomethylated cysteine is also transformed by this procedure.

A complete study of this transformation of which the mechanism does not appear to be a  $\beta$ -elimination will be published elsewhere.

#### DISCUSSION

As evidenced by Electrospray Mass Spectrometry (ESMS) and by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry (FABMS), the ram transition protein TP1 is indeed a mixture of two structural variants which only differ by a single change : the cysteine residue at position 27 in the major variant ( $M_r$  6346) is replaced by a glycine residue in the minor one ( $M_r$  6300). Indeed the molecular mass of the peptide Th3 ( $M_r$  1117,6) obtained from FABMS is in accordance with the sequence of this peptide established by automated Edman degradation and the identification of a cysteine residue at position 27 (Table I in the Supplementary section). On the other hand, the presence of a peptide with a molecular mass of 1014,6 in the peptide Th3, corresponds to the replacement of the cysteine residue by a glycine residue at position 27.

The contribution of MS was essential to reveal the existence of the minor variant. Indeed, during the course of the automated Edman degradation of the protein as well as of the peptide Th3, the identification of glycine at position 27 was hindered, both by the low amount of this variant and the carry-over of glycine from the previous cycle.

With 43 % of basic residues, the ram transition protein TP1 has a basicity intermediate between that of histone H4 (26 %) [35] and that of ram protamine (56 %) [13]. The basic residues are distributed all along the polypeptide chain, most of them arranged in clusters of two or three. This protein is also characterized by a relative abundance of hydroxylated residues (22 %) which accumulate in the first 3/4 of the molecule. The occurrence of two basic clusters interspersed with one tyrosine residue at position 32 and three serine residues at positions 35, 36 and 39 constitutes the most interesting feature of ram TP1.

These residues of serine were found to be phosphorylated in the monophosphorylated form of TP1. Two of them (serines 35 and 36)



are present in a sequence B-X-Ser specifically recognized by the cyclic AMP-dependent protein kinase, where B is arginine or lysine and X, any amino acid except proline [36,37]. The two other sites of phosphorylation identified in ram TP1, are located in the sequence LKS, which occurs twice in the polypeptide chain, at positions 6-8 and 37-39 respectively. Thus, the presence of four phosphorylation sites in the monophosphorylated form of ram TP1 indicates a lack of specificity in the phosphorylation of this protein.

Among the amino acid changes observed in the ram TP1 by comparison with the other mammalian TP1 (Fig.4) the only marked changes occur at position 11 where a threonine replaces a methionine and at position 27 in the major variant, where a cysteine replaces a glycine.

If it has been clearly shown that the cysteine residues present in mammalian protamines, are involved in the process of chromatin compaction, through the formation of disulfide bridges during the maturation of spermatozoa [3,38,39,40], the role of cysteine in mammalian TP1 remains to be elucidated. Indeed, the major

variant of ram TP1 contains two cysteine residues at positions 27 and 43, whereas the minor variant and the boar and bull TP1 [31] have only one cysteine at position 43. In contrast, rat [24-26], mouse [27] and human [28] TP1 are devoid of cysteine.

The high degree of similarity between all the TP1 molecules suggests an identical and crucial role of this protein during the spermiogenesis in mammals.

From physical studies of the *in vitro* interaction of rat TP1 with nucleic acids and in particular from the tyrosine-fluorescence quenching data, Singh and Rao [41] have postulated that the tyrosine at position 32 and 50 of rat TP1 intercalates with the nucleic acid bases.

In fact, since tyrosine 32 contrary to tyrosine 50 is present in all mammalian TP1 (Fig.4) in a highly basic region (sequence 29-42) very conserved and likely involved in the interactions with DNA, this residue could be essential in the destabilization of the chromatin through the intercalation of its phenol ring between the bases of DNA [41].

In addition, the presence of phosphorylatable serine residues at positions 35 and/or 36 (except in human TP1) and at position 39 is another argument for the involvement of the region 29-42, in the interaction with DNA. Indeed, in basic proteins (i.e. histones and protamines), phosphorylation is known to modulate interaction of these proteins with DNA [39,40,42,43]. The biological significance of the phosphorylation of TP1 could be to allow the correct positioning of TP1 on the DNA. Later on, the dephosphorylation of TP1 would bring together the region 29-42 and DNA, with as a consequence, the intercalation of the tyrosine 32 between the DNA bases, thus inducing the destabilization of the chromatin necessary to the complete removal of histones before the deposition of protamines.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to K.Klarskov and P.Roepstorff (University of Odensee, Denmark) for the PDMS analysis of peptide Th5. We thank M.J.Dupire for amino acid analysis, the Service commun de séquence peptidique (URA 409 Centre National de la Recherche Scientifique, U 16 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) and T.Ernout for the preparation of this manuscript. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, from the Université de Lille II and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- [1] Kierszenbaum, A.L. & Tres, L.L. (1975) J. Cell Biol. 65, 258-270.
- [2] Meistrich, M.L., Reid, B.O. & Barcellona, W.J. (1976) Exp. Cell Res. 99, 72-78.
- [3] Loir, M. & Lanneau, M. (1978) Exp. Cell Res. 115, 231-243.
- [4] Meistrich, M.L., Trostle, P.K. & Brock, W.A. (1981) in Bio-regulators of Development (Jagiello, G. & Vogel, H.J., eds) Academic Press : New York, pp 151-166.
- [5] Loir, M. & Lanneau, M. (1984) J. Ultrastruct. Res. 86, 262-276.
- [6] Loir, M., Bouvier, D., Fornells, M., Lanneau, M. & Subirana, J.A. (1985) Chromosoma (Berl) 92, 304-312.
- [7] Meistrich, M.L., Brock, W.A., Grimes, S.R., Platz, R.D. & Hnilica, L.S. (1978) Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 37, 2522-2525.
- [8] Balhorn, R., Weston, S., Thomas, C. & Wyrobeck, A.J. (1984) Exp. Cell Res. 150, 298-308.

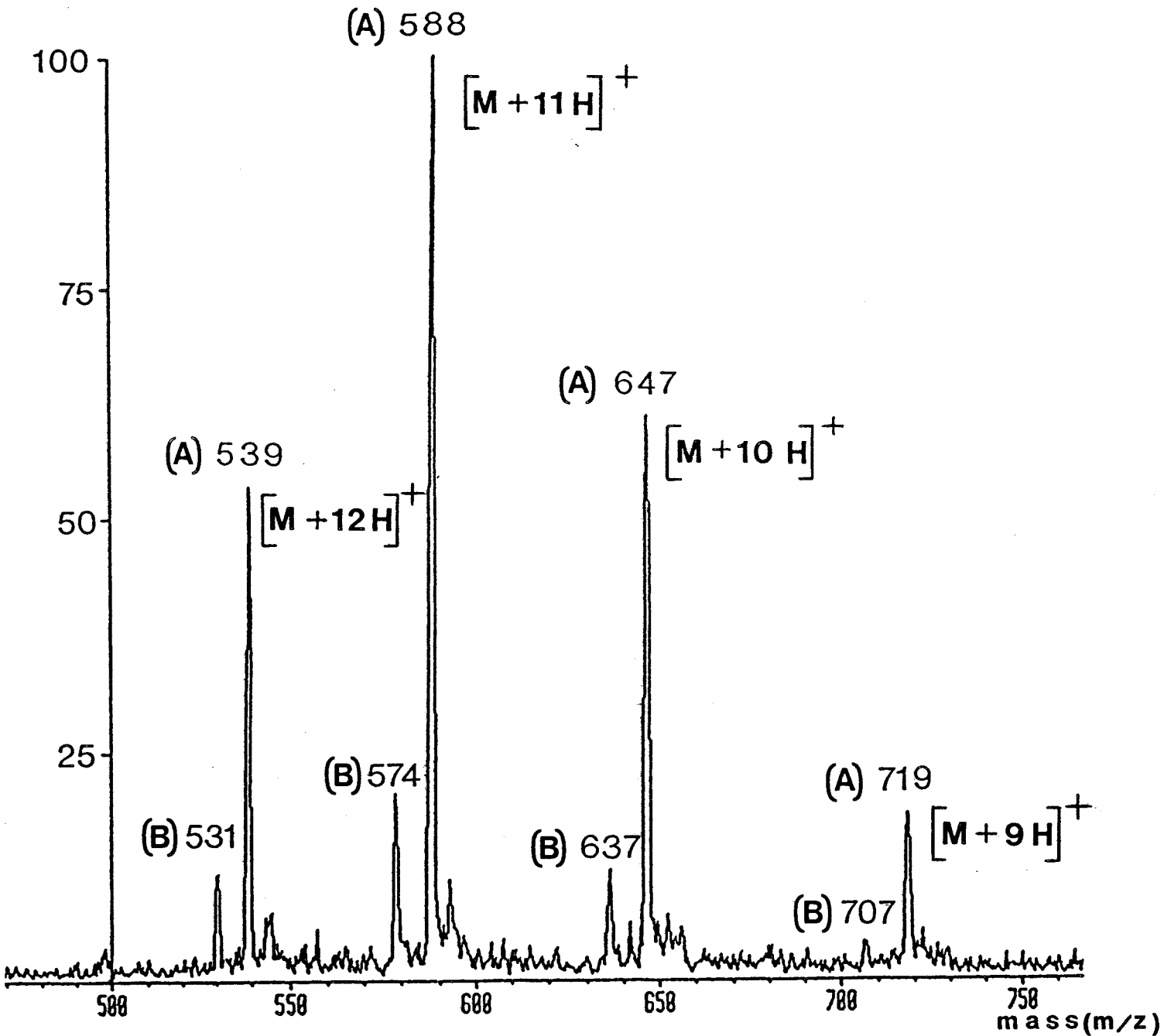
- [9] Dupressoir, T., Sautière, P., Lanneau, M. & Loir, M. (1985)  
Exp. Cell Res. 161, 63-74.
- [10] Coelingh, J.P., Monfoort, C.H., Rozijn, T.H., Gevers Leuven, J.A.,  
Schiphof, R., Steyn-Parvé, E.P., Braunitzer, G., Schrank, B. &  
Ruhfus, A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 285, 1-14.
- [11] Calvin, H.I. (1976) Biochim. Biophys. Acta 434, 377-389.
- [12] Tobita, T., Tsutsumi, H., Kato, A., Suzuki, H., Nomoto, M.,  
Nakano, M. & Ando, T. (1983) Biochim. Biophys. Acta 744, 141-  
146.
- [13] Sautière, P., Bélaïche, D., Martinage, A. & Loir, M. (1984)  
Eur. J. Biochem. 144, 121-125.
- [14] Mazrimas, J.A., Corzett, M., Campos, C. & Balhorn, R. (1986)  
Biochim. Biophys. Acta 872, 11-15.
- [15] Ammer, H. & Henschen, A. (1988) FEBS Lett. 242, 111-116.
- [16] Ammer, H. & Henschen, A. (1988) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369  
1301-1306.
- [17] Mc Kay, D.J., Renaux, B.S. & Dixon, G.H. (1985) Biosci. Rep. 5,  
383-391.

- [18] Ammer, H., Henschen, A. & Lee, C.H. (1986) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 515-522.
- [19] Gusse, M., Sautière, P., Bélaïche, D., Martinage, A., Roux, C., Dadoune, J.P. & Chevaillier, Ph. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 884, 124-134.
- [20] Mc Kay, D.J., Renaux, B.S. & Dixon, G.H. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 5-8.
- [21] Bélaïche, D., Loir, M., Kruggle, W. & Sautière, P. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 913, 145-149.
- [22] Bellve, A.R. (1988) *Biochemistry* 27, 2890-2897.
- [23] Pirhonen, A., Linnala-Kankkunen, A. & Mäenpää, P.H. (1989) *FEBS Lett.* 244, 199-202.
- [24] Kistler, W.S., Geroch, M.E. & Williams-Ashman, H.G. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4532-4543.
- [25] Kistler, W.S., Noyes, C., Hsu, R., Heinrikson, R.L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1847-1853.
- [26] Heidaran, M.A., Kozak, C.A. & Kistler, W.S. (1989) *Gene* 75, 39-46.

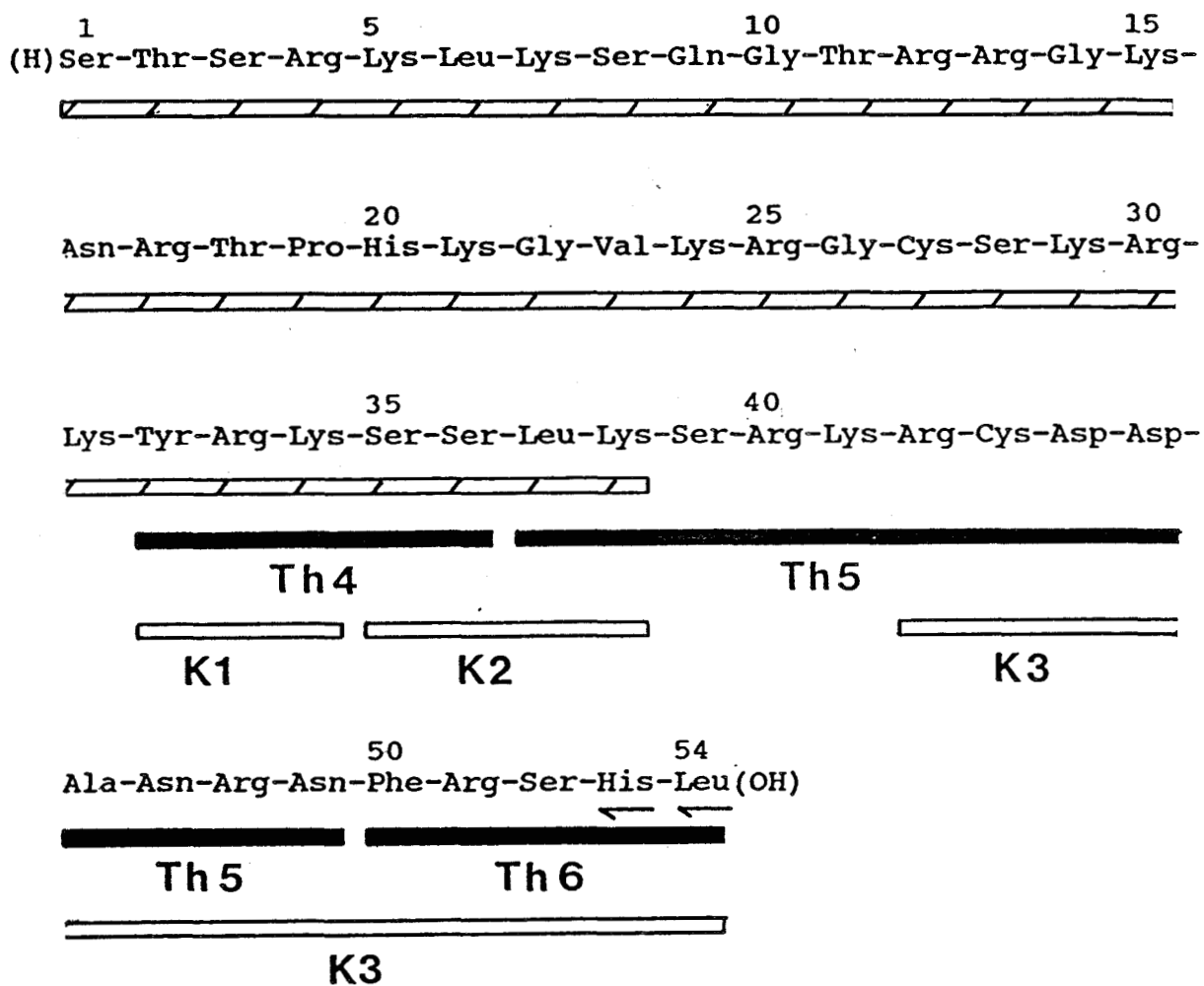
- [27] Kleene, K.C., Borzorgzadeh, A., Flynn, J.F., Yelick, P.C. & Hecht, N.B. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 950, 215-220.
- [28] Luerssen, H., Maier, W.M., Hoyer-Fender, S. & Engel, W. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 3585.
- [29] Kleene, K.C. & Flynn, J.F. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 17272-17277.
- [30] Luerssen, H., Hoyer-Fender, S. & Engel, W. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 7723.
- [31] Kremling, H., Luerssen, H., Adham, I.M., Klemm, U., Tsaousidou, S. & Engel, W. (1989) *Differentiation* 40, 184-190.
- [32] Meyer, H.E., Hoffmann-Posorske, E., Korte, H. & Heilmeyer, L.M.G. (1986) *FEBS Lett.* 204, 61-66.
- [33] Sundqvist, B., Kamensky, I., Hakansson, P., Kjellberg, J., Salehpour, M., Widdiyasekera, S., Fohlman, J., Petersson, P.A. & Roepstorff, P. (1984) *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 242-257.
- [34] Swiderek, K., Jaquet, K., Meyer, H.E. & Heilmeyer, L.M.G. (1988) *Eur. J. Biochem.* 176, 335-342.
- [35] DeLange, R.J., Fambrough, D.M., Smith, E.L. & Bonner, J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 319-334.



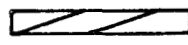
- [36] Shlyapnikov, S.V., Arutyunyan, A.A., Kurochkin, S.N.,  
Memelova, L.V., Nesterova, M.V., Sashchenko, L.P. & Severin,  
E.S. (1975) FEBS Lett. 53, 316-319.
- [37] Martinage, A., Mangeat, P., Laine, B., Couppez, M., Sautière, P.,  
Marchis-Mouren, G. & Biserte, G. (1980) FEBS Lett. 118, 323-329.
- [38] Bedford, J.M. & Calvin, H.I. (1974) J. Exp. Zool. 188, 137-155.
- [39] Marushige, Y. & Marushige, K. (1975) J. Biol. Chem. 250, 39-45.
- [40] Balhorn, R. (1982) J. Cell Biol. 93, 298-305.
- [41] Singh, J. & Rao, M.R.S. (1987) J. Biol. Chem. 262, 734-740.
- [42] Marushige, Y. & Marushige, K. (1978) Biochim. Biophys. Acta  
518, 440-449.
- [43] Pruslin, F.H., Imesch, E., Winston, R. & Rodman, T.C. (1987)  
Gamete Res. 18, 179-190.




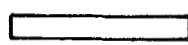
**Figure 1** : Section of the ESMS spectrum of ram TP1. Two series (A) and (B) of multicharged ions with 9 to 12 charges were detected. The major series A (6460 Da) corresponds to the major variant and the minor series B (6357 Da) corresponds to the minor variant.



