HAL
open science

Les protéines nucléaires basiques de transition au cours de la spermiogenèse de la roussette Scylliorhinus caniculus

M Chauvière, A Martinage, P Sautière, P Chevaillier

To cite this version:

M Chauvière, A Martinage, P Sautière, P Chevaillier. Les protéines nucléaires basiques de transition au cours de la spermiogenèse de la roussette Scylliorhinus caniculus. Reproduction Nutrition Development, 1990, 30 (3), pp.349-354. hal-00899265

HAL Id: hal-00899265

https://hal.science/hal-00899265

Submitted on 11 May 2020

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

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

Reprod Nutr Dev (1990) 30, 349-354
© Elsevier/INRA

Article original

Les protéines nucléaires basiques de transition au cours de la spermiogenèse de la roussette *Scylliorhinus caniculus*

M Chauvière [1]*, A Martinage [2], P Sautière [2], P Chevaillier [1]

[1] *Université Paris-Val de Marne, laboratoire de biologie cellulaire, 94010 Créteil;*
[2] *Institut de recherches sur le cancer, URA CNRS n° 409, 59045 Lille, France*

(15e réunion du groupe Développement INRA, Paris, 24–26 mai 1989)

Résumé — Deux transitions affectent les protéines nucléaires au cours de la spermiogenèse de la roussette : la première correspondant au remplacement des histones par 2 protéines spécifiques des spermatides S1 et S2, la deuxième conduisant aux protamines. S1, la plus abondante, est constituée de 87 acides aminés et a une masse moléculaire de 11 179 Da alors que S2, minoritaire, ne renferme que 80 résidus et a une masse moléculaire de 9 726 Da. Les 2 protéines sont très basiques : 48% et 41% de résidus basiques respectivement pour S1 et S2. Elles sont caractérisées par une répartition asymétrique des acides aminés dans la molécule; en effet, dans les 2 protéines, la moitié N-terminale de la molécule est plus basique, tandis que la partie C-terminale renferme une plus grande diversité d'acides aminés avec, en particulier, la présence groupée des seuls résidus acides de la molécule. Les 2 protéines existent sous plusieurs formes qui correspondent à des degrés divers de phosphorylation, surtout importante dans S1.

Ces 2 protéines de transition n'ont aucune similitude de structure avec les histones qui les précèdent, ni avec les protamines qui les remplacent et ne peuvent donc être considérées ni comme des produits de dégradation des premières ni comme des précurseurs des secondes.

histone / protéine de transition / protamine / chromatine / spermiogenèse

Summary — Protein transition in sperm nuclei during dog-fish spermiogenesis. *During dog-fish spermiogenesis, 2 basic nuclear protein transitions occur: the first from histones to spermatid-specific proteins S1 and S2, the second leading to protamines. S1, the most abundant transition protein, is a polypeptide containing 87 residues (M_r = 11 179 Da) whereas S2, the minor transition protein, contains 80 residues (M_r = 9 726 Da). The 2 proteins are mainly characterized by an asymmetry of the molecule, a very high content of basic residues, a relatively high level of hydrophobic residues and a cluster of acidic residues in the carboxy-terminal quarter of the molecule. The 2 proteins are phosphorylated on serine residues and the degree of phosphorylation is relatively important in protein S1. The 2 transition proteins are structurally unrelated to testis histones or sperm protamines and cannot be considered either as their proteolytic degradation products or as their precursors.*