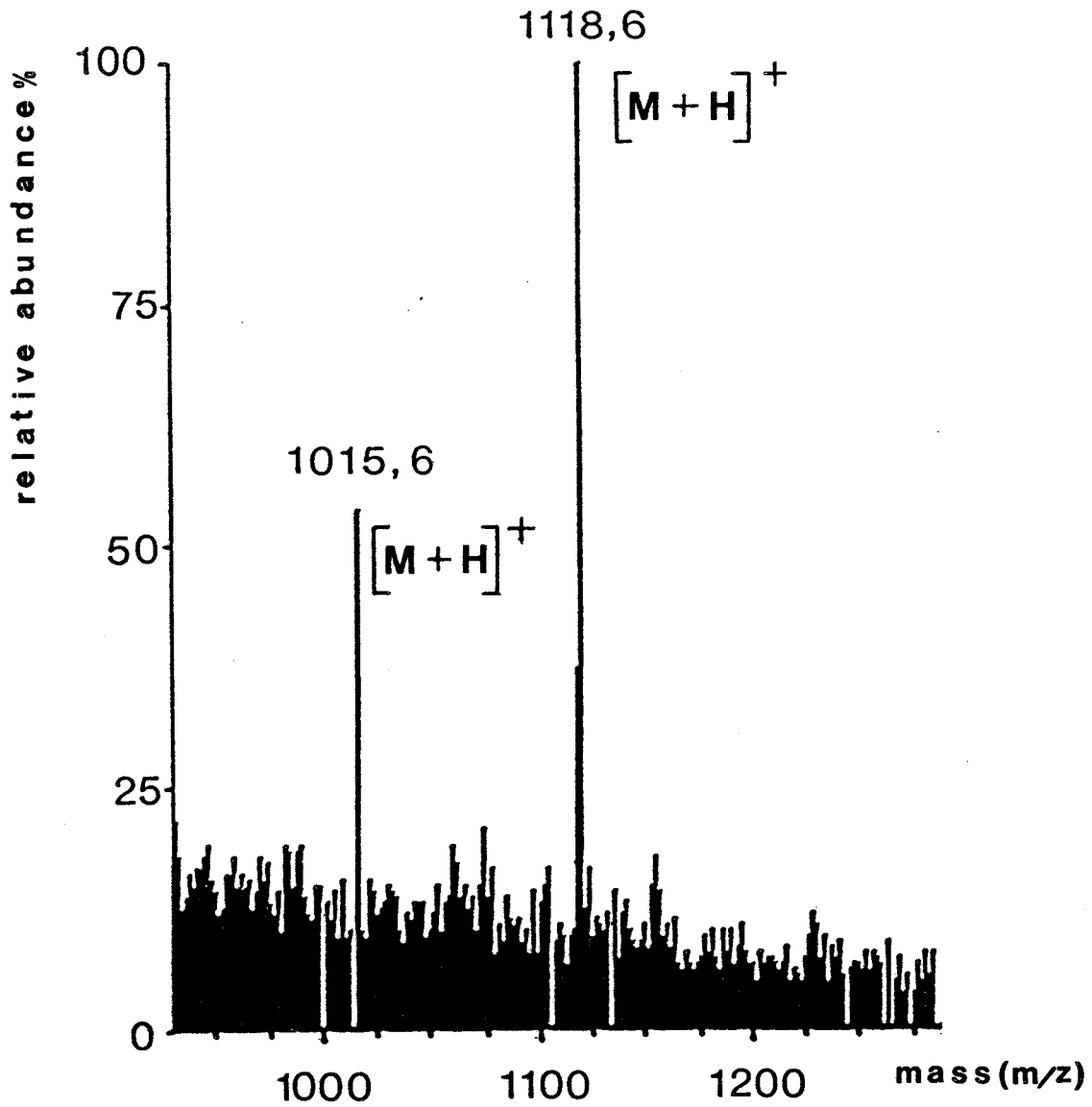
**Figure 2** : Complete amino acid sequence of ram TP1 protein. Th- and K- indicate peptides derived from cleavage with thermolysin and endoproteinase Lys-C respectively.

 : automated Edman degradation of the S-carboxamidomethylated ram TP1.

 : automated Edman degradation of thermolysin peptides (Th)

 : automated Edman degradation of endoproteinase Lys-C peptides (K)

 : carboxypeptidase A digestion



**Figure 3** : Section of the FAB spectrum of peptides Th3 derived from cleavage of S-carboxamidomethyled ram TP1 with thermolysin.

|         |         |    |    |   |      |   |    |   |         |    |     |
|---------|---------|----|----|---|------|---|----|---|---------|----|-----|
|         | 1       |    | 10 |   |      |   | 20 |   | 30      |    |     |
| Ram (1) | STSRKLK | SQ | G  | T | RRGK | N | R  | T | PHKGVKR | GC | SKR |
| Ram (2) | STSRKLK | SQ | G  | T | RRGK | N | R  | T | PHKGVKR | GG | SKR |
| Bull    | STSRKLK | SH | G  | M | RRGK | N | R  | A | PHKGVKR | GG | SKR |
| Boar    | STSRKLK | SQ | G  | M | RRGK | N | R  | T | PHKGVKR | SG | SKR |
| Rat     | STSRKLK | TH | G  | M | RRGK | N | R  | A | PHKGVKR | GG | SKR |
| Mouse   | STSRKLK | TH | G  | M | RRGK | N | R  | A | PHKGVKR | GG | SKR |
| Human   | STSRKLK | SH | G  | M | RRSK | S | R  | S | PHKGVKR | GG | SKR |

|         |      |    |        |   |     |   |    |   |      |
|---------|------|----|--------|---|-----|---|----|---|------|
|         |      |    | 40     |   |     |   | 50 |   |      |
| Ram (1) | KYRK | SS | LKSRKR | C | DDA | N | RN | F | RSHL |
| Ram (2) | KYRK | SS | LKSRKR | C | DDA | N | RN | F | RSHL |
| Bull    | KYRK | GS | LKSRKR | C | DDA | N | RN | Y | RSHL |
| Boar    | KYRK | SS | LKSRKR | C | DDA | N | RN | L | RSHL |
| Rat     | KYRK | SS | LKSRKR | G | DDA | S | RN | Y | RSHL |
| Mouse   | KYRK | SV | LKSRKR | G | DDA | S | RN | Y | RSHL |
| Human   | KYRK | GN | LKSRKR | G | DDA | N | RN | Y | RSHL |

**Figure 4** : Comparison of the amino acid sequence of TP1 from ram, bull [31], boar [31], rat [25,26], mouse [27] and man [28]. The boxes correspond to sequence identity between the different TP1.

TABLE I

Amino acid composition of ram TP1 and peptides generated by cleavage with thermolysin (Th) and with endoproteinase Lys-C(K).

| Amino Acid | TP1          | Th1 residues 1-5 | Th2 residues 6-22 | Th3 residues 23-31 | Th4 residues 32-36 | Th5 residues 37-49 | Th6 residues 50-54 | K1/2 residues 32-34 and 35-38 | K3 residues 42-54 |
|------------|--------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------|
| SCMC       | 2.1(2)(c)    | -                | -                 | 0.8(1)             | -                  | 0.9(1)             | -                  | -                             | 0.8(1)            |
| Asx        | 5.0(5)       | -                | 1.2(1)            | -                  | -                  | 4.0(4)             | -                  | -                             | 4.1(4)            |
| Thr        | 2.9(3)       | 1.0(1)           | 2.0(2)            | -                  | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Ser        | 7.6(8)       | 2.0(2)           | 1.5(1)            | 1.4(1)             | 2.1(2)             | 1.5(1)             | 1.3(1)             | 1.6(2)                        | 1.5(1)            |
| Glx        | 1.3(1)       | -                | 1.1(1)            | -                  | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Pro        | 1.2(1)       | -                | 1.0(1)            | -                  | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Gly        | 4.3(4)       | -                | 3.0(3)            | 1.3(1)             | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Ala        | 1.3(1)       | -                | -                 | -                  | -                  | 1.1(1)             | -                  | -                             | 1.2(1)            |
| Val        | 1.1(1)       | -                | -                 | 1.0(1)             | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Met        | -            | -                | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Ile        | -            | -                | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                             | -                 |
| Leu        | 3.0(3)       | -                | 1.0(1)            | -                  | -                  | 1.0(1)             | 1.0(1)             | 1.0(1)                        | 1.2(1)            |
| Tyr        | 1.1(1)       | -                | -                 | -                  | 0.9(1)             | -                  | -                  | 0.7(1)                        | -                 |
| Phe        | 1.0(1)       | -                | -                 | -                  | -                  | -                  | 1.0(1)             | -                             | 1.0(1)            |
| His        | 1.9(2)       | -                | 1.0(1)            | -                  | -                  | -                  | 1.1(1)             | -                             | 1.0(1)            |
| Lys        | 10.3(10)     | 1.0(1)           | 3.1(3)            | 3.0(3)             | 1.0(1)             | 2.1(2)             | -                  | 2.0(2)                        | -                 |
| Arg        | 11.3(11)     | 0.9(1)           | 3.2(3)            | 2.0(2)             | 1.0(1)             | 3.2(3)             | 0.9(1)             | 1.1(1)                        | 3.0(3)            |
| Mass(a)    | 6462         | -                | -                 | 1117.6             | -                  | 1632.8             | n.d                | n.d                           | n.d               |
| Mass(b)    | 6460<br>6357 | n.d              | n.d               | 1117.6<br>1014.6   | n.d                | 1633.8             | n.d                | n.d                           | n.d               |
| Total      | 54           | 5                | 17                | 9                  | 5                  | 13                 | 5                  | 3 and 4                       | 13                |

Results are expressed as number of residues / molecule of protein or peptide.

(a) Calculated masses.

(b) Masses measured by mass spectrometry (ESMS for TP1, PDMS-TOF for Th5 and FABMS for Th3)

(c) Values in parentheses are the number of residues/molecule of protein or peptide derived from the sequence.

n.d : not determined

Supplementary Material to :

Nuclear transition protein 1 from ram elongating spermatids.

Mass spectrometric characterization, primary structure and phosphorylation sites of two variants.

by

Frédéric Chirat, Arlette Martinage, Gilbert Briand, Mostafa Kouach,

Alain Van Dorsselaer, Maurice Loir and Pierre Sautière.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Testes of sexually mature rams (*Ovis aries*) were collected at the Station de la Fertilité mâle de Nouzilly (France), and were used immediately or after freezing in liquid nitrogen and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ram spermatidal nuclear proteins were extracted and purified as described in [9].

Carboxypeptidase A treated with phenylmethylsulfonyl fluoride was from Sigma.

Thermolysin was from Merck. Endoproteinase Lys-C was purchased from Boehringer.

Acetonitrile for reverse-phase liquid chromatography was obtained from Rathburn. All solvents and reagents for gas phase sequencing were from Applied Biosystems. All other reagents were of the highest purity available.

Carboxypeptidase A digestion. Ram transition protein TP1 (1 nmol) was digested with carboxypeptidase A in 0.1 M N-methylmorpholine acetate buffer pH 8.0 with an enzyme-to-substrate ratio of 1/50 (w/w) for 15 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The digestion was stopped by lowering the pH with glacial acetic acid. The released amino acids were identified on the amino acid analyzer.

Cleavage with thermolysin. 10 nmol of ram TP1, dissolved in 400  $\mu$ l of 0.1 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.0, were digested with thermolysin at 37°C for 1 h, using an enzyme-to-substrate ratio of 1/50 (w/w). The digestion was stopped by lowering the pH with formic acid and the hydrolysate was freeze-dried prior to fractionation.

Cleavage with endoproteinase Lys-C. 10 nmol of ram TP1 dissolved in 400  $\mu$ l of 0.1 M ammonium bicarbonate buffer pH 8.0, were digested with endoproteinase Lys-C at 37°C for 2 h, using an enzyme-to-substrate ratio of 1/100 (w/w). The digestion was stopped by lowering the pH with formic acid and the hydrolysate was freeze-dried prior to fractionation.

Fractionation of peptides. Peptides generated by enzymatic cleavages were separated by reverse-phase high performance liquid chromatography on a C18 Brownlee column (220 x 4.6 mm) (particle size 5  $\mu$ m) using the gradient systems indicated in the legends of figures.

Amino acid analyses. Peptide samples were hydrolyzed in evacuated sealed tubes at 110°C for 24 h in 6 M HCl. One drop of 1 % phenol was added to prevent excessive degradation of tyrosine.

Sequence determination. Microsequencing was performed on a gas-phase sequencer Applied Biosystems 470A using the 03 RPTH Standard Program. The phenylthiohydantoin derivatives of amino acids were identified on an on-line phenylthiohydantoin analyzer Applied Biosystems 120A equipped with an integrator-calculator Shimadzu C-R4A. The amount of protein and of each peptide submitted to Edman degradation was approximately 1 nmol.



Mass spectrometry : 1) Fast Atom Bombardment (FAB). Positive FAB mass spectrometry was carried out on a ZAB-HF double focusing mass spectrometer (mass range 3200 Da at 8 KeV ion kinetic energy) and recorded on a VG 11/250 data system (VG Analytical Ltd, Manchester, UK). Ionisation of the sample was performed with 1 mA of a 8 KV energy Xe atom beam. The peptides were dissolved in desionized water at a concentration of 1 nmol/ $\mu$ l. The matrix was thioglycerol/TFA 1 %. 1  $\mu$ l of matrix was deposited on a stainless steel target and 1  $\mu$ l of peptide solution was added.

The wide scan spectra were generated by classical exponential magnetic scanning at a resolution of 1000 and at 8 KeV accelerating voltage.

2) Electrospray Mass Spectrometry (ESMS). Electrospray mass spectrometry was performed on a VG BIO-Q quadrupole mass spectrometer with a mass range of 3000. The mass spectrometer was scanned from  $m/z=100$  to  $m/z=1000$  in 15 seconds at unit resolution.

Calibration was performed using charged ions from PEG 800 obtained from a separate introduction.

The electrostatic spray ion source was operated at atmospheric pressure with an extraction cone voltage ( $V_c$ ) value of 150 volts. The protein sample was first dissolved in water containing 5 % acetic acid and then, an equivalent volume of methanol was added. The concentration used was between 30 and 100 pmol/ $\mu$ l. This solution (2 to 10  $\mu$ l) was introduced into the ion source at a flow rate of 2  $\mu$ l/min.

3) Plasma Desorption Mass Spectrometry ( $^{252}\text{Cf}$  PDMS). The plasma desorption mass spectrometry of peptide Th5 was obtained on a BIO-ION BIN 10 K Instrument (BIO-ION AB, Box 15045, Uppsala, Sweden). The spectrum was acquired for  $10^6$  fission events (15-20 min) or for  $4 \times 10^6$  events). Data handling procedures have been described by Sundqvist *et al.* [33].

The sample was dissolved (concentration 2.5 nmol/ $\mu\text{l}$ ) in a water/methanol solution (4/1, v/v) containing 0.1 % TFA. The sample (2  $\mu\text{l}$ ) was deposited on the matrix and let to dry. Finally, the dry target was inserted into the mass spectrometer.

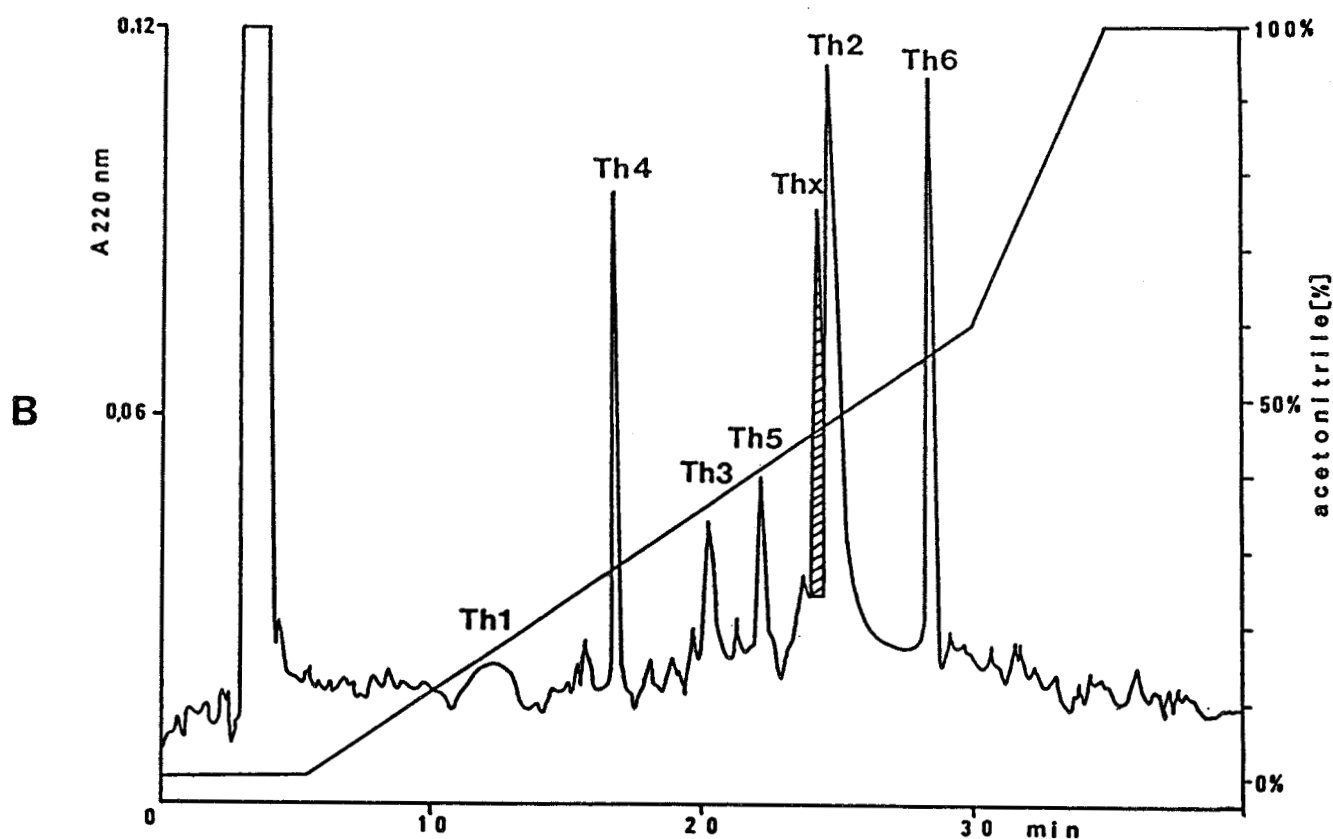
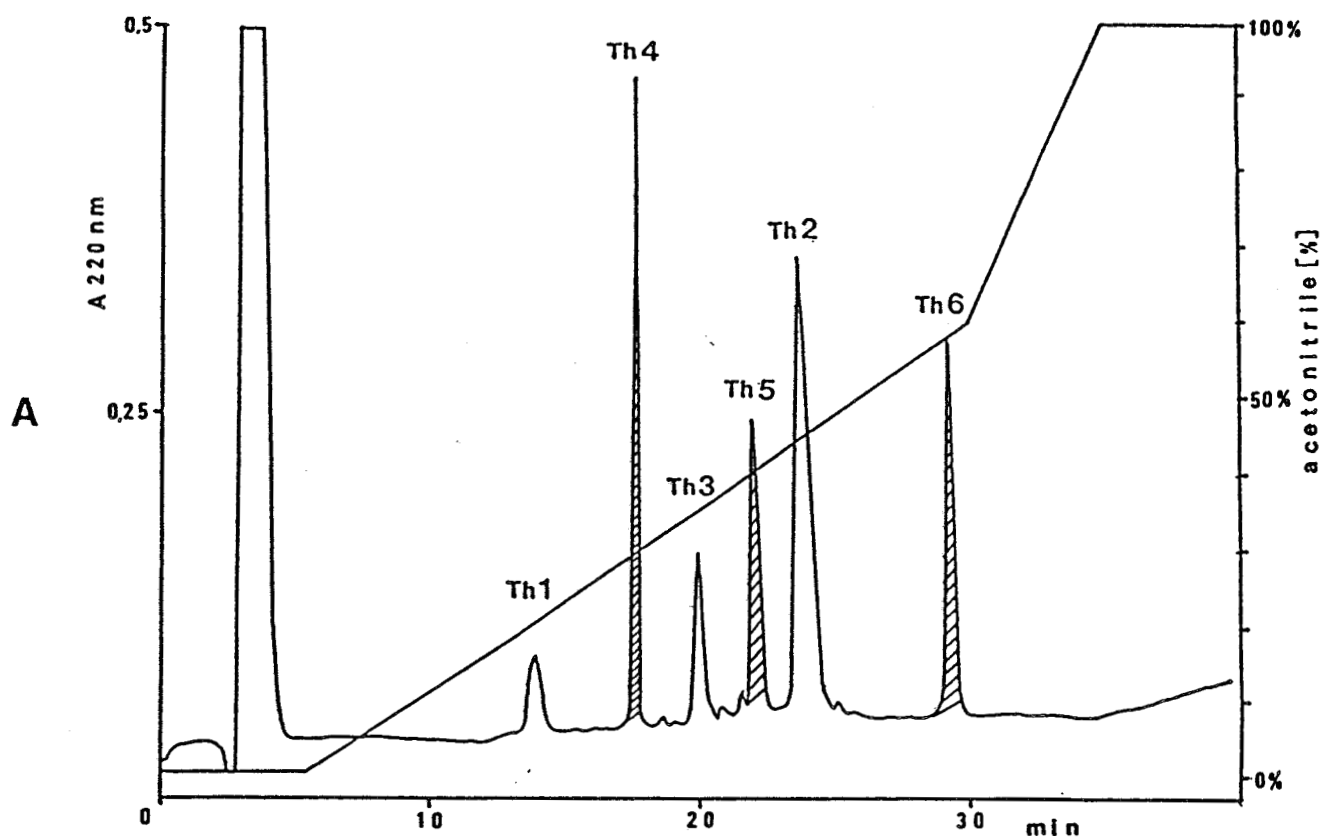
Nomenclature of peptides. Peptides obtained from cleavage with thermolysin and with endoproteinase Lys-C were designated by Th- and K- respectively. Peptides were numbered according to their position in the amino acid sequence of the protein.