histone / transition protein / protamine / chromatin / spermiogenesis

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

La spermiogenèse est la phase de formation des gamètes mâles pendant laquelle d'importantes modifications morphologiques et moléculaires affectent l'organisation de la chromatine des noyaux de spermatides. La principale transformation biochimique, dans la majorité des espèces animales, est le remplacement des histones de type somatique par les protamines (Bloch, 1976; Chevaillier, 1982; Poccia, 1986). Celles-ci sont des protéines de faible poids moléculaire, très riches en arginine et contenant souvent de la cystéine (Mammifères, roussette). Le résultat le plus remarquable de ce changement d'équipement protéique des noyaux est l'extrême compaction de l'ADN dans le spermatozoïde mûr. Suivant les espèces, le changement des protéines associées à l'ADN se produit en 1 ou 2 étapes. Par exemple chez la truite (Dixon, 1972), les histones sont directement remplacées par les protamines alors que dans de nombreuses autres espèces, en particulier chez les Mammifères (Kistler *et al*, 1975; Kleene et Flynn, 1987; Kleene *et al*, 1988; Luerssen *et al*, 1988; Yelick *et al*, 1987) ou chez la roussette (Gusse et Chevaillier, 1981; Chauvière *et al*, 1983, 1987, 1989) s'effectue une double transition protéique. La première consiste en le remplacement des histones par des protéines spécifiques des spermatides appelées protéines de transition, la seconde correspondant à la mise en place des protamines dans les spermatides âgées.

Dans le testicule de roussette, la différenciation dorso-ventrale des cellules germinales facilite la sélection de stades spécifiques de la spermiogenèse (Gusse et Chevaillier, 1978) et l'analyse microélectrophorétique de leurs protéines a montré que les remaniements de la chromatine se produisaient en 3 étapes (Gusse et Chevaillier, 1981). Au début de l'élongation nucléaire des spermatides, apparaissent 2 protéines de transition S1 et S2 dont la quantité s'accroît durant la spermiogenèse tandis que diminuent progressivement les histones. Dans les stades terminaux de l'élongation nucléaire, 4 protamines Z1, Z2, Z3 et S4 se mettent en place alors que la teneur en S1 et S2 décroît. Dans le spermatozoïde mûr, seules les 4 protamines sont associées à l'ADN.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les protéines basiques sont extraites par HCl 0,25 mol.l^{-1} à partir des noyaux des spermatides. Les 2 protéines de transition S1 et S2 sont ensuite purifiées par chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthylcellulose en utilisant un gradient linéaire de NaCl (0,5 mol.l^{-1} → 1,5 mol.l^{-1}). Les étapes de purification des protéines sont contrôlées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Panyim et Chalkley, 1969). Les analyses d'acides aminés sont réalisées sur un analyseur d'acides aminés Beckman 119CL. Les dégradations automatiques d'Edman des protéines S1 et S2 et de leurs peptides ont été effectuées en phase liquide dans un séquenceur Beckman 890C ou en phase gazeuse sur un séquenceur Applied Biosystems 470 A (Chauvière *et al*, 1987, 1989). Les formes phosphorylées des protéines ont été mises en évidence après digestion par la phosphatase alcaline d'*E coli*. La détermination des résidus phosphorylés a été réalisée par électrophorèse sur couche mince des hydrolysats acides des peptides de S1 et S2.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Seules les zones testiculaires B et C de la roussette où sont représentés tous les stades de la spermiogenèse (Gusse et Chevaillier, 1981) contiennent les 2 protéines de transition S1 et S2. Ces 2 protéines qui sont donc spécifiques des spermatides se sont révélées, après

purification sur caboxyméthylcellulose, sous plusieurs formes qui correspondent à différents degrés de phosphorylation (fig 1). S1 est abondamment phosphorylée sur 1 ou 2 résidus de sérine (3 et 55) alors que S2 est peu phosphorylée et sur 1 seule sérine. L'examen des structures primaires des 2 protéines de transition (Chauvière *et al,* 1987, 1989) montre que les 2 molécules présentent les caractéristiques suivantes (fig 2):

— richesse en résidus basiques (48% et 41% pour S1 et S2, respectivement);

— une asymétrie de la molécule : la moitié N-terminale (charge nette + 26 pour S1, + 21 pour S2) est plus basique que la moitié C-terminale (charge nette + 9 pour S1 et + 8 pour S2) dont la composition en acides aminés est plus diversifiée et qui contient tous les résidus acides (2 Asp, 2 Glu) de la molécule;

— richesse en résidus hydrophobes qui sont répartis pour la majorité d'entre eux dans toute la molécule selon une distribution périodique tous les 4 résidus.

L'alignement des séquences de S1 et S2 révèle une grande homologie de structure (70% d'homologie), les 2 protéines ne différant que par un court domaine central (résidus 31–39). Ces 2 protéines de transition appartiennent donc à la même famille de protéines.

La conservation de la structure primaire des histones au cours de l'évolution a pour conséquence la conservation de la structure nucléosomique de la chromatine des cellules somatiques. En revanche, la grande diversité des protéines basiques associées à l'ADN dans les cellules de la lignée germinale mâle chez les différentes espèces animales ou végétales entraîne l'existence de différents modes de compaction de l'ADN des spermatozoïdes. Aussi est-il intéressant de connaître, pour pouvoir les comparer, les séquences des différentes protéines qui s'associent à l'ADN pendant la spermatogenèse.

Les structures primaires de S1 et S2 ont donc été comparées à celles des protéines de transition connues chez les Mammifères, en particulier à la protéine TP1 (rat: Kistler *et al,* 1975; souris : Kleene *et al,* 1988; homme : Luerssen *et al,* 1988) et à la protéine TP2 (souris : Kleene et Flynn, 1987; rat : Luerssen *et al,* 1989). Quelques homologies structurales significatives ont

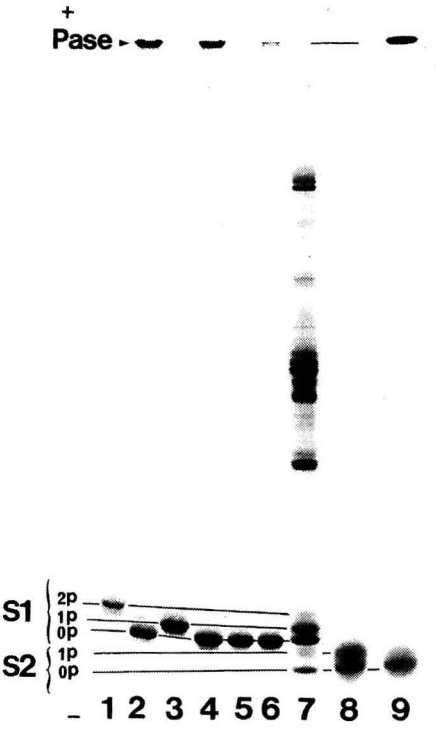

Fig 1. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines de transition S1 et S2 de la roussette. Pistes 1–6 : protéine S1; piste 7 : protéines basiques totales de la zone B (spermatides rondes et en début d'élongation) de testicule de roussette; pistes 8, 9 : protéine S2; pistes 2, 4, 6, 9 : protéines traitées par la phosphatase alcaline d'*E coli;* pistes 1, 3, 5, 8 : contrôles.