Conversion of phosphoserine to S-ethyl cysteine. The phosphoserine-containing thermolysin peptides were derivatized according to Meyer *et al.* [32] modified by Swiderek *et al.* [34].

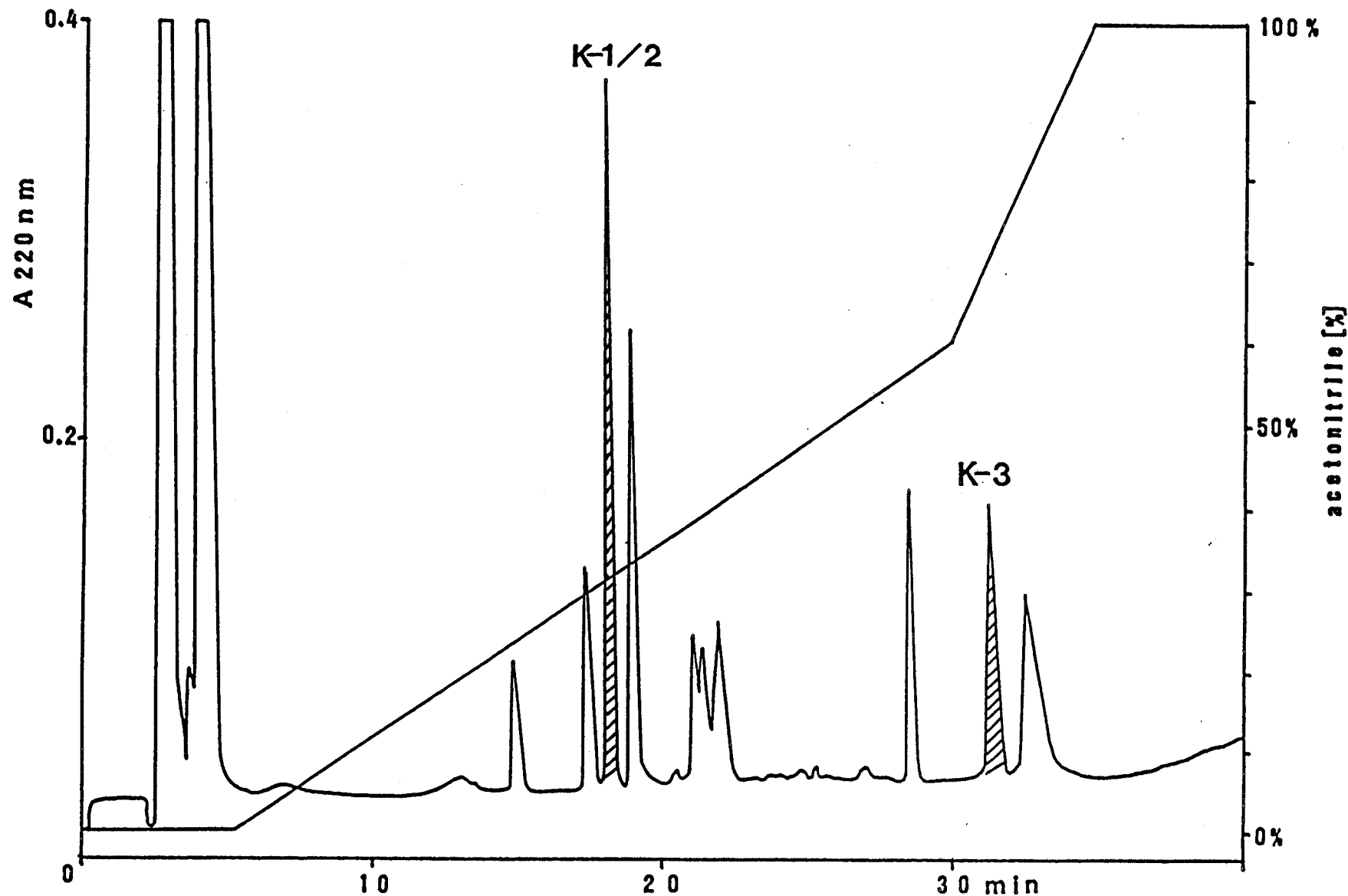
1 nmol of peptide placed in a small glass tube was dissolved in 25  $\mu\text{l}$  of the derivatization mixture consisting of 400  $\mu\text{l}$  of water, 100  $\mu\text{l}$  of absolute ethanol, 65  $\mu\text{l}$  of 5 M sodium hydroxyde and 60  $\mu\text{l}$  of ethanethiol.

The tube was flushed with argon, tightly closed and incubated at 50°C for 1 h. After incubation the solution was evaporated to dryness. The derivatized peptide was then dissolved in 30  $\mu\text{l}$  of water and applied directly on a polybrene-treated glass fiber disk for sequence determination.

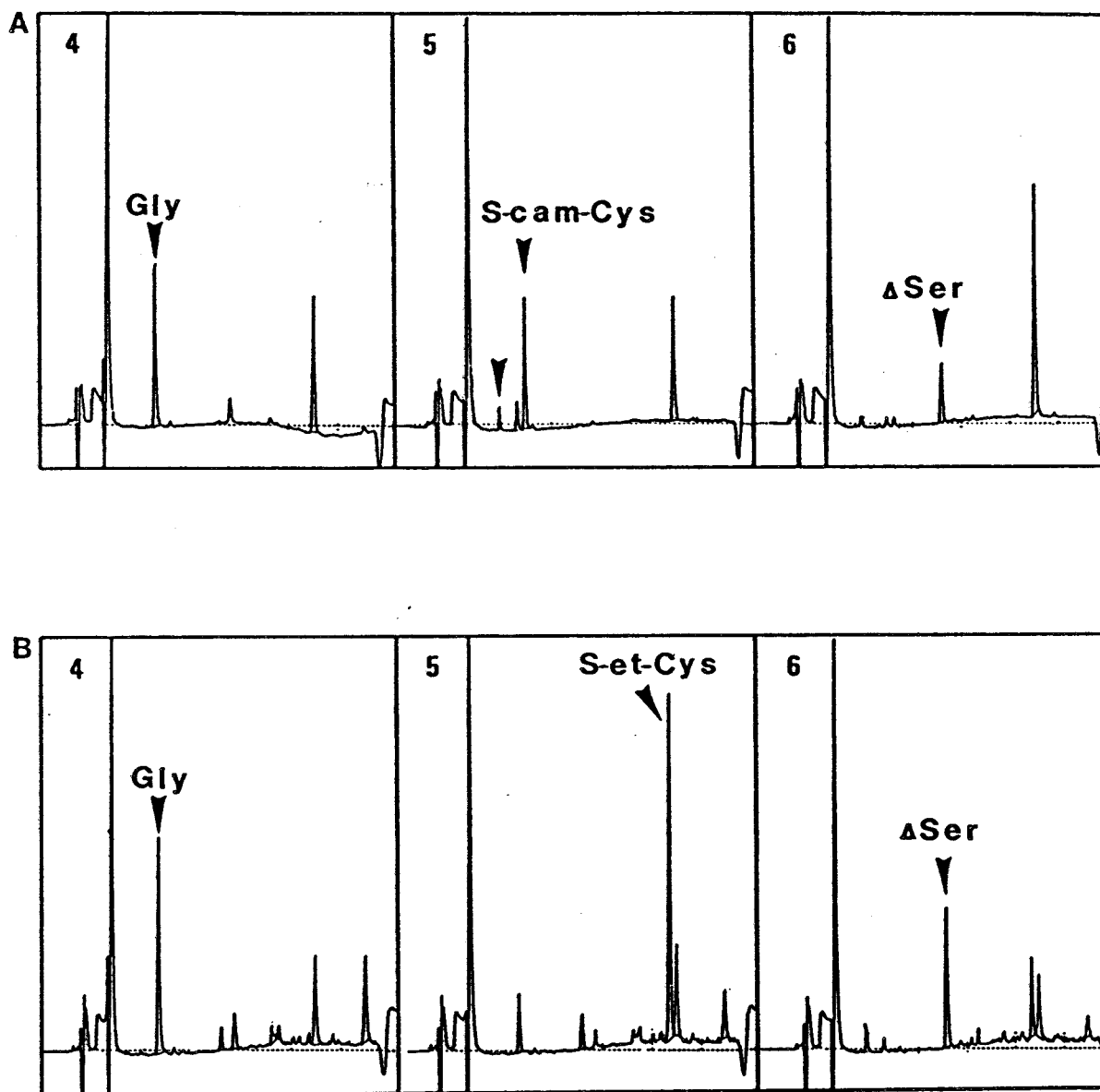
The use of a small volume of derivatization mixture avoids the clogging of the glass fiber disk by salts.



**Figure S1:** Fractionation by RP-HPLC of peptides generated from thermolysin cleavage of the non-phosphorylated ram TP1(A) and the monophosphorylated ram TP1(B). The peptides (10nmol) were separated on a C<sub>18</sub> column 5 $\mu$ m (Brownlee 220x4.6 mm). The elution was performed with a linear gradient from 0 to 60% of 50% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid, at a flow rate of 1ml/min. The absorbance was measured at 220nm. The hatched peaks correspond to peptides submitted to automated Edman degradation. The peptides were numbered in order to their position in the sequence of the protein.



**Figure S2:** Fractionation by RP-HPLC of peptides generated from endoproteinase Lys-C cleavage of the non-phosphorylated ram TP1. The peptides (10nmol) were separated and numbered as indicated in legend to figure S1. The hatched peaks correspond to peptides used to establish the complete amino acid sequence of ram TP1.



**Figure S3:** Automated Edman degradation of peptide Th3 derived from the cleavage of ram TP1 with thermolysin. Only cycles 4, 5 and 6 are presented. Peptide Th3 (1 nmol) was sequenced before (A) and after (B) the treatment described by Meyer et al [32] for the transformation of P-Ser in S-ethyl cysteine. At cycle 5, the Pth-S-carboxamidomethyl cysteine (S-cam-Cys) observed before treatment (A) is no more observed after treatment (B). In place, a Pth-derivative with a retention time identical to that of the Pth-S-ethyl cysteine (S-et-Cys) is present.

TABLE I

Amino acid sequence of S-carboxamidomethylated ram TP1 and of peptides derived from cleavage with thermolysin (Th-) and endoproteinase Lys-C (K-) respectively. Pth-amino acids were identified and quantified by RP-HPLC. Peptides K1 and K2 could not be separated and were sequenced together.

| Cycle | TP1 |      | Th4 |      | Th5 |      | Th6 |      | K1/2 |      | K3 |      |   |     |
|-------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|------|------|----|------|---|-----|
|       | AA  | pmol | AA  | pmol | AA  | pmol | AA  | pmol | AA   | pmol | AA | pmol |   |     |
| 1     | S   | 339  | Y   | 68   | L   | 270  | F   | 157  | S    | n.q  | Y  | 23   | R | 21  |
| 2     | T   | 267  | R   | 28   | K   | 318  | R   | n.q  | S    | n.q  | R  | 15   | C | n.q |
| 3     | S   | 217  | K   | 22   | S   | 66   | S   | 83   | L    | 13   | K  | 12   | D | 46  |
| 4     | R   | 83   | S   | n.q  | R   | 56   | H   | 8    | K    | 10   |    |      | D | 48  |
| 5     | K   | 341  | S   | n.q  | K   | 171  | L   | 23   |      |      |    |      | A | 46  |
| 6     | L   | 294  |     |      | R   | 77   |     |      |      |      |    |      | N | 40  |
| 7     | K   | 344  |     |      | C   | 76   |     |      |      |      |    |      | R | 21  |
| 8     | S   | 108  |     |      | D   | 45   |     |      |      |      |    |      | N | 30  |
| 9     | Q   | 194  |     |      | D   | 61   |     |      |      |      |    |      | F | 38  |
| 10    | G   | 175  |     |      | A   | 92   |     |      |      |      |    |      | R | 20  |
| 11    | T   | 59   |     |      | N   | 92   |     |      |      |      |    |      | S | n.q |
| 12    | R   | 38   |     |      | R   | 49   |     |      |      |      |    |      | H | 12  |
| 13    | R   | 53   |     |      | N   | 51   |     |      |      |      |    |      | L | n.q |
| 14    | G   | 125  |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 15    | K   | 168  |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 16    | N   | 112  |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 17    | R   | 34   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 18    | T   | 39   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 19    | P   | 67   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 20    | H   | 20   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 21    | K   | 96   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 22    | G   | 62   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 23    | V   | 50   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 24    | K   | 97   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 25    | R   | 23   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 26    | G   | 58   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 27    | C   | n.q  |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 28    | S   | 21   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 29    | K   | 58   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 30    | R   | 17   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 31    | K   | 59   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 32    | Y   | 18   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 33    | R   | 18   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 34    | K   | 47   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 35    | S   | 15   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 36    | S   | n.q  |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 37    | L   | 9    |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |
| 38    | K   | 34   |     |      |     |      |     |      |      |      |    |      |   |     |

n.q : not quantified.

TABLE II

Edman degradation of thermolysin peptides Th2 and Thx from monophosphorylated ram TP1, performed on the gas-phase sequencer. These peptides were derivatized according to Meyer et al [32]. Pth-amino acids were identified and quantified by RP-HPLC.

## Peptide (Th2+Thx)

| Cycle | Identified residue | yield (pmol) | Identified residue | Yield (pmol) |
|-------|--------------------|--------------|--------------------|--------------|
| 1     | Leu                | 433.2        | Tyr                | 215.3        |
| 2     | Lys                | 297.9        | Arg                | 85.3         |
| 3     | Ser/S-ethyl Cys    | n.q          | Lys                | n.q          |
| 4     | Gln                | 151.4        | Ser/S-ethyl Cys    | n.q          |
| 5     | Gly                | 140.9        | Ser/S-ethyl Cys    | n.q          |
| 6     | Thr                | 29.3         | Leu                | 44.0         |
| 7     | Arg                | 86.4         | Lys                | 130.6        |
| 8     | Arg                | 135.6        | Ser/S-ethyl Cys    | n.q          |
| 9     | Gly                | 58.5         | Arg                | n.q          |
| 10    | Lys                | n.q          | Lys                | n.q          |
| 11    | Asn                | 46.0         | Arg                | 50.0         |
| 12    | Arg                | n.q          | S-ethyl Cys*       | n.q          |
| 13    | Thr                | n.q          | Asp                | 24.4         |
| 14    | Pro                | 23.4         | Asp                | 25.3         |
| 15    | His                | 11.8         | Ala                | 10.8         |

n.q : not quantified.

\* : At cycle 12, the Pth-derivative with a retention time identical to that of Pth-S-ethyl cysteine was observed in place of Pth-S-carboxamidomethyl cysteine.

## II - 2-1-2 Conclusion

Dans le testicule de bélier, la protéine TP1 est en fait un mélange de deux variants structuraux qui diffèrent simplement par la nature du résidu en position 27 (cystéine dans le variant majeur et glycine dans le variant mineur). Il faut souligner que l'identification de ces variants n'a été rendue possible que par l'utilisation de la spectrométrie de masse.

La protéine TP1, isolée du testicule de bélier, présente une grande similitude avec les autres protéines TP1 de mammifères (homme, rat, souris, taureau et verrot). Ce haut degré de conservation entre les protéines TP1 de mammifères, qui se manifeste en particulier dans la zone centrale de la molécule (résidus 29 à 42) caractérisée par sa richesse en résidus basiques ainsi que par la présence d'un résidu de tyrosine et d'au moins un résidu de sérine phosphorylable, est en faveur d'une fonction biologique importante.

Les travaux de SINGH et RAO, en 1987, et plus spécifiquement l'étude de la fusion de l'ADN en présence de TP1 de rat, ont permis de conclure que cette protéine pouvait jouer un rôle dans la déstabilisation de la chromatine, déstabilisation nécessaire pour le déplacement des histones et la mise en place ultérieure des protamines.

Nous avons vu que la protéine TP1 était présente dans le testicule sous trois formes : non phosphorylée, mono-phosphorylée et diphosphorylée.



Cette phosphorylation pourrait intervenir avant et/ou après le dépôt de la protéine TP1 sur l'ADN. Dans le premier cas, la phosphorylation permettrait un dépôt correct des protéines sur l'ADN en modulant les interactions ADN-protéine TP1 ou en changeant la conformation de la protéine. Dans le second cas, cette modification pourrait entraîner une dissociation du complexe ADN-protéine TP1 pour la mise en place de la ou des protamine(s).

Par ailleurs, l'existence de quatre sites de phosphorylation dans la forme monophosphorylée fait ressortir un certain manque de spécificité quoique parmi ces sites, les sites 35 et 36 apparaissent privilégiés. Les sérines 35 et 36 sont du reste localisées dans une séquence de type basique-X-sérine reconnue par la protéine kinase dépendante de l'AMP-cyclique (SHLYAPNIKOV *et al.*, 1975 ; MARTINAGE *et al.* 1980).

## II - 2-2 ETUDE DES PROTEINES INTERMEDIAIRES TP2 et 3

### II - 2-2-1 Purification des protéines TP2 et 3 par chromatographie de tamisage moléculaire

A partir de 500 g de testicule de bélier, 200 mg de protéines insolubles dans le PCA et carboxamidométhylées ont été obtenues. L'analyse électrophorétique de cette fraction a montré qu'elle était essentiellement constituée de protéines de haut poids moléculaire. Les protéines TP2 et 3 ne sont visibles qu'après avoir augmenté de façon importante la quantité de protéine déposée (40 µg au lieu de 5 µg habituellement requis).

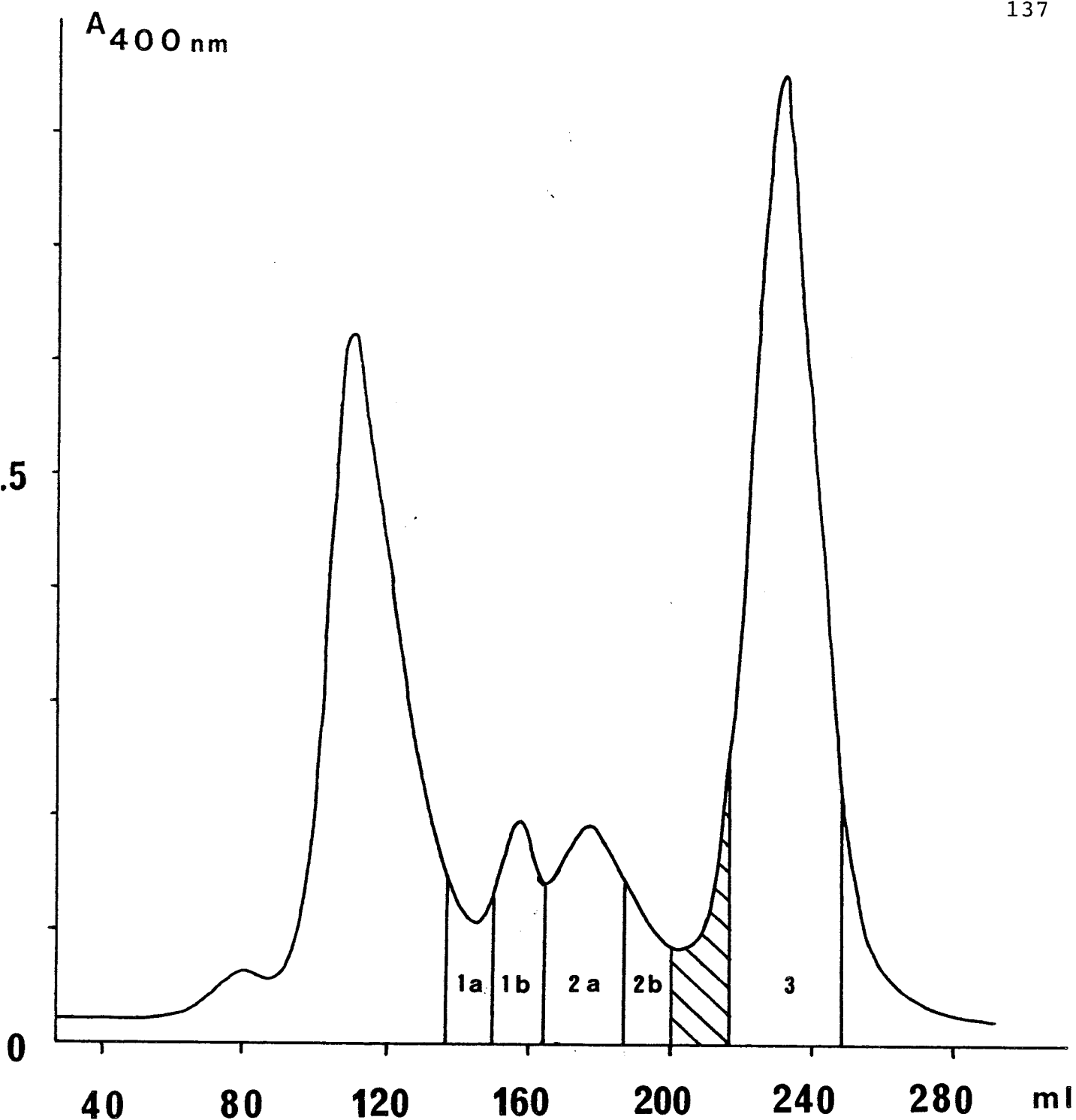
Afin de réaliser un enrichissement de ces deux protéines, nous avons choisi, dans un premier temps, de réaliser un fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire, sur une colonne de TSK HW 50S. L'élution est réalisée par une solution d'urée 4 M, NaCl 1,5 M à pH 3,0. Le diagramme d'élution et l'analyse électrophorétique des différentes fractions sont présentés dans les figures 21 et 22 respectivement.

La protéine TP2 est la protéine intermédiaire majeure de la fraction 1 (1a, 1b). La fraction 2 (2a, 2b) est constituée essentiellement de la protéine 3 contaminée par la protéine TP2 et par des constituants de mobilité électrophorétique légèrement supérieure à celle de la protéine 3. La fraction 3 renferme surtout de la protamine qui apparaît sous la forme d'un doublet. Nous reviendrons ultérieurement sur ce point.

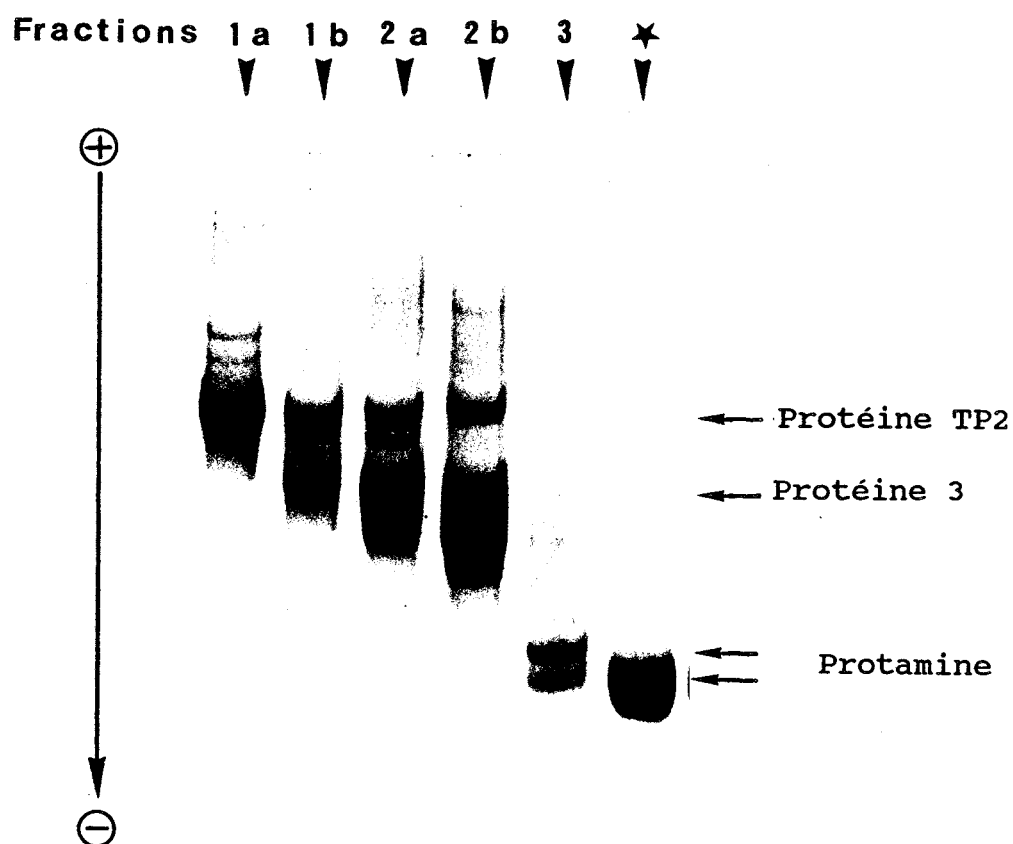
En considérant la hauteur des pics, nous observons que les deux protéines intermédiaires TP2 et 3 sont en quantité extrêmement faible dans l'échantillon de départ : les fractions 1 et 2 représentent chacune 2,5 % du matériel protéique déposé sur la colonne (60 mg). Ce résultat explique pourquoi il faut augmenter de façon importante la quantité d'échantillon habituellement déposée sur les gels de polyacrylamide pour visualiser ces protéines.

#### II - 2-2-2 Purification des protéines TP2 et 3 par CLHP d'échange d'ions

Les fractions 1 et 2, enrichies en protéines TP2 et 3 respectivement, sont fractionnées sur CLHP d'échange d'ions sur une colonne de carboxyméthyl TSK. Les diagrammes d'élution



**Figure 21** : Purification des protéines intermédiaires PCA insolubles par tamisage moléculaire sur une colonne TSK HW50S. Les protéines ont été éluées de la colonne par un tampon urée 4M, NaCl 1.5M pH 3.0, à un débit de 8 ml/h. Des fractions de 4 ml ont été collectées. Le repérage des protéines a été effectué par turbidimétrie à 400 nm.



**Figure 22** : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide (acide acétique 0.9M ; urée 6.25M) des fractions obtenues après tamisage moléculaire sur une colonne de TSK HW50S des protéines intermédiaires PCA insolubles isolées du testicule de bélier.

★: Protamine isolée des spermatozoïdes éjaculés de bélier.

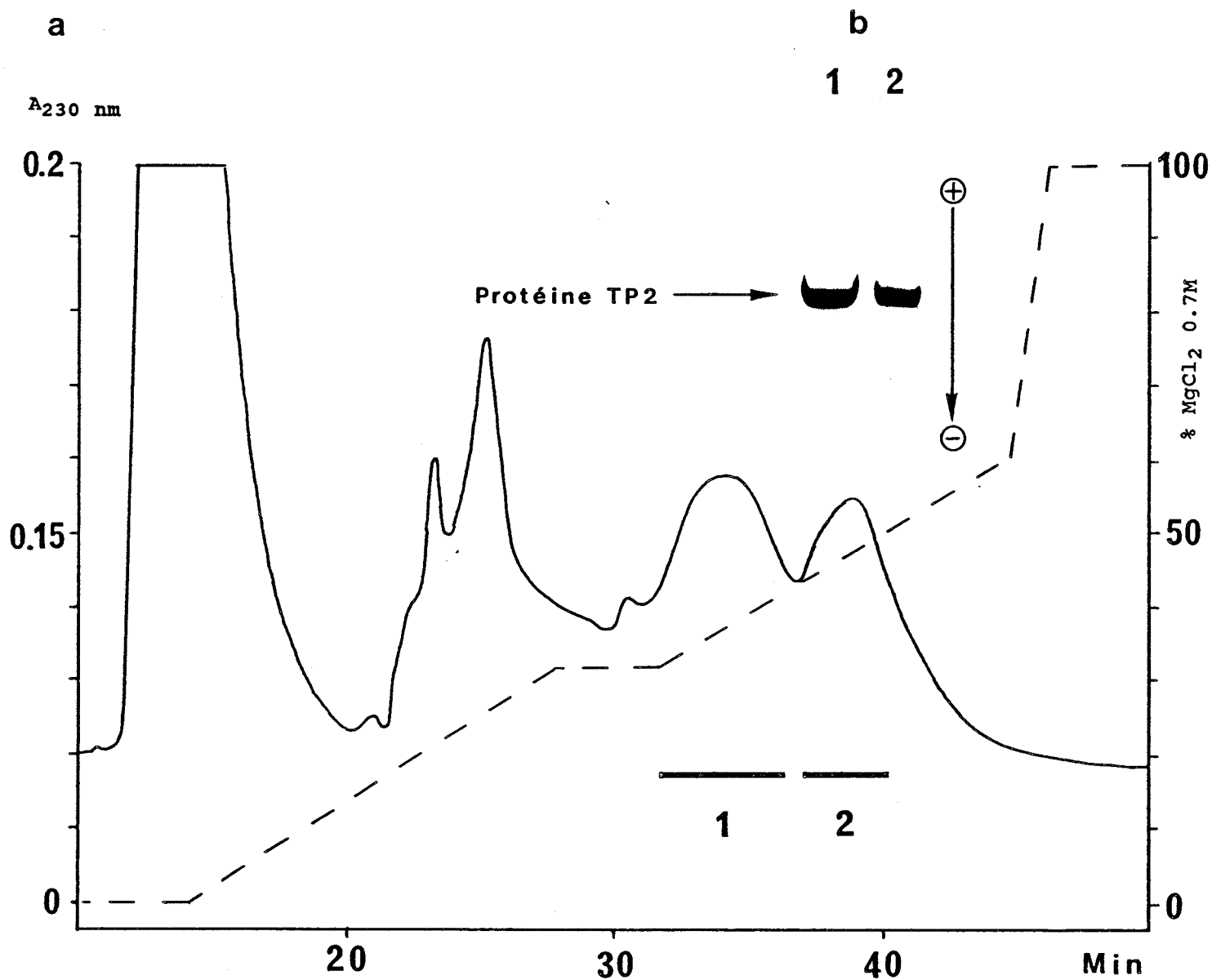
obtenus à partir de chacune de ces fractions et les contrôles électrophorétiques correspondants sont présentés dans les figures 23a et 24a.

L'élution de la protéine TP2 dans deux pics différents (pics 1 et 2) (Figure 23a) appelle un commentaire : ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence de variants structuraux ou de modifications post-traductionnelles mais l'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en milieu acide acétique-urée ne fait apparaître qu'une seule bande (Figure 23b) et donc l'explication avancée plus haut ne peut être retenue.

Chacune des sous-fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions est débarrassée de ses sels par chromatographie en phase inverse sur colonne de C18, 10  $\mu\text{m}$  ( $\mu\text{Bondapak}$ ), éluée avec un gradient d'acétonitrile dans une solution de TFA à 0,1%.

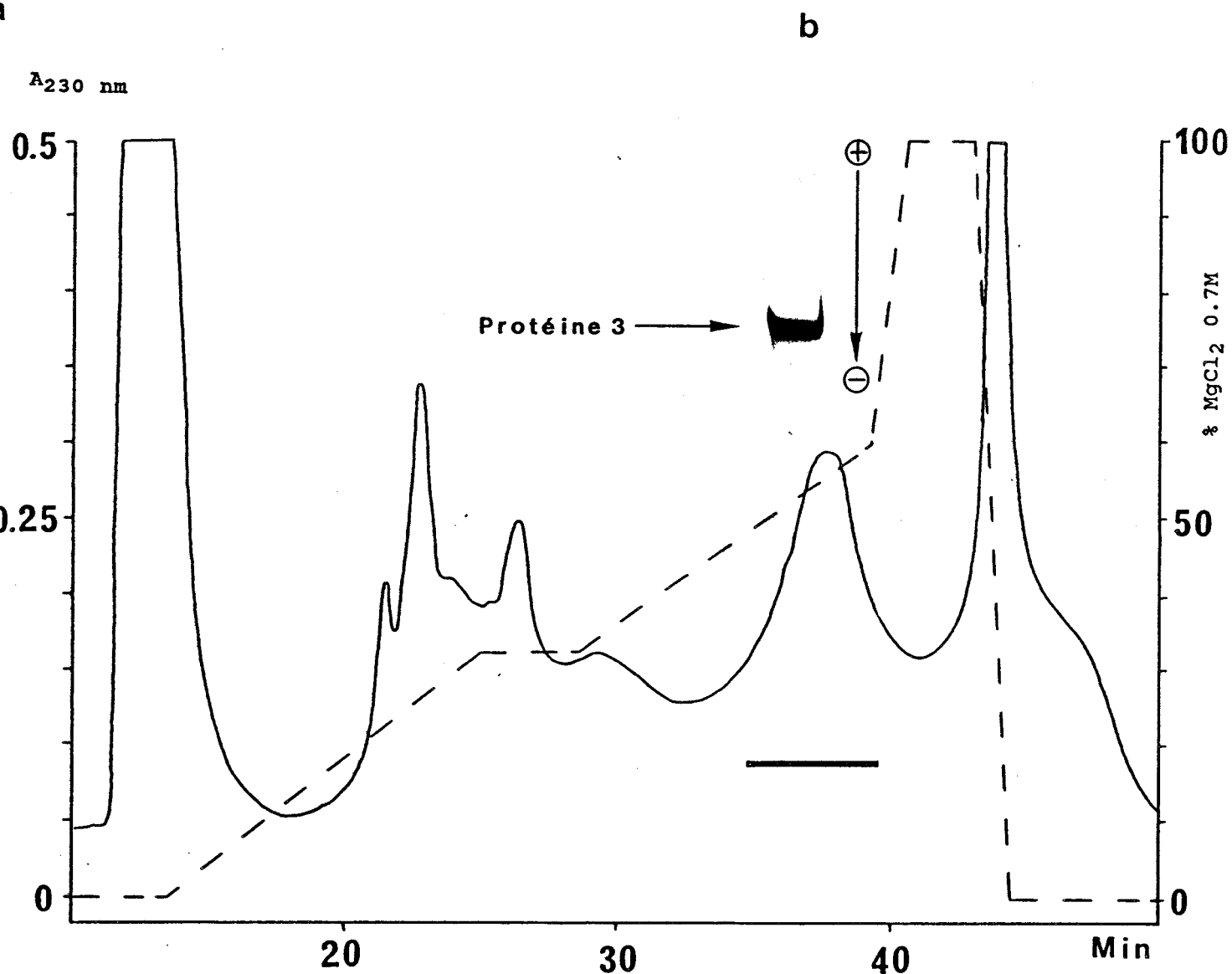
L'analyse électrophorétique de chacune des sous-fractions (Figures 23b et 24b) indique que les deux protéines intermédiaires TP2 et 3 sont obtenues dans un état de pureté satisfaisant pour entreprendre la détermination de leur structure primaire. Malheureusement, les quantités obtenues pour chacune d'elles sont excessivement faibles : 50  $\mu\text{g}$  ce qui correspond à environ 5 nanomoles.

D'autres méthodes de préparation (isolement des noyaux, séparation chromatographique) ont été utilisées pour tenter d'améliorer ces rendements : elles se sont hélas soldées par un échec.



**Figure 23 :** a) Purification de la protéine TP2 de bœuf par CLHP en échange d'ions sur une colonne de carboxyméthyl-TSK. La protéine TP2 carboxamidométhylée a été éluée par un gradient linéaire (trait pointillé) de  $\text{MgCl}_2$  (0 à 0.7M) dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6.0 , à un débit de 1ml/min. Des fractions de 0.5 ml ont été collectées. L'élué des protéines a été suivi à 230 nm.

b) Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide (acide acétique 0.9M ; urée 6.25M) des fractions indiquées par une barre.



**Figure 24 :** a) Purification de la protéine 3 de bœuf par CLHP en échange d'ions sur une colonne de carboxyméthyl-TSK. La protéine 3 carboxamidométhylée a été éluée par un gradient linéaire (trait pointillé) de MgCl<sub>2</sub> (0 à 0.7M) dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6.0, à un débit de 1ml/min. Des fractions de 0.5 ml ont été collectées. L'élué des protéines a été suivi à 230 nm.

b) Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide (acide acétique 0.9M ; urée 6.25M) de la fraction indiquée par une barre.

II - 2-2-3 Etude de la structure primaire de la protéine TP2 de bélier

\* *Détermination de la composition en acides aminés*

La composition en acides aminés de la protéine TP2 carboxamidométhylée est en accord avec celle déterminée par DUPRESSOIR *et al.*, en 1985 (Tableau VIII).

La protéine TP2 qui renferme environ 5 % de cystéine se caractérise par sa richesse en résidus basiques ( $\sim 35$  % dont 8 % d'histidine) et en résidus de sérine ( $\sim 22$  %). Elle est constituée d'environ 125 résidus d'acides aminés.

La composition en acides aminés de la protéine TP2 de bélier est très proche de celle de la protéine TP2 de rat (GRIMES *et al.*, 1977).

\* *Séquençage direct de la protéine TP2 de bélier*

Le séquençage direct de la protéine TP2 de bélier carboxamidométhylée a révélé, par l'absence d'un PTH amino-acide au premier cycle de dégradation, que l'extrémité N-terminale de la molécule était bloquée. Une tentative de déblocage avec HCl 6 M à 100°C pendant 2 min (CAMPBELL et COHEN, 1989) s'est révélée infructueuse puisqu'elle a conduit à une hydrolyse de la protéine comme en témoignent les nombreux PTH amino-acides qui apparaissent au premier cycle de la dégradation automatique d'Edman.



**TABLEAU VIII**

Compositions en acides aminés de la protéine TP2 spécifique des spermatozoïdes de bélier, de son peptide C-terminal (28 résidus) et de la protéine TP2 de rat (GRIMES et al., 1977).

| Acides Aminés | TP2 de bélier                     | Peptide C-terminal TP2 de bélier | TP2 de rat |
|---------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------|
| Asp           | 5.7 <sup>a</sup> (7) <sup>b</sup> | 3.8(1) <sup>c</sup>              | 4.3        |
| Thr           | 4.1(5)                            | -                                | 6.6        |
| Ser           | 18.0(22)                          | 9.2(3)                           | 14.4       |
| Glu           | 8.5(9)                            | 10.7(3)                          | 4.8        |
| Pro           | 6.1(7)                            | -                                | 12.0       |
| Gly           | 6.3(6)                            | 6.9(2)                           | 5.8        |
| Ala           | 3.1(3)                            | -                                | 4.7        |
| Cys           | n.d                               | -                                | 4.4        |
| Val           | 2.7(3-4)                          | 9.8(3)                           | 2.8        |
| Met           | n.d                               | -                                | 3.1        |
| Ile           | 0.5(1)                            | 2.6(1)                           | 0.3        |
| Leu           | 2.6(3)                            | -                                | 2.3        |
| Tyr           | 2.2(2-3)                          | 6.9(2)                           | 1.8        |
| Phe           | -                                 | -                                | 0.2        |
| His           | 7.9(9-10)                         | -                                | 8.3        |
| Lys           | 7.7(8-9)                          | 30.6(8)                          | 9.9        |
| Arg           | 22.2(21)                          | 19.2(5)                          | 14.2       |

n.d : non déterminé

a : les résultats sont exprimés en moles/100moles

b : le nombre de résidus entre parenthèses a été déterminé sur la base d'un résidu d'isoleucine par molécule de protéine.