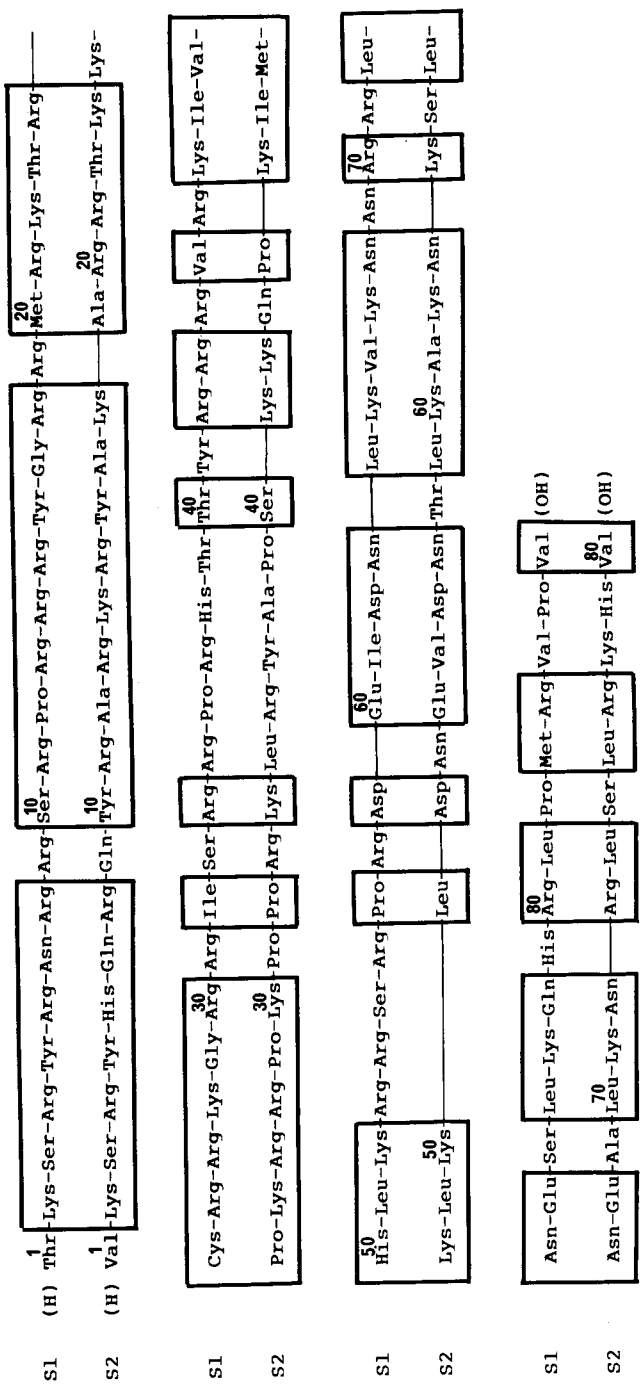

Fig 2. Structure primaire des protéines de transition S1 et S2 de testicule de roussette. Les séquences encadrées correspondent aux régions homologues.

été trouvées entre les protéines de roussette et la protéine TP1 de Mammifères. En particulier, la présence de groupements acides, dans des protéines d'espèces phylogénétiquement aussi éloignées que les Poissons et les Mammifères, suggère que cette région peut avoir un rôle particulièrement important dans les fonctions biologiques de ces protéines. Aucune similitude entre les protéines S1 et S2 de la roussette et TP2 de souris et de rat n'a, en revanche, été décelée. Cependant, l'ensemble de ces protéines, dont l'apparition est contemporaine de la réorganisation de chromatine, doit jouer un rôle intermédiaire important dans le phénomène de compaction croissante de l'ADN au cours de la spermiogenèse, compaction qui atteint son maximum dans le spermatozoïde. Pendant la spermiogenèse de la roussette, les histones sont, dans un premier temps, remplacées par 2 protéines de transition S1 et S2, auxquelles se substituent plus tard les 4 protamines Z1, Z2, Z3 et S4 appelées scylliorhinines (Gusse *et al,* 1983). Toutes ces protéines ont été séquencées (Chauvière *et al,* 1987, 1989; Sautière *et al,* 1981, 1984; Martinage *et al,* 1985; Chevaillier *et al,* 1987) et la comparaison de S1 et S2 avec, d'une part, les histones et, d'autre part, les protamines, exclut qu'elles soient des produits d'hydrolyse des premières ou des précurseurs des secondes.

Cette particularité différencie S1 et S2 de certaines protéines de transition de la souris (Yelick *et al,* 1987), de l'homme (Sautière *et al,* 1988) et du rat (Tanhauser et Hecht, 1989) puisque, au moins chez les 2 premières espèces, les structures primaires de ces protéines font penser qu'elles seraient des proprotamines. Celles-ci, après excision d'un télopeptide N-terminal, deviendraient respectivement les protamines murines (mP2) et humaines (HP2 puis HP3). Il faut cependant noter qu'un tel processus de maturation protéolytique n'a pas encore été mis en évidence.

En conclusion, il ressort maintenant de la comparaison de toutes les données connues sur les protéines nucléaires spécifiques des spermatides de Mammifères et de la roussette, qu'il existe 2 groupes distincts de protéines impliquées dans les transitions protéiques au cours de la spermatogenèse. Ces 2 familles, qui peuvent coexister chez une même espèce (Mammifères) sont constituées, d'une part de protéines qui sont seulement associées transitoirement à l'ADN pendant l'élongation des spermatides, d'autre part de protéines correspondant à des précurseurs des protamines.