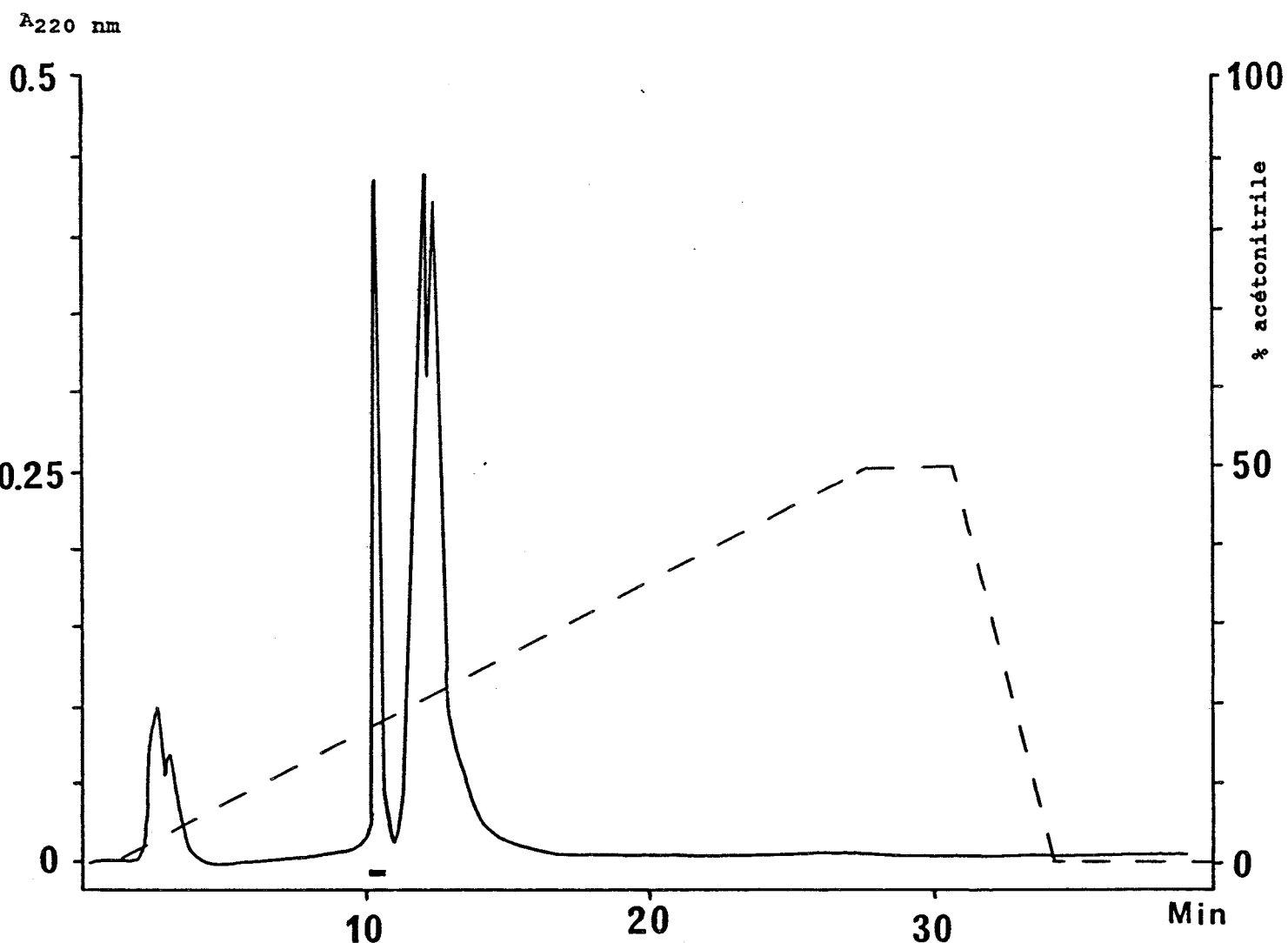
c : Le nombre de résidus entre parenthèses a été déduit de la séquence en acides aminés du peptide.

Nous avons ensuite entrepris une coupure de la protéine TP2 de bélier par l'endoprotéinase Glu-C, suivant ainsi la même démarche que COLE et KISTLER, en 1987, pour fragmenter la protéine TP2 de rat. Après digestion de la protéine TP2 par l'endoprotéinase Glu-C pendant 16 heures, les peptides ont été fractionnés par CLHP en phase inverse. Le diagramme d'élution est présenté dans la figure 25. Trois fractions ont été obtenues dont l'une correspond au fragment C-terminal de la protéine (représentée par un tiret sur la figure 25). La composition en acides aminés du peptide C-terminal est présentée dans le tableau VIII. Ce peptide se caractérise par son taux élevé de résidus basiques (lysine, arginine) qui atteint 50 %. Ce peptide renferme également l'unique résidu d'isoleucine présent dans la protéine.

*\* Séquence en acides aminés du peptide C-terminal*

La séquence du peptide C-terminal de la protéine TP2 de bélier, déterminée par dégradation automatique d'Edman est présentée dans la figure 26. On remarquera :

- la distribution relativement homogène des résidus basiques qui représentent la moitié des acides aminés du peptide.
- la présence de trois résidus de sérine dont deux sont présents dans la séquence consensus "basique-X-sérine" (X = tout acide aminé excepté la proline). Il s'agit des séquences  $^{10}\text{Lys-Arg-Ser}^{12}$  et  $^{20}\text{Arg-Gln-Ser}^{21}$  dans le peptide. De tels résidus de sérine constituent des sites de phosphorylation par les protéines kinases dépendantes de l'AMP-cyclique (SHLYAPNIKOV *et al.*, 1975 ; MARTINAGE *et al.*, 1980). Cependant, la protéine TP2 de bélier intacte apparaît en gel de polyacrylamide sous la forme d'une seule bande, ce qui écarte, à priori, l'existence de molécules phosphorylées.



**Figure 25** : Fractionnement par CLHP en phase inverse des peptides obtenus après clivage de la protéine TP2, spécifique des spermatozoïdes de bélier, par l'endoprotéinase Glu-C.

Les peptides ( 10 nmoles) ont été séparés sur une colonne C18 , 10µm (uBondapak 260x4.6 mm). L'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile /TFA 0.1% de 0 à 50% (trait pointillé), à un débit de 1 ml/min . L'absorbance a été mesurée à 220nm. La barre correspond au peptide qui a été soumis à la dégradation automatique d'Edman.

1 5 10  
(Glu)-Gly-Lys-Val-Ile-Lys-Arg-Lys-Gln-Val-Lys-

15 20  
Arg-Ser-Lys-Gln-Val-Tyr-Lys-Arg-Lys-Arg-

25  
Gln-Ser-Ser-Gly-Arg-Lys-Tyr-Asn(OH)

**Figure 26** : Séquence en acides aminés du peptide C-terminal (28 résidus) obtenu après clivage de la protéine TP2 de bélier par l'endoprotéinase Glu-C.

Le peptide C-terminal possède également deux tyrosines (en positions 16 et 27 dans le peptide) placées toutes deux à proximité d'un centre basique. Cela pourrait permettre une intercalation des noyaux aromatiques des deux tyrosines entre les bases de l'ADN comme cela a été montré par SINGH et RAO en 1987 à propos des résidus de tyrosine présents dans la protéine TP1 de rat. Une discussion plus approfondie des conséquences de cette intercalation est présentée dans notre publication concernant la protéine TP1 de bélier (page 112).

La comparaison du fragment C-terminal de la protéine TP2 de bélier avec les fragments homologues de la protéine TP2 de rat (COLE et KISTLER, 1987 ; LUERSSSEN *et al.*, 1989) et de la protéine TP2 de souris (KLEENE et FLYNN, 1987) (Figure 27) montre une très grande similitude de structure primaire entre ces fragments. Cependant, il faut noter que le degré de similitude entre la protéine TP2 de rat et la protéine TP2 de souris est supérieur à celui qui existe entre l'une ou l'autre de ces protéines et la protéine TP2 de bélier. La même constatation a été faite pour les protéines TP1 de ces trois espèces (CHIRAT *et al.*, soumis pour publication).

#### \* Conclusions

L'ensemble des résultats obtenus à partir de la protéine TP2 du testicule de bélier, nous permet de tirer plusieurs conclusions.

Premièrement, la protéine intermédiaire de bélier initialement nommée protéine P1 correspond à une protéine de transition de type TP2 également présente chez le rat et la souris et très vraisemblablement chez les autres mammifères.

|                     |    |   |   |   |     |    |   |   |   |   |   |       |    |   |      |   |   |   |
|---------------------|----|---|---|---|-----|----|---|---|---|---|---|-------|----|---|------|---|---|---|
|                     | 1  |   |   |   |     | 10 |   |   |   |   |   |       | 20 |   |      |   |   |   |
| <u>TP2 Souris</u> : | EG | K | V | S | KRK | A  | V | R | R | R | K | RTHRA | KR | R | SSGR | R | Y | K |
| <u>TP2 Rat</u> :    | EG | N | V | S | KRK | A  | V | R | R | R | K | RTHRA | KR | R | SSGR | R | Y | K |
| <u>TP2 Bélier</u> : | EG | K | V | I | KRK | Q  | V | K | R | S | K | QVYKR | KR | Q | SSGR | K | Y | N |

**Figure 27** : Comparaison des séquences en acides aminés des extrémités C-terminales des protéines TP2 de souris (KLEENE et al., 1987), de rat (LUERSEN et al., 1989; COLE and KISTLER, 1987) et de bélier. Les séquences encadrées sont strictement identiques.

Cette affirmation est étayée par les arguments suivants :

- très grande similitude de composition en acides aminés entre la protéine P1 de bélier et la protéine TP2 de rat ou de souris.
- très grande similitude de structure primaire des extrémités C-terminales de ces trois protéines.

Deuxièmement, environ la moitié des résidus basiques de la protéine sont localisés dans sa partie C-terminale. On peut donc penser que les interactions de type électrostatique ou hydrogène avec l'ADN ont lieu dans cette zone de la molécule.

Troisièmement, cette répartition dissymétrique des résidus basiques dans la molécule, laisse supposer l'existence d'au moins deux domaines : le premier étant l'extrémité C-terminale très basique et le second correspondant au reste de la molécule (environ 90 résidus).

Afin d'établir la structure primaire complète de la protéine TP2 de bélier, trois méthodes de coupure nous apparaissent intéressantes : l'hydrolyse par la thermolysine et la trypsine et la coupure au bromure de cyano-gène. Cette structure primaire nous permettrait d'établir une séquence consensus plus précise concernant les protéines TP2, car à ce jour, seules deux structures primaires complètes sont disponibles (KLEENE et FLYNN, 1987 ; LUERSSEN *et al.*, 1989). Il convient de noter que ces deux structures primaires ont été déduites de la séquence nucléotidique des gènes correspondants.

## II - 2-2-4 Etude de la structure primaire de la protéine 3 de bélier

### \* *Détermination de la composition en acides aminés*

La protéine 3 carboxamidométhylée a été soumise à une hydrolyse acide totale : sa composition en acides aminés, présentée dans le tableau IX, est en accord avec celle déterminée par DUPRESSOIR *et al.* en 1985. La protéine 3 est caractérisée par un taux élevé de résidus basiques (proche de 40 %) et d'acides aminés dicarboxyliques (15 %). Elle renferme de la cystéine (3 %) et est constituée d'environ 105 résidus d'acides aminés, déterminés sur la base d'une isoleucine par molécule.

La composition en acides aminés de la protéine 3 de bélier ne montre aucune similitude avec celle de la protéine TP3 de rat (GRIMES *et al.*, 1977) (Tableau IX). Les deux différences majeures se situent au niveau des taux de glycine et de lysine.

### \* *Séquence directe de la protéine 3*

La protéine 3 carboxamidométhylée (1 nmole) a été soumise à la dégradation automatique d'Edman. Nous avons pu déterminer, sans aucune ambiguïté, la structure primaire des 27 premiers résidus (Figure 28).

La présence de cinq résidus de lysine, sur les 14 que compte la molécule, dans la séquence des 27 premiers résidus, nous a amené à hydrolyser la protéine 3 par l'endoprotéinase Lys-C qui coupe très spécifiquement les liaisons Lys-X (X différent de la proline).



**TABLEAU IX**

Composition en acides aminés de la protéine 3 spécifique des spermatides de bélier et de la protéine TP3 de rat (GRIMES et al., 1977).

| Acides Aminés | Protéine 3 | TP3 de rat |
|---------------|------------|------------|
| Asp           | 5.8 (a)    | 5.0        |
| Thr           | 5.9        | 2.5        |
| Ser           | 6.8        | 10.2       |
| Glu           | 9.7        | 10.8       |
| Pro           | 4.6        | 3.3        |
| Gly           | 5.6        | 21.0       |
| Ala           | 5.9        | 4.0        |
| Cys           | 2.9        | 3.4        |
| Val           | 5.1        | 3.7        |
| Met           | 1.1        | 0.9        |
| Ile           | 1.2        | 2.0        |
| Leu           | 5.1        | 3.5        |
| Tyr           | 2.8        | 2.4        |
| Phe           | 1.7        | 0.8        |
| His           | 0.4        | n.d        |
| Lys           | 14.3       | 1.8        |
| Arg           | 24.0       | 24.1       |

(a) : Les résultats sont exprimés en moles/100 moles

```
      1                5                10
(H) Ala-Lys-Gly-Thr-Arg-Lys-Pro-Arg-Gln-Pro

                15                20
Arg-Arg-Val-Ala-Val-Arg-Phe-Ala-Ser-Arg

                25
Met-Lys-Gly-Arg-Lys-Lys-Thr-----
```

**Figure 28** : Séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale (27 résidus) de la protéine 3 spécifique des spermatides de bélier.

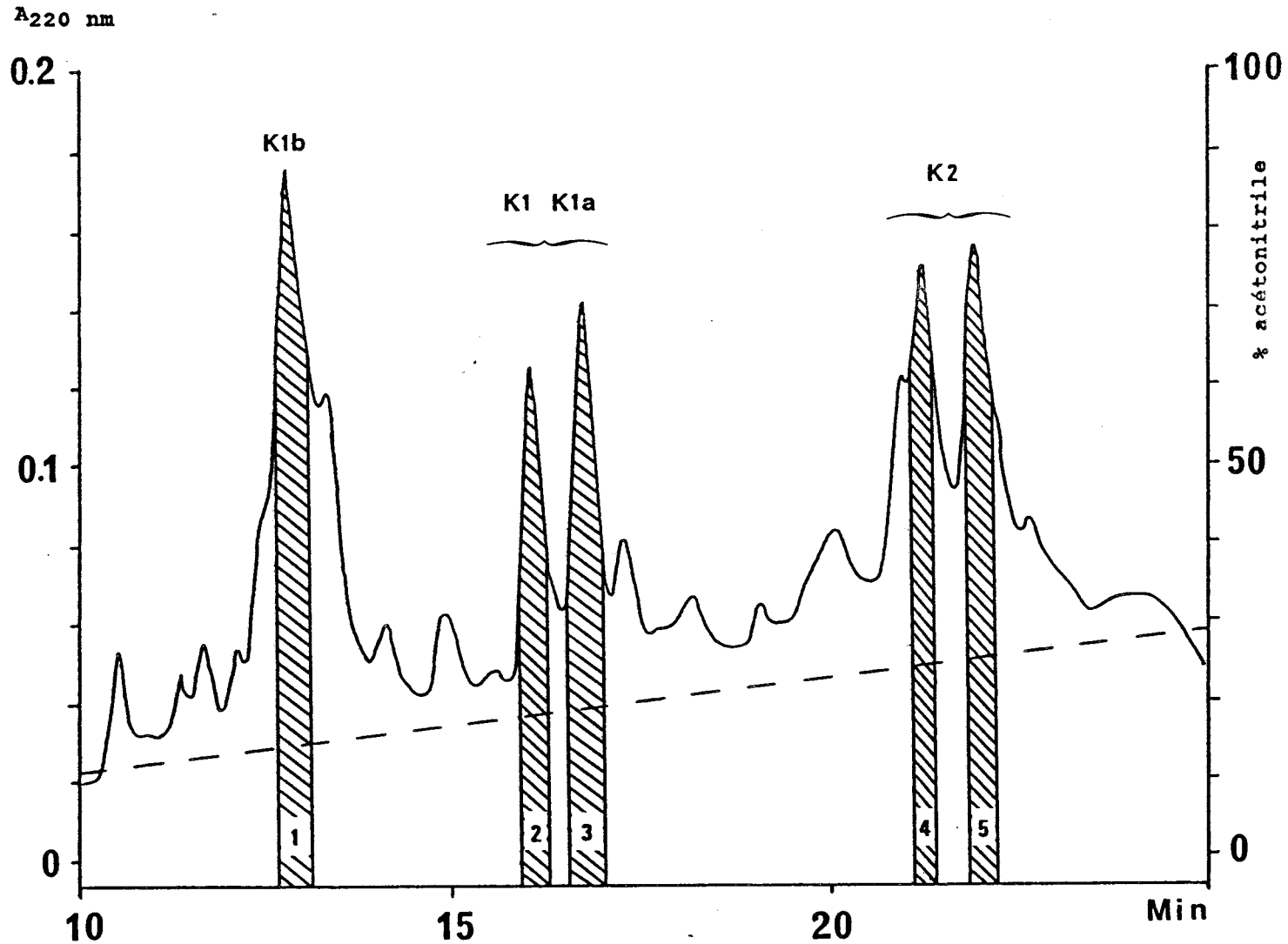
*\* Hydrolyse enzymatique de la protéine 3 par l'endoprotéinase Lys-C et séquençage des peptides*

La protéine 3 ( $\sim 5$  nmoles) a été hydrolysée pendant 2 heures à 37°C par l'endoprotéinase Lys-C et l'hydrolysat a été ensuite fractionné par CLHP en phase inverse : le diagramme d'élution des peptides est présenté dans la figure 29.

En raison de la très faible quantité de protéine hydrolysée, les différentes fractions recueillies ont été soumises directement à la dégradation automatique d'Edman. Les différents peptides, désignés par la lettre K, ont été numérotés dans l'ordre de leur élution de la colonne.

Les séquences des peptides résultant de l'action de l'endoprotéinase Lys-C sur la protéine 3 sont présentées dans la figure 30. Les fractions 2 et 3, quoique relativement séparées en CLHP renferment les peptides K1 et K1a qui ne diffèrent que par la présence d'un résidu de lysine supplémentaire à l'extrémité N-terminale du peptide K1. Ceci est lié à l'existence d'un doublet Lys-Lys adjacent au résidu d'isoleucine qui a entraîné une hydrolyse incomplète de la liaison Lys-Ile dans les conditions expérimentales utilisées. Quant au peptide K1b, élué dans la fraction 1, il semble résulter de la coupure non spécifique d'une liaison Arg-Ser par l'endoprotéinase Lys-C.

De même, les fractions 4 et 5 renferment un seul et même peptide, K2. Aucune explication satisfaisante pour ce phénomène de dédoublement de pic ne peut être apportée.



**Figure 29** : Fractionnement par CLHP en phase inverse des peptides obtenus après clivage de la protéine 3, spécifique des spermatozoïdes de bélier, par l'endoprotéinase Lys-C. Les peptides ( 5 nmoles) ont été séparés sur une colonne C18 , 10  $\mu$ m (uBondapak 260x4.6 mm). L'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile / TFA 0.1% de 0 à 50% (trait pointillé) à un débit de 1 ml/min . L'absorbance a été mesurée à 220nm. Les pics hachurés correspondent aux peptides qui ont été soumis à la dégradation automatique d'Edman. La numérotation a été réalisée selon l'ordre d'élution des peptides. Les lettres a et b désignent les peptides dérivés du peptide K1.

K1b : (H)Ser-Tyr-Ala-Thr-Pro-Ser-Lys(OH)

K1 : (H)Lys-Ile-Arg-Ser-Tyr-Ala-Thr-Pro-Ser-Lys(OH)

K1a : (H)Ile-Arg-Ser-Tyr-Ala-Thr-Pro-Ser-Lys(OH)

K2 : (H)Asn-Leu-Arg-Cys-Pro-Asn-Glu-Phe-Leu-Arg-  
Ser-Glu-Ala-Arg-Lys(OH)

**Figure 30** : Séquences en acides aminés des peptides obtenus après clivage de la protéine 3, spécifique des spermatides de bélier, par l'endoprotéinase Lys-C.

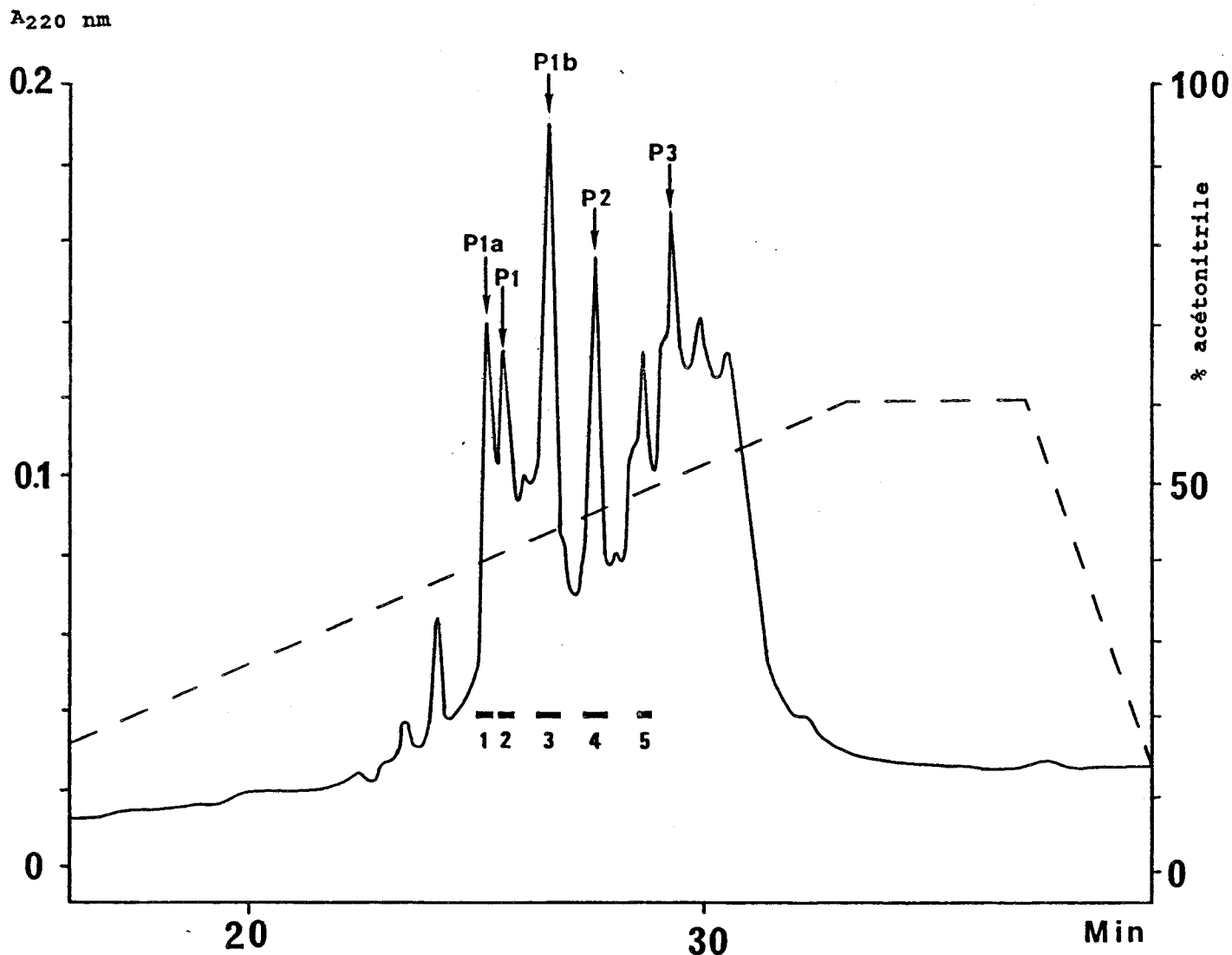
*\* Hydrolyse enzymatique de la protéine 3 par la pepsine et séquences des peptides*

Nous avons utilisé cette enzyme en raison du faible nombre d'acides aminés aromatiques présents dans la protéine. La protéine 3 ( $\sim 5$  nmoles) a été hydrolysée pendant 1 heure à 37°C par la pepsine. L'hydrolysat a été ensuite fractionné par CLHP en phase inverse (Figure 31).

En raison de la très faible quantité de protéine hydrolysée, les différentes fractions recueillies ont été soumises directement à la dégradation automatique d'Edman. Les différents peptides, désignés par la lettre P, ont été numérotés dans l'ordre de leur élution de la colonne.

Les séquences des peptides pepsiques de la protéine 3 sont présentées dans la figure 32. Parmi ces peptides, trois sont particulièrement intéressants : il s'agit des peptides P1, P2 et P3. La séquence du peptide P1 présent dans la fraction 2 a été déterminée jusqu'au résidu 32. Les peptides P1a (22 résidus identifiés) et P1b (16 résidus) confirment la séquence N-terminale du peptide P1. Le peptide P2 (17 résidus) recouvre exactement la séquence N-terminale de la protéine 3. La séquence du peptide P3 a été déterminée jusqu'au résidu 22.

Les données structurales obtenues après dégradation automatique d'Edman de la protéine 3, des peptides K1, K2, P1, P2 et P3 sont rassemblées dans la figure 33.



**Figure 31** : Fractionnement par CLHP en phase inverse des peptides obtenus après clivage de la protéine 3, spécifique des spermatides de bélier, par la pepsine. Les peptides ( 5 nmoles) ont été séparés sur une colonne C18 , 10  $\mu$ m (uBondapak 260x4.6 mm). L'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile / TFA 0.1% de 0 à 50% (trait pointillé) à un débit de 1 ml/min. L'absorbance a été mesurée à 220nm. Les barres correspondent aux peptides qui ont été soumis à la dégradation automatique d'Edman. La numérotation a été réalisée selon l'ordre d'élution des peptides. Les lettres a et b désignent les peptides dérivés du peptide P1.

**P1a** : (H) Leu-Arg-Ser-Glu-Ala-Arg-Lys-Lys-Leu-Asn-Gln-Ser-Arg-Lys-Arg-Tyr-Gln-Asn-Met-Arg-Gln-Ser...  
1                    5                    10                    15                    20

**P1** : (H) Leu-Arg-Ser-Glu-Ala-Arg-Lys-Lys-Leu-Asn-Gln-Ser-Arg-Lys-Arg-Tyr-Gln-Asn-Met-Arg-Gln-Ser-Gln-Arg-Arg-  
1                    5                    10                    15                    20                    25  
Gly-Gln-Asn-Gln-Lys-Arg-Arg...

**P1b** : (H) Leu-Arg-Ser-Glu-Ala-Arg-Lys-Lys-Leu-Asn-Gln-Ser-Arg-Lys-Arg-Tyr (OH)  
1                    5                    10                    15

**P2** : (H) Ala-Lys-Gly-Thr-Arg-Lys-Pro-Arg-Gln-Pro-Arg-Arg-Val-Ala-Val-Arg-Phe (OH)  
1                    5                    10                    15

**P3** : (H) Ala-Val-Arg-Met-Pro-Leu-Lys-Gly-Thr-Leu-Arg-Lys-Lys-Ile-Arg-Ser-Tyr-Ala-Thr-Pro-Ser-Lys (OH)  
1                    5                    10                    15                    20

**Figure 32** : Séquences en acides aminés des peptides obtenus après clivage de la protéine 3, spécifique des spermatozoïdes de bœuf, par la pepsine.



(H) Ala-Lys-Gly-Thr-Arg-Lys-Pro-Arg-Gln-Pro-Arg-Arg-Val-Ala-Val-Arg-Phe-Ala-Ser-Arg-Met-Lys-Gly-Arg

Protéine entière

P2

Lys-Lys-Thr- - - Arg- -Arg-.....-Asn-Leu-Arg-Cys-Pro-Asn-Glu-Phe-Leu-Arg-Ser-

K2

Glu-Ala-Arg-Lys-Lys-Leu-Asn-Gln-Ser-Arg-Lys-Arg-Tyr-Gln-Asn-Met-Arg-Gln-Ser-Gln-Arg-Arg-Gly-Gln-

P1

Asn-Gln-Lys-Arg-Arg-.....Ala-Val-Arg-Met-Pro-Leu-Lys-Gly-Thr-Leu-<sup>Arg</sup>-Lys-Lys-Ile-Arg-Ser-<sub>Tyr</sub>

P3

Tyr-Ala-Thr-Pro-Ser-Lys(OH)

K1

**Figure 33** : Stratégie utilisée pour la détermination de la structure primaire partielle de la protéine 3, spécifique des spermatozoïdes de bélier. Cette séquence partielle a été déduite du séquençage de la protéine entière et de ses peptides obtenus après clivage avec l'endoprotéinase Lys-C(K) et la pepsine(P).

*\* Conclusion*

L'ensemble de ces données nous a permis d'aligner en trois fragments 89 des 106 à 107 résidus d'acides aminés déterminés dans la protéine.

La structure primaire partielle de la protéine 3 fait apparaître :

- une répartition des résidus basiques tout le long de la molécule. Ces résidus basiques sont pour la plupart associés en doublet et en triplet.

- une accumulation d'acides aminés dicarboxyliques, amidés pour la plupart, dans la séquence des 40 résidus constitués par l'enchaînement des peptides K2 et P1.

Les informations de séquence ainsi obtenues mettent en évidence une localisation privilégiée des résidus de méthionine dans la chaîne peptidique.

Une coupure au bromure de cyanogène, complétée éventuellement par une coupure par l'endoprotéinase Glu-C pour confirmer les éléments de séquences obtenues des précédentes coupures enzymatiques, devrait nous conduire à l'établissement de la structure primaire complète de la protéine 3 de bélier. Cela constituerait ainsi la première séquence en acides aminés d'une protéine de transition qui ne soit pas de type TP1 ou TP2.

II - 2-3 ETUDE DE LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTAMINE DE  
BELIER

Nous avons vu, dans le chapitre consacré à l'étude des protamines, que celles-ci étaient présentes sous forme phosphorylée dans les spermatozoïdes isolés du testicule et que le degré de phosphorylation variait considérablement d'une espèce à l'autre.

L'analyse électrophorétique d'une fraction obtenue par chromatographie de tamisage moléculaire des protéines PCA-insolubles de la chromatine de testicule de bélier (Figure 22, page 138) révèle la présence de deux bandes très proches l'une de l'autre et dont la plus rapide a une migration électrophorétique identique à celle de la protamine isolée des spermatozoïdes éjaculés. La composition en acides aminés de cette fraction (Tableau X) est identique à celle de la protamine de bélier isolée des spermatozoïdes éjaculés (SAUTIERE *et al.*, 1984). Les deux bandes observées en gel de polyacrylamide sont donc le reflet d'une modification post-traductionnelle labile dans les conditions de l'hydrolyse acide totale.

Comme la phosphorylation est la seule modification post-traductionnelle observée jusqu'à présent chez les protamines, nous avons vérifié la présence de groupes phosphate dans la protamine de bélier isolée du testicule, en la traitant par la phosphatase alcaline d'*Escherichia coli* pendant trois heures à 37°C. Le contrôle électrophorétique, effectué après incubation, montre qu'il n'y a plus qu'une seule bande de mobilité identique à celle de la protamine de spermatozoïdes éjaculés (Figure 34). Ce résultat prouve donc que la protamine de bélier, isolée du testicule est partiellement phosphorylée. La présence de deux bandes d'intensité équivalente en gel de

**TABLEAU X**

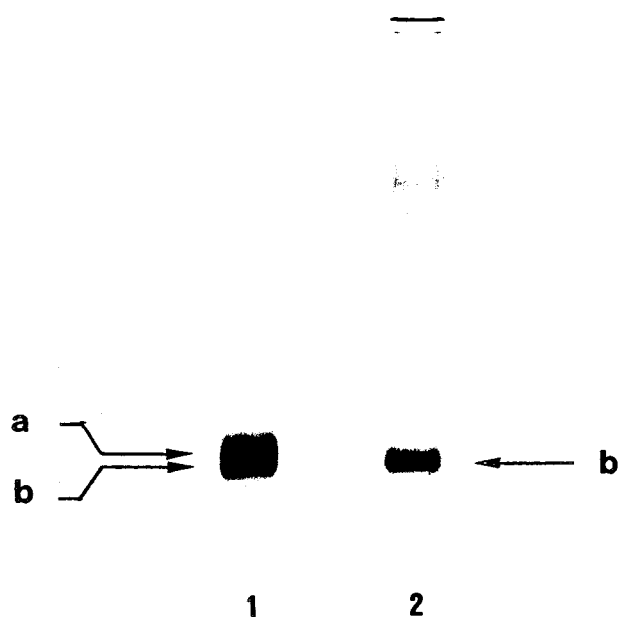
Compositions en acides aminés de la protamine de bélier isolée du testicule et de la protamine de bélier isolée des spermatozoïdes éjaculés (SAUTIERE et al., 1984).

| Acide Aminé | Protamine de bélier               |                       |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------|
|             | Testicule                         | Spermatozoïde éjaculé |
| Scmc        | 6.9 <sup>a</sup> (7) <sup>b</sup> | 7                     |
| Asx         | -                                 | -                     |
| Thr         | 2.6(3)                            | 3                     |
| Ser         | 1.6(2)                            | 2                     |
| Glx         | 0.9(1)                            | 1                     |
| Pro         | -                                 | -                     |
| Gly         | 0.9(1)                            | 1                     |
| Ala         | 0.8(1)                            | 1                     |
| Val         | 2.7(3)                            | 3                     |
| Met         | -                                 | -                     |
| Ile         | -                                 | -                     |
| Leu         | 1.0(1)                            | 1                     |
| Tyr         | 1.6(2)                            | 2                     |
| Phe         | 0.9(1)                            | 1                     |
| His         | 0.9(1)                            | 1                     |
| Lys         | -                                 | -                     |
| Arg         | 29.2(29) <sup>c</sup>             | 27                    |

a : en nombre de résidus basé sur un résidu de leucine.

b : les valeurs entre parenthèses représentent les entiers les plus proches.

c : dans la protamine de bélier isolée du testicule, le taux d'arginine a été mesuré en excès.



**Figure 34** : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide (acide acétique 0.9M ; urée 6.25M) de la protamine isolée du testicule de bélier. Les pistes 1 et 2 correspondent respectivement à la protamine avant et après traitement par la phosphatase alcaline d'E.coli.

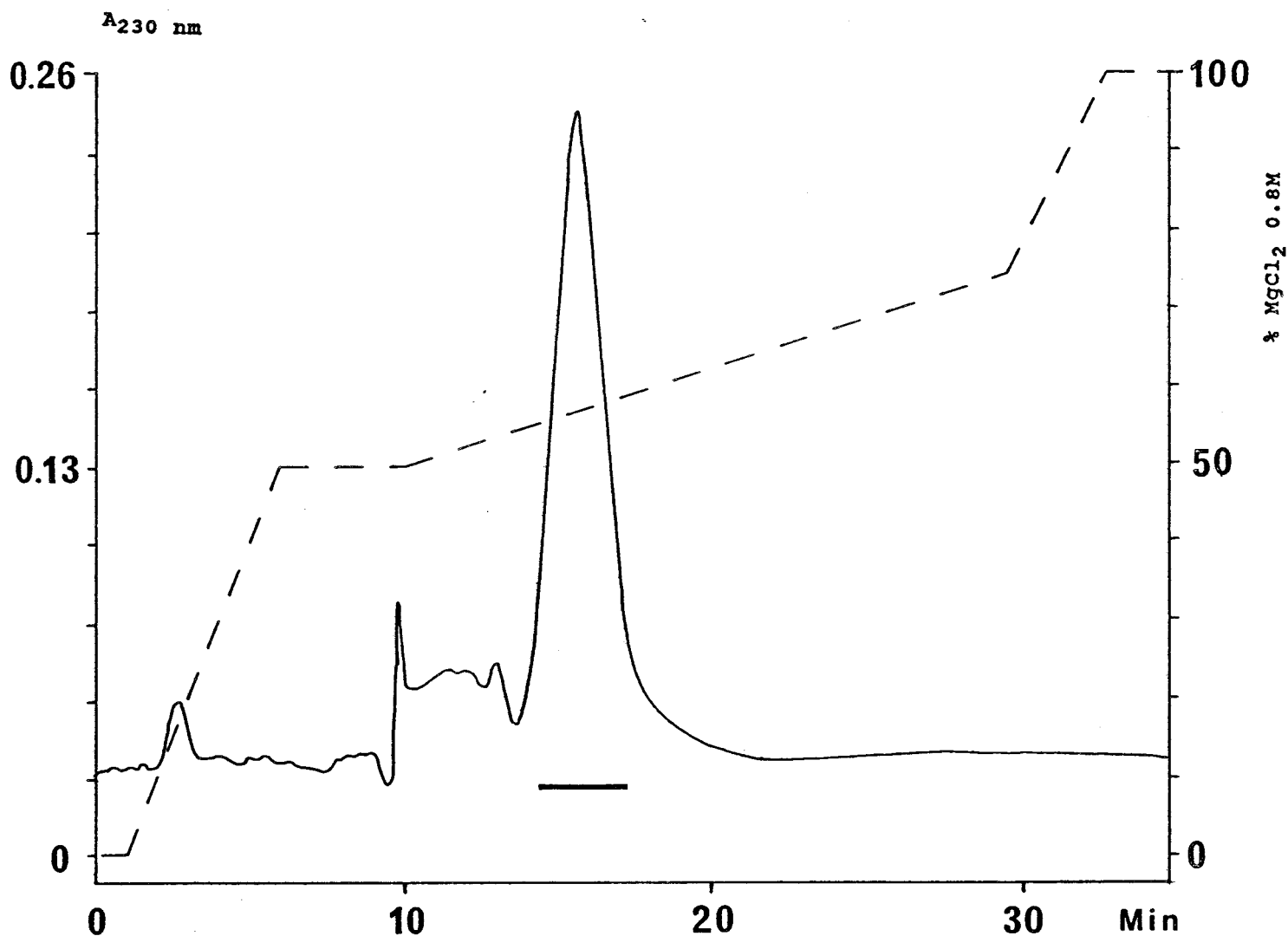
a : protamine de bélier monophosphorylée  
b : protamine de bélier non phosphorylée

polyacrylamide, avant traitement par la phosphatase alcaline, indique que les formes phosphorylée et non phosphorylée de la protamine de testicule sont approximativement dans un rapport 1 : 1. Une forme monophosphorylée de la protamine P1 a été également observée dans le testicule de lapin et de taureau (MARUSHIGE et MARUSHIGE, 1978) et dans le spermatozoïde éjaculé humain (GUSSE *et al.*, 1986).

La protamine de bélier renferme deux résidus de sérine (Tableau X , page 162). Ces résidus ont été localisés respectivement aux positions 10 et 12 dans la protamine (SAUTIERE *et al.*, 1984).