RÉFÉRENCES

Bloch DP (1976) Histones of sperm. *In: Handbook of Genetics* (King RC, ed) vol 5, Plenum Press, New York, 139-167

Chauvière M, Laine B, Sautière P, Chevaillier P (1983) Purification and characterization of two basic spermatid-specific proteins isolated from the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Febs Lett* 152, 231-235

Chauvière M, Martinage A, Briand G, Sautière P, Chevaillier P (1987) Nuclear basic protein transition during sperm differentiation: Amino-acid sequence of a spermatid-specific protein from the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Eur J Biochem* 169, 105-111

Chauvière M, Martinage A, Briand G, Sautière P, Chevaillier P (1989) Nuclear basic protein transition during sperm differentiation: Primary structure of the spermatid-specific protein S2 from the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Eur J Biochem* 180, 329-335

Chevaillier P (1982) Some aspects of chromatin organization in sperm nuclei. *In: The sperm cell* (André J, ed), M Nijhoff, La Haye, 179-196

Chevaillier P, Martinage A, Gusse M, Sautière P (1987) Amino-acid sequence of scylliorhinine Z1 and comparison of the primary structure of the protamines of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Biochim Biophys Acta* 914, 19-27

Dixon GH (1972) The basic proteins of trout testis chromatin: aspects of their synthesis, post-synthetic modifications and binding to DNA. *Acta Endocrinol* S168, 128-154

Gusse M, Chevaillier P (1978) Étude ultrastructurale et chimique de la chromatine au cours de la spermiogenèse de la roussette *Scylliorhinus caniculus. Cytobiologie* 16, 421-443

Gusse M, Chevaillier P (1981) Microelectrophoretic analysis of basic protein changes during spermiogenesis in the dogfish *Scylliorhinus caniculus* (L). *Exp cell Res* 136, 391-397

Gusse M, Sautière P, Chauvière M, Chevaillier P (1983) Extraction, purification and characterization of the sperm protamines of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Biochim Biophys Acta* 748, 93-98

Kistler WS, Noyes C, Hsu R, Heinrikson RL (1975) Amino-acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis. *J Biol Chem* 250, 1847-1853

Kleene KC, Flynn JF (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 KC, Borzorgzadeh A, Flynn JF, Yelick PC, Hecht NB (1988) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding mouse transition protein 1. *Biochim Biophys Acta* 950, 215-220

Luerssen H, Hoyer-Fender S, Engel W (1988) The nucleotide sequence of human transition protein 1 cDNA. *Nucl Acid Res* 16, 7723

Luerssen H, Maier WM, Hoyer-Fender S, Engel W (1989) The nucleotide sequence of rat transition 2 (TP2) cDNA. *Nucl Acid Res* 17, 3585

Martinage A, Gusse M, Bélaïche D, Sautière P, Chevaillier P (1985) Amino-acid sequence of a cysteine-rich, arginine-rich sperm protamine of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Biochim Biophys Acta* 831, 172-178

Panyim S, Chalkley R (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch Biochem Biophys* 130, 337-346

Poccia D (1986) Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 105, 1-65

Sautière P, Briand G, Gusse M, Chevaillier P (1981) Primary structure of a protamine isolated from the sperm nuclei of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Eur J Biochem* 119, 251-255

Sautière P, Gusse M, Briand G, Martinage A, Chevaillier P (1984) Primary structure of scylliorhinine S4, a protamine isolated from sperm nuclei of the dog-fish *Scylliorhinus caniculus. Biochim Biophys Acta* 791, 82-86

Sautière P, Martinage A, Bélaïche D, Arkhis A, Chevaillier P (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

Tanhauser SM, Hecht NB (1989) Nucleotide sequence of the rat protamine 2 gene. *Nucl Acid Res* 17, 4395

Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB (1987) Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* 7, 2173-2179