Des essais de séparation des formes monophosphorylée et non phosphorylée de la protamine de bélier par CLHP en échange d'ions s'étant révélés infructueux (Figure 35), le mélange des deux formes a donc été traité selon le procédé de MEYER *et al.* (1986), modifié par SWIDERECK *et al.* (1988), qui permet de transformer la phosphosérine en S-éthylcystéine. Après traitement, la protamine a été soumise à la dégradation automatique d'Edman. Les résultats sont présentés dans la figure 36. Seule la sérine en position 10 apparaît très nettement phosphorylée. Il faut souligner que durant la dégradation d'Edman les résidus de S-carboxamidométhyl-cystéine en positions 5 et 6 ont été identifiés sous la forme d'un composé ayant le même temps de rétention que la S-éthylcystéine.

La transformation probable des résidus de S-carboxamidométhylcystéine en S-éthylcystéine lors de la modification de Meyer *et al.* (1986) a également été observée lors de l'étude de la phosphorylation de la protéine TP1 de bélier (CHIRAT *et al.* , soumis pour publication).



**Figure 35** : Essai de purification, par CLHP en échange d'ions sur une colonne de carboxyméthyl-TSK, des formes monophosphorylée et non-phosphorylée de la protamine de bélier isolée du testicule. La protamine a été éluée par un gradient linéaire (trait pointillé) de  $MgCl_2$  (0 à 0.8M) dans un tampon acétate de sodium 50 mM pH 6.0 , à un débit de 1ml/min. Des fractions de 0.5 ml ont été collectées. L'élué des protéines a été suivie à 230 nm.





*\* Conclusion*

Comme pour les protamines des autres mammifères, la protamine de bélier, isolée du testicule, est phosphorylée et existe sous la forme non et monophosphorylée dans un rapport 1 : 1.

Le résidu de phosphate semble essentiellement porté par la sérine en position 10. Il n'est cependant pas exclus que la sérine 12 soit également un site de phosphorylation. L'obtention de la forme monophosphorylée à l'état pur, nous permettrait de lever les doutes.

Signalons enfin qu'aucun site de phosphorylation concernant les protamines de mammifères n'avait encore été identifié à ce jour.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La fonction principale du spermatozoïde est d'assurer le transport de l'information génétique mâle depuis le testicule jusqu'à l'ovule. Ce transport nécessite au préalable une protection de cette information génétique contre les nucléases et les protéases présentes dans la cavité vaginale.

A cette fin, la chromatine va passer progressivement d'un état diffus à un état fortement condensé. L'essentiel de cette compaction est réalisé dans le testicule mais se poursuit dans l'épididyme où les ponts disulfure s'établissent pour conduire à une structure réticulée très serrée. Les deux transitions protéiques observées au niveau des protéines nucléaires basiques (remplacement des histones par les protéines intermédiaires dans un premier temps, puis remplacement de ces protéines intermédiaires par une ou deux protamines) ont été corrélées à cette compaction de la chromatine.

Comme nous l'avons vu dans ce mémoire, on note, à chacune des transitions protéiques, une diminution de la taille des protéines et une augmentation progressive du taux d'arginine et de cystéine. Par rapport à la lysine, l'arginine confère aux protéines une affinité supérieure pour l'ADN.

La phosphorylation des résidus hydroxylés, en particulier des résidus de sérine, modulerait cette affinité. Quant aux résidus de cystéine, ils consolident, par la formation de ponts disulfure, l'édifice macromoléculaire obtenu.

Si les histones de type somatique et les protamines ont fait l'objet d'une étude approfondie, les protéines intermédiaires sont encore mal connues, en particulier leur structure primaire ou les modifications post-traductionnelles qui les affectent.

Chez le bélier, quatre protéines intermédiaires appelées T, P1, 3 et 7 sont présentes dans les spermatides non rondes.

Dans notre thèse, nous avons déterminé :

- 1 - La séquence complète de la protéine T dont les caractéristiques structurales sont identiques à celles des protéines TP1 isolées des spermatides d'autres mammifères.
  - Nous avons montré en outre, grâce à la spectrométrie de masse, que cette protéine était présente sous forme de deux variants.
  - Nous avons identifié quatre sites de phosphorylation dans la forme monophosphorylée de la protéine TP1 de bélier.
- 2 - La séquence C-terminale de la protéine P1 (28 résidus), ce qui nous a permis de confirmer son appartenance à la famille des protéines de transition de type TP2.
- 3 - La structure primaire partielle de la protéine 3. Les données structurales recueillies sur cette protéine nous ont permis d'établir :
  - La séquence N-terminale (27 résidus).
  - Une séquence de 22 résidus qui pourrait correspondre à la région C-terminale de la protéine.
  - Une séquence de 40 résidus.
- 4 - Le site de phosphorylation de la protamine.

#### Perspectives à court terme

- Etablir les structures primaires complètes des protéines TP2, 3 et 7.
- Etudier les interactions de ces protéines avec l'ADN.
- Etudier la cinétique de formation et la localisation des ponts disulfure dans la protamine au cours du transit épидидymaire du spermatozoïde.

#### Perspectives à moyen terme

- Obtenir des anticorps à partir de peptides de synthèse afin de déterminer l'ordre d'apparition et de disparition des protéines intermédiaires dans le noyau des spermatides et de corrélérer la présence de ces protéines avec un état de condensation de la chromatine.

#### Perspectives à long terme

- Régulation de l'expression des gènes de protéines de transition et de la protamine de bélier.

B I B L I O G R A P H I E

- ALLAN, J., HARTMAN, P.G., CRANE-ROBINSON, C. and AVILES, F.X. (1980)  
The structure of histone H1 and its location in chromatin.  
Nature 288, 675-679.
- AMMER, H., HENSCHEN, A. and LEE, C-H. (1986)  
Isolation and amino acid sequence analysis of human sperm protamines P1 and P2.  
Biol.Chem.Hoppe Seyler 367, 515-522.
- AMMER, H. and HENSCHEN, A. (1987)  
The major protamine from Stallion sperm. Isolation and sequence analysis.  
Biol.Chem.Hoppe Seyler 368, 1619-1626.
- AMMER, H. and HENSCHEN, A. (1988a)  
Rat sperm protamine. Isolation and sequence analysis.  
Biol.Chem.Hoppe Seyler 369, 1301-1306.
- AMMER, H. and HENSCHEN, A. (1988b)  
Primary structure of rabbit sperm protamine, the first protamine of its type with an aberrant N-terminal.  
FEBS lett. 242, 111-116.
- ANGURAVIRUTT, S. and SVASTI, J. (1981)  
A new procedure for the purification of rat testis specific histone TH2B involving affinity related chromatography.  
Arch.Biochem.Biophys. 210, 412-416.
- AUSIO, J., GREULICH, K.O., HAAS, E. and WACHTEL, E. (1984)  
Characterization of the fluorescence of the protamine thynnine and studies of binding to double-stranded DNA.  
Biopolymers 23, 2559-2571.
- BALHORN, R. (1982)  
A model for the structure of chromatin in mammalian sperm.  
J.Cell Biol. 93, 298-305.
- BALHORN, R., WESTON, S., THOMAS, C. and WYROBECK, A.J. (1984)  
DNA packaging in mouse spermatids. Synthesis of protamine variants and four transition proteins.  
Exp.Cell Res. 150, 298-308.
- BELAÏCHE, D., LOIR, M., KRUGGLE, W. and SAUTIERE, P. (1987)  
Isolation and characterization of two protamines St1 and St2 from stallion spermatozoa and amino-acid sequence of the major protamine St1.  
Biochim.Biophys.Acta 913, 145-149.
- BELLVE, A.R. (1988)  
Purification and characterization of mouse protamines P1 and P2. Amino acid sequence of P2.  
Biochemistry 27, 2890-2897.

- BELLVE, A.R., ANDERSON, E. and HANLEY-BOWDOIN, L. (1975)  
Synthesis and amino acid composition of basic proteins  
in mammalian sperm nuclei.  
Dev. Biol. 47, 349-365.
- BHATNAGAR, Y.M., Mc CULLAR, K., FAULKER, R.D. and GHAI, R.D. (1983)  
Biochemical and immunological characterization of a histone  
variant associated with spermatogenesis in the mouse.  
Biochim. Biophys. Acta 760, 25-33.
- BHATNAGAR, Y.M., FAULKER, R.D. and McCULLAR, M.K. (1985)  
Biochemical and immunological characterization of an H2A  
variant from the mouse testis.  
Biochim. Biophys. Acta 827, 14-22.
- BODE, J., WILLMITZER, L. and OPATZ, K. (1977)  
On the competition between protamines and histones : studies  
directed towards the understanding of spermiogenesis.  
Eur. J. Biochem. 72, 393-403.
- BOWER, P.A., YELICK, P.C. and HECHT, N.B. (1987)  
Both P1 and P2 protamine genes are expressed in mouse,  
hamster, and rat.  
Biol. Reprod. 37, 479-488.
- BRANSON, R.E., GRIMES, S.R., YONUSCHOT, G. and IRVIN, J.L. (1975)  
The histones of rat testis.  
Arch. Biochem. Biophys. 168, 403-412.
- BRAUN, R.E., PESCHON, J.J., BEHRINGER, R.R., BRINSTER, R.L. and  
PALMITER, R.D. (1989)  
Protamine 3'-untranslated sequences regulate temporal trans-  
lational control and subcellular localization of growth hor-  
mone in spermatids of transgenic mice.  
Genes and Development 3, 793-802.
- BROCK, W.A., TROSTLE, P.K. and MEISTRICH, M.L. (1980)  
Meiotic synthesis of testis histones in the rat.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 371-375.
- BUCCI, L.R., BROCK, W.A. and MEISTRICH, M.L. (1982)  
Distribution and synthesis of histone 1 subfractions during  
spermatogenesis in the rat.  
Exp. Cell Res. 140, 111-118.
- BUNICK, D., BALHORN, R., STANKER, L.H. and HECHT, N.B. (1990)  
Expression of the rat protamine 2 gene is suppressed at  
the level of transcription and translation.  
Exp. Cell Res. 188, 147-152.
- BUTLER, P.J.D. (1984)  
A defined structure of the 30 nm chromatin fibre which  
accommodates different nucleosomal repeat lengths.  
EMBO J. 3, 2599-2604.



- CALVIN, H.I. (1976)  
Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, Guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 434, 377-389.
- CAMPBELL, D.G. and COHEN, Ph. (1989)  
The amino acid sequence of rabbit skeletal muscle glycogenin.  
Eur.J.Biochem. 185, 119-125.
- CHAHAL, S.S., MATTHEWSH, R. and BRADBURY, E.M. (1980)  
Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function.  
Nature 287, 76-79.
- CHEVAILLIER, Ph., MARTINAGE, A., ARKHIS, A. and SAUTIERE, P. (1990)  
Les précurseurs des protamines dans le spermatozoïde humain.  
Reprod.Nutr.Dev. 30, 343-347.
- CHIU, M.L. and IRVIN, J.L. (1980)  
Separation and quantitative analysis of rat testis histones by one-dimensional gel electrophoresis.  
Anal.Biochem. 109, 102-108.
- CHIU, M.L. and IRVIN, J.L. (1984)  
Isolation of rat testis histone TH2B-X and interaction of TH2B-X antiserum with histones and mononucleosomes.  
Arch. Biochem.Biophys. 229, 295-303.
- CHIU, M.L. and IRVIN, J.L. (1986)  
Absence of histone H2B in nucleosomes containing histone TH2B and interaction of immunoglobulin with nucleosomes.  
Arch. Biochem.Biophys. 244, 42-49.
- COELINGH, J.P., MONFOORT, C.H., ROZIJN, T.H., GEVERS LEUVEN, J.A., SCHIPHOF, R., STEYN-PARVE, E.P., BRAUNITZER, G., SCHRANK, B. and RUHFUS, A. (1972)  
The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 285, 1-14.
- COLE, K.D., YORK, R.G. and KISTLER, W.S. (1984)  
The amino acid sequence of boar H1t, a testis-specific H1 histone variant.  
J.Biol.Chem. 259, 13695-13702.
- COLE, K.D., KANDALA, J.C. and KISTLER, W.S. (1986)  
Isolation of the gene for testis-specific H1 histone variant H1t.  
J.Biol.Chem. 261, 7178-7183.
- COLE, K.D. and KISTLER, W.S. (1987)  
Nuclear transition protein 2 (TP2) of mammalian spermatids has a very basic carboxyl terminal domain.  
Biochem.Biophys.ResCommun. 147, 437-442.

- DIMICOLI, J.-L. and HELENE, C. (1974)  
Interactions of aromatic residues of proteins with nucleic acids. II. Proton magnetic resonance studies of the binding of tyramine and tyrosine-containing peptides to poly(adenylic acid) and deoxyribonucleic acid.  
Biochemistry 13, 724-730.
- DOMENJOU, L., FRONIA, C., UHDE, F. and ENGEL, W. (1988)  
Sequence of human protamine 2 cDNA.  
Nucleic Acids Res. 16, 7733.
- DUPRESSOIR, T., SAUTIERE, P., LANNEAU, M. and LOIR, M. (1985)  
Isolation and characterization of the ram spermatid nuclear proteins P1, 3 and T.  
Exp. Cell Res. 161, 63-74.
- EICKBUSH, T.E. and MOUDRIANAKIS, E.M. (1978)  
The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.  
Biochemistry 23, 4955-4964.
- FARAONE MENELLA, M.R., LEONE, E., MALANGA, M. and FARINA (1988)  
ADP-ribosylation of a specific protein from isolated intact bull testis nuclei.  
Biochim. Biophys. Acta 954, 58-64.
- FITA, I., CAMPOS, J.L., PUIGJANER, L.C. and SUBIRANA, J.A. (1983)  
X-ray diffraction study of DNA complexes with arginine peptides and their relation to nucleoprotamine structure.  
J. Mol. Biol. 167, 157-177.
- GRIMES, S.R., PLATZ, R.D., MEISTRICH, M.L. and HNILICA, L.S. (1975)  
Partial characterization of a new basic nuclear protein from rat testis elongated spermatids.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 182-189.
- GRIMES, S.R., MEISTRICH, M.L., PLATZ, R.D. and HNILICA, L.S. (1977)  
Nuclear protein transitions in rat testis spermatids.  
Exp. Cell Res. 110, 31-39.
- GRIMES, S.R. and HENDERSON, N. (1983)  
Acetylation of histones during spermatogenesis in the rat.  
Arch. Biochem. Biophys. 221, 108-116.
- GRIMES, S.R. and HENDERSON, N. (1984)  
Acetylation of rat testis histones H2B and TH2B.  
Dev. Biol. 101, 516-521.
- GRIMES, S., WEISZ-CARRINGTON, P., DAUM III, H., SMITH, J., GREEN, L., WRIGHT, K., STEIN, G. and STEIN, J. (1987)  
A rat histone H4 gene closely associated with the testis-specific H1t gene.  
Exp. Cell Res. 173, 534-545.
- GUSSE, M., SAUTIERE, P., BELAÏCHE, D., MARTINAGE, A. ROUX, C., DADOUNE, J.P. and CHEVAILLIER, Ph. (1986)  
Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm.  
Biochim. Biophys. Acta 884, 124-134.

- HECHT, N.B., KLEENE, K.C., YELICK, P.C., JOHNSON, P.A., PRAVTCHEVA, D.D. and RUDDLE, F.H. (1986)  
Mapping of haploid expressed genes : genes for both protamines are located on chromosome 16.  
Somat.Cell Mol.Genet. 12, 203-208.
- HECHT, N.B. and PENSHOW, J.D. (1987)  
*In situ* localization of mRNAs coding for mouse testicular structural genes.  
Exp.Cell Res. 173, 274-281.
- HEIDARAN, M.A. and KISTLER, W.S. (1987a)  
Transcriptional and translational control of the message for transition protein 1, a major chromosomal protein of mammalian spermatids.  
J.Biol.Chem. 262, 13309-13315.
- HEIDARAN, M.A. and KISTLER, W.S. (1987b)  
Isolation of a cDNA clone for transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids.  
Gene 54, 281-284.
- HEIDARAN, M.A., SHOWMAN, R.M. and KISTLER, W.S. (1988)  
A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids.  
J.Cell Biol. 106, 1427-1433.
- HEIDARAN, M.A., KOZACK, C.A. and KISTLER, W.S. (1989)  
Nucleotide sequence of the Stp-1 gene coding for rat spermatid nuclear transition protein 1 (TP1) : homology with protamine P1 and assignment of the mouse Stp-1 gene to chromosome 1.  
Gene 75, 39-46.
- HERSKOVITS, T.T. and BRAHMS, J. (1976)  
Structural investigations on DNA-protamine complexes.  
Biopolymers 15, 687-706.
- INGLES, C.J. and DIXON, G.H. (1967)  
Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 58, 1011-1018.
- JOHNSON, P.A., PESCHON, J.J., YELICK, P.C., PALMITER, R.D. and HECHT, N.B. (1988a)  
Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes.  
Biochim.Biophys.Acta 950, 45-53.
- JOHNSON, P.A., YELICK, P.C., LIEM, H. and HECHT, N.B. (1988b)  
Differential distribution of the P1 and P2 protamine gene sequences in eutherian and Marsupial mammals and a monotreme.  
Gamete Res. 19, 169-175.

- JOSEPH,G., CAIZERGUES-FERRER,M. and ALMARIC,F. (1983)  
Histones from chinese hamster ovary cells. Multiplied modified forms : a quantitative approach.  
Eur.J.Biochem. 135, 143-149.
- KIERSZENBAUM,A.L. and TRES,L.L. (1975)  
Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome.  
J.Cell Biol. 65, 258-270.
- KIM,Y.J., HWANG,I., TRES,L.L., KIERSZENBAUM,A.L. and CHAE,C-B. (1987)  
Molecular cloning and differential expression of somatic and testis-specific H2B histone gene during rat spermatogenesis.  
Dev.Biol. 124; 23-34.
- KISTLER,W.S., GEROCH,M.E. and WILLIAMS-ASHMAN,H.G. (1973)  
Specific basic proteins from mammalian testes.  
J.Biol.Chem. 248, 4532-4543.
- KISTLER,W.S., NOYES,C. and HEINRIKSON,R.L. (1974)  
Partial structural analysis of a highly basic low molecular weight protein from rat testis.  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 57, 341-347.
- KISTLER,W.S. and GEROCH,M.E. (1975a)  
An unusual pattern of lysine rich histone components is associated with spermatogenesis in rat testis.  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 63, 378-384.
- KISTLER,W.S., NOYES,C., HSU,R. and HEINRIKSON,R.L. (1975b)  
The amino acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis.  
J.Biol.Chem. 250, 1847-1853.
- KISTLER,W.S., KEIM,P.S. and HEINRIKSON,R.L. (1976)  
Partial structural analysis of the basic chromosomal protein of rat spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 427, 752-757.
- KLEENE,K.C., DISTEL,R.J. and HECHT,N.B. (1983)  
cDNA clones encoding cytoplasmic poly(A)<sup>+</sup> RNAs which first appear at detectable levels in haploid phases of spermatogenesis in the mouse.  
Dev.Biol. 98, 455-464.
- KLEENE,K.C., DISTEL,R.J. and HECHT,N.B. (1984)  
Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse.  
Dev.Biol. 105, 71-79.
- KLEENE,K.C., DISTEL,R.J. and HECHT,N.B. (1985)  
Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse protamine 1.  
Biochemistry 24, 719-722.

- KLEENE, K.C. and FLYNN, J.F. (1987)  
Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse.  
J.Biol.Chem. 262, 17272-17277.
- KLEENE, K.C., BORZORGZADEH, A., FLYNN, J.F., YELICK, P.C. and HECHT, N.B. (1988)  
Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse transition protein 1.  
Biochim.Biophys.Acta 950, 215-220.
- KLEMM, U., LEE, C-H., BURFEIND, P., HAKE, S. and ENGEL, W. (1989)  
Nucleotide sequence of a cDNA encoding rat protamine and the haploid expression of the gene during rat spermatogenesis.  
Biol.Chem.Hoppe-Seyler 370, 293-301.
- KOLK, A.H.J. and SAMUEL, T. (1975)  
Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 393, 307-319.
- KRAWETZ, S.A., CONNOR, W. and DIXON, G.H. (1988)  
Bovine protamine genes contain a single intron. The structures of the two alleles.  
J.Biol.Chem. 263, 321-326.
- KRAWETZ, S.A., HERFORT, M.H., MAMERTON, J.L., PON, R.T. and DIXON, G.H. (1989)  
Chromosomal localization and structure of the human P1 protamine gene.  
Genomics 5, 639-645.
- KREMLING, H., LUERSSEN, H., ADHAM, I.M., KLEMM, U., TSAOUSIDOU, S. and ENGEL, W. (1989)  
Nucleotide sequences and expression of cDNA clones for boar and bull transition protein 1 and its evolutionary conservation in mammals.  
Differentiation 40, 184-190.
- KUMAROO, K.K. and IRVIN, J.L. (1980)  
Isolation of histone TH1-xB from rat testis.  
Biochem.Biophys.Res.Commun. 94, 49-54.
- LEE, C-H, MANSOURI, A., HECHT, W., HECHT, N.B. and ENGEL, W. (1986)  
Nucleotide sequence of a bovine protamine cDNA.  
Biol.Chem.Hoppe-Seyler 367, 131-135.
- LEE, C-H., HOYER-FENDER, S. and ENGEL, W. (1987a)  
The nucleotide sequence of a human protamine 1 cDNA.  
Nucl.Acids Res. 15, 7639.
- LEE, C-H., BARTELS, I. and ENGEL, W. (1987b)  
Haploid expression of a protamine gene during bovine spermatogenesis.  
Biol.Chem.Hoppe-Seyler 368, 807-811.

- LENNOX, R.W., OSHIMA, R.G. and COHEN, L.H. (1982)  
The H1 histones and their interphase phosphorylated states  
in differentiated and undifferentiated cell lines derived  
from murine teratocarcinomas.  
J. Biol. Chem. 257, 5183-5189.
- LENNOX, R.W. and COHEN, L.H. (1983)  
The histone H1 complements of dividing and nondividing  
cells of the mouse.  
J. Biol. Chem. 258, 262-268.
- LENNOX, R.W. (1984)  
Differences in evolutionary stability among mammalian H1  
subtypes. Implications for the roles of H1 subtypes in  
chromatin.  
J. Biol. Chem. 259, 669-672.
- LENNOX, R.W. and COHEN, L.H. (1988)  
The production of tissue-specific histone complements  
during development.  
Biochem. Cell Biol. 66, 636-649.
- LEVINGER, L.F., CARTER, C.W., KUMAROO, K.K. and IRVIN, J.L. (1978)  
Cross-referencing testis-specific nuclear proteins by two-  
dimensional gel electrophoresis.  
J. Biol. Chem. 253, 5232-5234.
- LOIR, M. and LANNEAU, M. (1978)  
Transformation of ram spermatid chromatin.  
Exp. Cell Res. 115, 231-243.
- LOIR, M. and LANNEAU, M. (1984)  
Structural function of the basic nuclear proteins in ram  
spermatids.  
J. Ultrastruct. Res. 86, 262-276.
- LOIR, M., BOUVIER, D., FORNELLS, M., LANNEAU, M. and SUBIRANA, J.A.  
(1985)  
Interactions of nuclear proteins with DNA, during sperm dif-  
ferentiation in the ram.  
Chromosoma 92, 304-312.
- LUERSSSEN, H., HOYER-FENDER, S. and ENGEL, W. (1988)  
The nucleotide sequence of human transition protein 1 cDNA.  
Nucleic Acids Res. 16, 7723.
- LUERSSSEN, H., MAIER, W.M., HOYER-FENDER, S. and ENGEL, W. (1989)  
The nucleotide sequence of rat transition protein 2 (TP2)  
cDNA.  
Nucleic Acids Res. 17, 3585.
- MAIER, W.M., ADHAM, I., KLEMM, U. and ENGEL, W. (1988)  
The nucleotide sequence of a boar protamine 1 cDNA.  
Nucleic Acids Res. 16, 11826.

- MAIER, W.M., NUSSBAUM, G., DOMENJOUR, L., KLEMM, U. and ENGEL, W. (1990)  
The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene.  
Nucleic Acids Res. 18, 1249-1254.
- MARKOSE, E.R. and RAO, M.R.S. (1985)  
Testis-specific histone H1t is antigenically distinct among H1 subtypes.  
J.Biol.Chem. 260, 16263-16268.
- MARTINAGE, A., MANGEAT, P., SAUTIERE, P., MARCHIS-MOUREN, G. and BISERTE, G. (1979)  
Amino acid sequence of rat thymus histone H2B and identification of the *in vitro* phosphorylation sites.  
Biochimie 61, 61-69.
- MARTINAGE, A., MANGEAT, P., LAINE, B., COUPPEZ, M., SAUTIERE, P., MARCHIS-MOUREN, G. and BISERTE, G. (1980)  
*In vitro* phosphorylation of histone H5, H2A, H2B and of the dimer H2A-H2B by a cyclic AMP-dependent protein kinase from rat pancreas.  
FEBS Lett 118, 323-329.
- MARTINAGE, A., SAUTIERE, P., BELAÏCHE, D. and CHEVAILLIER, Ph. (1989)  
Intermediate basic nuclear proteins HPS1 and HPS2 from human sperm are precursors of protamines HP2 and HP3.  
Second forum on peptides, Eds A.AUBRY, M.MARRAUD, B.VITOUX, Colloque INSERM, vol 174 pp 57-60.
- MARTINAGE, A., ARKHIS, A., ALIM, E., SAUTIERE, P. and CHEVAILLIER, Ph. (1990)  
Molecular characterization of nuclear basic protein HPI1, a putative precursor of human sperm protamines HP2 and HP3.  
Eur.J.Biochem. 191, 449-451.
- MARUSHIGE, K., LING, V. and DIXON, G.H. (1969)  
Phosphorylation of chromosomal basic proteins of maturing trout testis.  
J.Biol.Chem. 244, 5953-5958.
- MARUSHIGE, Y. and MARUSHIGE, K. (1974)  
Properties of chromatin isolated from bull spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 340, 498-508.
- MARUSHIGE, Y. and MARUSHIGE, K. (1975)  
Transformation of sperm histone during formation and maturation of rat spermatozoa.  
J.Biol.Chem. 250, 39-45.
- MARUSHIGE, Y. and MARUSHIGE, K. (1978)  
Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals.  
Biochim.Biophys.Acta 518, 440-449.

- MARUSHIGE, Y. and MARUSHIGE, K. (1983)  
Proteolysis of somatic type histones in transforming rat spermatid chromatin.  
Biochim. Biophys. Acta 761, 48-57.
- MAZRIMAS, J.A., CORZETT, M., CAMPOS, C. and BALHORN, R. (1986)  
A corrected primary sequence for bull protamine.  
Biochim. Biophys. Acta 872, 11-15.
- McKAY, D.J., RENAUX, B.S. and DIXON, G.H. (1985)  
The amino acid sequence of human sperm protamine P1.  
Bioscience Reports 5, 383-391.
- McKAY, D.J., RENAUX, B.S. and DIXON, G.H. (1986)  
Human sperm protamines. Amino acid sequences of two forms of protamine P2.  
Eur. J. Biochem. 156, 5-8.
- MEISTRICH, M.L., REID, B.O. and BARCELLONA, W.J. (1976)  
Changes in sperm nuclei during spermiogenesis and epididymal maturation.  
Exp. Cell Res., 99, 72-78.
- MEISTRICH, M.L., BROCK, W.A., GRIMES, S.R., PLATZ, R.D. and HNILICA, L.S. (1978)  
Nuclear protein transitions during spermatogenesis.  
Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 37, 2522-2525.
- MEISTRICH, M.L., BUCCI, L.R., BROCK, W.A., TROSTLE, P.K., PLATZ, R.D., GRIMES, S.R. and BURLEIGH, B.D. (1980)  
Characterization of TP4, a major nuclear protein of rat elongated spermatids.  
Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 39, 1884.
- MEISTRICH, M.L., TROSTLE, P.K. and BROCK, W.A. (1981)  
Association of nucleoprotein transitions with chromatin changes during rat spermatogenesis.  
in "Bioregulators of Reproduction" (G. JAGIELLO and H. VOGEL, eds), 151-156. Academic Press, New York.
- MEISTRICH, M.L., BUCCI, L.R., TROSTLE-WEIGE, P.K. and BROCK, W.A. (1985)  
Histone variants in rat spermatogonia and primary spermatocytes.  
Dev. Biol. 112, 230-240.
- MEYER, H.E., HOFFMANN-POSORSKE, E., KORTE, H. and HEILMEYER, L.M.G. (1986)  
Sequence analysis of phosphoserine-containing peptides. Modification for picomolar sensitivity.  
FEBS Lett. 204, 61-66.

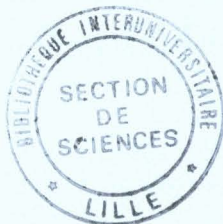


- MIRZABEKOV, A.D., SAN'KO, D.F., KOLCHINSKY, A.M. and MELNIKOVA, A.F. (1977)  
Protein arrangement in the DNA grooves in chromatin and nucleoprotamine *in vitro* and *in vivo* revealed by methylation.  
Eur.J.Biochem. 75, 379-389.
- MOSS, S.B., CHALLONER, P.B. and GROUDINE, M. (1989)  
Expression of a novel histone 2B during mouse spermiogenesis.  
Dev.Biol. 133, 83-92.
- PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969)  
High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.  
Arch.Biochem.Biophys. 130, 337-346.
- PIRHONEN, A., LINNALA-KANKKUNEN, A. and MÄENPÄÄ, P.H. (1989)  
Comparison of partial amino acid sequences of two protamine 2 variants from stallion sperm.  
FEBS Lett. 244, 199-202.
- PIRHONEN, A., VALTONEN, P., LINNALA-KANKKUNEN, A., HEISKANEN, M-L. and MÄENPÄÄ, P.H. (1990)  
Primary structures of 2 protamine 2 variants (St2a and St2b) from stallion spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 1039, 177-180.
- PLATZ, R.D., GRIMES, S.R., MEISTRICH, M.L. and HNILICA, L.S. (1975)  
Changes in nuclear proteins of rat testis cells separated by velocity sedimentation.  
J.Biol.Chem. 250, 5791-5800.
- PONGSAWASDI, P. and SVASTI, J. (1976)  
The heterogeneity of the protamines from human spermatozoa.  
Biochim.Biophys.Acta 434, 462-473.
- PRUSLIN, F.H., IMESCH, E., WINSTON, R. and RODMAN, T.C. (1987)  
Phosphorylation state of protamines 1 and 2 in human spermatids and spermatozoa.  
Gamete Res. 18, 179-190.
- PUWARAVUTIPANICH, T. and PANYIM, S. (1975)  
The nuclear basic proteins of human testes and ejaculated spermatozoa.  
Exp.Cell Res. 90, 153-158.
- RAO, B.J., BRAHMACHARI, S.K. and RAO, M.R.S. (1983)  
Structural organization of the meiotic prophase chromatin in the rat testis.  
J.Biol.Chem. 258, 13478-13485.
- RASHEED, B.K.A., WHISENANT, E.C., GHAI, R.D., PAPAIOANNOU, V.E. and BHATNAGAR, Y.M. (1989)  
Biochemical and immunocytochemical analysis of a histone H1 variant from the mouse testis.  
J.Cell Science 94, 61-71.

- SAUTIERE,P., BELAÏCHE,D., MARTINAGE,A. and LOIR,M. (1984)  
Primary structure of the ram (*Ovis aries*) protamine.  
Eur.J.Biochem. 144, 121-125.
- SAUTIERE,P., MARTINAGE,A., BELAÏCHE,D., ARKHIS,A. and  
CHEVAILLIER,Ph. (1988)  
Comparison of the amino-acid sequences of human protamines  
HP2 and HP3 and of intermediate basic nuclear proteins HPS1  
and HPS2.  
J.Biol.Chem. 263, 11059-11062.
- SEYEDIN,S.M. and KISTLER,W.S. (1979a)  
H1 histone subfractions of mammalian testes. 1. Organ speci-  
ficity in the rat.  
Biochemistry 18, 1371-1375.
- SEYEDIN,S.M. and KISTLER,W.S. (1979b)  
H1 histone subfractions of mammalian testes.2. Organ speci-  
ficity in mice and rabbits.  
Biochemistry 18, 1376-1379.
- SEYEDIN,S.M. and KISTLER,W.S. (1980)  
Isolation and characterization of rat testis H1t. An H1  
histone variant associated with spermatogenesis.  
J.Biol.Chem. 255, 5949-5954.
- SEYEDIN,S.M., COLE,R.D. and KISTLER,W.S. (1981)  
H1 histones from mammalian testes. The widespread occur-  
rence of H1t.  
Exp.Cell Res. 136, 399-405.
- SEYEDIN,S.M. and KISTLER,W.S. (1983)  
H1 histones from mammalian testes. H1t is associated with  
spermatogenesis in humans.  
Exp.Cell Res. 143, 451-454.
- SHIRES,A., CARPENTER,M.P. and CHALKLEY,R. (1975)  
New histones found in mature mammalian testes.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72, 2714-2718.
- SHIRES,A. and CARPENTER,M.P. (1976)  
A cysteine-containing H2B-like histone found in mature  
mammalian testis.  
J.Biol.Chem. 251, 4155-4158.
- SHLYAPNIKOV,S.V., ARUTYUNYAN,A.A., KUROCHKIN,S.N., MEMELOVA,L.V.,  
NESTEROVA,M.V., SASHCHENKO,L.P. and SEVERIN,E.S. (1975)  
Investigation of the sites phosphorylated in lysine-rich  
histones by protein kinase from pig brain.  
FEBS Lett. 53, 316-319.
- SINGH,J. and RAO,M.R.S. (1987)  
Interaction of rat testis protein, TP, with nucleic acids  
*in vitro*. Fluorescence quenching, UV absorption, and thermal  
denaturation studies.  
J.Biol.Chem. 262, 734-740.

- SWIDEREK, K., JAQUET, K., MEYER, H.E. and HEILMEYER, L.M.G. (1988)  
Cardiac troponin I, isolated from bovine heart, contains  
two adjacent phosphoserines. A first example of phosphose-  
rine determination by derivatization to S-ethylcysteine.  
Eur.J.Biochem. 176, 335-342.
- TANHAUSER, S.M. and HECHT, N.B. (1989)  
Nucleotide sequence of the rat protamine 2 gene.  
Nucleic Acids Res. 17, 4395.
- TANPHAICHITR, N., SOBHON, P., TALUPPETH, N. and CHALERMISARACHAI, P.  
(1978)  
Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated  
spermatozoa in man.  
Exp.Cell Res. 117, 347-356.
- TOBITA, T., TSUTSUMI, H., KATO, A., SUZUKI, H., NOMOTO, M., NAKANO, M.  
and ANDO, T. (1983a)  
Complete amino acid sequence of boar protamine.  
Biochim.Biophys.Acta 744, 141-146.
- TOBITA, T., SUZUKI, H., SOMA, K. and NAKANO, M. (1983b)  
Differential cleavages of disulfide cross-links of prota-  
mines in boar sperm nuclei.  
Biochim.Biophys.Acta 748, 461-464.
- TROSTLE-WEIGE, P.K., MEISTRICH, M.L., BROCK, W.A. and NISHIOKA, K.  
(1982)  
Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-speci-  
fic variant of histone 2A in rat testis.  
J.Biol.Chem. 257, 5560-5567.
- TROSTLE-WEIGE, P.K., MEISTRICH, M.L., BROCK, W.A. and NISHIOKA, K.  
(1984)  
Isolation and characterization of TH3, a germ cell-specific  
variant of histone 3 in rat testis.  
J.Biol.Chem. 259, 8769-8776.
- URBAN, M.K., FRANKLIN, S.G. and ZWEIDLER, A. (1979)  
Isolation and characterization of the histone variants in  
chicken erythrocytes.  
Biochemistry 18, 3952-3960.
- VAN HOLDE, K.E. (1988)  
Histone modifications.  
in "Chromatin" Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg  
London, Paris, Tokyo, 111-147.
- VIGUIE, F., DOMENJOU, L., ROUSSEAU-MERCK, M.F., DADOUNE, J.P. and  
CHEVAILLIER, Ph. (1990)  
Chromosomal localization of the human protamine genes, PRM1  
and PRM2, to 16p13,3 by *in situ* hybridization.  
Hum.Genet. 85, 171-174.

- WATTANASEREE, J. and SVASTI, J. (1983)  
Human testis-specific histone TH2B : fractionation and peptide mapping.  
Arch. Biochem. Biophys. 225, 892-897.
- WEST, H.P.M. and BONNER, W.M. (1980)  
Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species.  
Biochemistry 19, 3238-3245.
- WILLMITZER, L., BODE, S. and WAGNER, K.G. (1977)  
Phosphorylated protamines. 1. Binding stoichiometry and thermal stability of complexes with DNA.  
Nucleic Acids Res. 4, 149-162.
- WONG, T.K. and MARUSHIGE, K. (1975)  
Modification of histone binding in calf thymus chromatin by protamine.  
Biochemistry 14, 122-127.
- WOODCOCK, C.L.F., FRADO, L-L. and RATTNER, J-B. (1984)  
The higher-order structure of chromatin : evidence for a helical ribbon arrangement.  
J. Cell Biol. 99, 42-52.
- YELICK, P.C., BALHORN, R., JOHNSON, P.A., CORZETT, M., MAZIRMAS, T.A., KLEENE, K.C. and HECHT, N.B. (1987)  
Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not.  
Mol. Cell Biol. 7, 2173-2179.
- ZWEIDLER, A. (1980)  
Non allelic histone variants in development and differentiation.  
Dev. Biochem. 15, 47-56.
- ZWEIDLER, A. (1984)  
Core histone variants of the mouse : primary structure and differential expression.  
in "Histone Genes : Structure, Organization and Regulation" (G.S. STEIN, J.L. STEIN and W.F. MARZLUFF, eds), pp 339-371, John Wiley and Sons, New-York.



## Résumé

Au cours de la spermiogenèse, on assiste à un remaniement profond de l'organisation de la chromatine qui passe progressivement d'un état diffus dans la cellule somatique à un état fortement condensé dans les spermatozoïdes mûrs. Chez les mammifères, ce remaniement s'accompagne d'une double transition des protéines nucléaires basiques : la première correspond au remplacement des histones par les protéines de transition et la seconde au remplacement de ces dernières par une ou plusieurs protamines.

Après avoir fait le point de nos connaissances actuelles sur ces protéines, nous présentons nos travaux personnels concernant les protéines de transition TP1, TP2 et protéine 3 ainsi que la protamine, isolées du testicule de bélier (*Ovis aries*).

Les études structurales entreprises sur la protéine TP1 non- et monophosphorylée, nous ont permis de mettre en évidence, grâce à la spectrométrie de masse, deux variants structuraux ne différant que par la nature du résidu en position 27 (Cys → Gly) et d'identifier quatre sites de phosphorylation sur les sérines aux positions 8, 35, 36 et 39.

Nos travaux ont également porté sur les protéines de transition TP2 et 3. En raison des très faibles quantités de ces protéines, nous n'avons pu établir que leur structure primaire partielle. Les protéines TP2 et 3 se distinguent par la répartition des acides aminés basiques. Tandis que ces résidus sont localisés essentiellement dans la région C-terminale de la protéine TP2, ils sont répartis d'une façon uniforme dans la protéine 3.

Outre nos travaux sur les protéines de transition, nous avons mis en évidence que la protamine isolée du testicule de bélier était présente sous les formes non- et monophosphorylées dans le rapport 1/1 et que le site de phosphorylation était localisé sur la sérine 10.

Mots clefs : Mammifères - Spermiogenèse - Protéines de transition - Protamines - Variants structuraux - Structure primaire - Spectrométrie de masse - Phosphorylation.

