

Le gène K81 responsable du phénotype de stérilité des mutant ms(3)97D²

Emma MATHIEU¹

¹ Élève de 3^{ème} année en Licence Science de la Vie parcours Génétique, année scolaire 2022-2023, Université Claude Bernard Lyon 1, France.

Directrice d'UE : Béatrice HORARD

Tutrice pédagogique : Ludivine WALTER

Coéquipiers expérimentateurs : OUDKHISS Iman, ROBERJOT Jade, MATAMOROS FAJARDO Andres, MOLERE Laura, FALLION DALMONTE Thomas, BISMPIKOPOULOU Eleni, KOENIG Camille, FREMION Sabrina, KRÜTTLI Leo, BAUD Emilie, BOCHON Noémie, MOULIN Camille.

E-mail : emma.mathieu@etu.univ-lyon1.fr

Résumé

Des drosophiles *D. melanogaster* mutants ms(3)97D² présentant une stérilité et une altération oculaire rugueuse ont été découvertes. La mutation est localisée sur le chromosome 3R dans la région 97D2-97D5, qui contient les gènes Rb97D¹, K81 et Ro (rough)². Cette étude a pour objectif d'identifier la nature et la localisation de la mutation, les effets exacts de cette mutation et le moment précis où la fertilité des drosophiles mâles est altérée. Des tests de fertilité ont permis d'identifier que c'est le gène K81 qui est impliqué dans le phénotype de stérilité des mâles ms(3)97D². La détection d'une délétion située sur le gène K81 jusqu'au gène Ro par génotypage PCR a permis de déterminer la nature de la mutation, qui est une grande délétion d'environ 2000 paires de bases. L'étude cytologique de testicules de mutant ms(3)97D² mâles au microscope à épifluorescence a révélé que cette étape se déroule normalement chez les mutants ms(3)97D², ce qui a permis d'exclure l'hypothèse selon laquelle les mutants ms(3)97D² seraient stériles à cause d'une défaillance lors de la spermatogénèse. Enfin, la colocalisation de K81 avec l'ADN présent dans les chromosomes polytènes de glandes salivaires de larves de *D. melanogaster* nous permettent de supposer que la protéine K81 interagit avec l'ADN, la disposition spécifique de la protéine K81 sur les chromosomes semble indiquer que K81 agit au niveau des télomères. Ces résultats fournissent des indications pour étudier les processus post-spermatogénèse afin de déterminer le rôle exact de K81 dans la fertilité des drosophiles mâles après la fécondation.

1. Introduction

La fécondation est un processus crucial pour le développement ultérieur des animaux à reproduction sexuée. Elle implique la fusion des gamètes mâle et femelle, qui apportent chacun leur matériel génétique. Chez les animaux, le noyau du spermatozoïde mature est caractérisé par une condensation extrême de sa chromatine qui est incompatible avec les principales fonctions nucléaires. L'un des enjeux de la fécondation est de transformer ce noyau inactif en un pronucléus capable de participer à la première division zygotique de l'embryon³. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous proposons d'étudier les événements qui préparent les noyaux des gamètes mâle et femelle à la première division mitotique du zygote immédiatement

après la fécondation⁴. Pour ce faire, nous utiliserons la drosophile *D. melanogaster* comme modèle d'étude, son génome ayant été entièrement décrypté⁵, ayant un temps de génération faible pouvant subir des manipulations génétiques facilement. Nous nous intéresserons plus spécifiquement à la lignée mutante ms(3)97D² de la drosophile, qui présente un phénotype de stérilité mâle ainsi qu'une altération de la structure de l'œil. Nous chercherons à caractériser l'identité moléculaire du gène ms(3)97D² en comparant cette lignée mutante à un ensemble de lignées de drosophile à notre disposition. Le but de cette étude est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du zygote chez la drosophile en caractérisant les effets et mécanismes d'action de la mutation ms(3)97D² conduisant à la stérilité des mâles. Cette étude a débuté par une recherche visant à identifier le gène porteur de la mutation par un

test de complémentation fonctionnelle, suivi d'une caractérisation moléculaire approfondie de cette mutation par PCR. Nous avons ensuite procédé à une analyse de l'expression de ce gène en extrayant l'ARN génomique puis en faisant une RT-PCR. Nous avons évalué son implication dans la spermatogénèse en effectuant une analyse cytologique sur tissu fixé [6]. Ensuite, par l'analyse cytologique sur tissu vivant de chromosomes polytènes de larves de drosophiles, nous avons découvert que la protéine issue de ce gène interagit avec l'ADN, nous supposons que la protéine agit en particulier avec les télomères des chromosomes, notamment pour faciliter leur séparation lors de la première division de mitose [7].

2. Matériel et Méthodes

Culture de drosophile

Les souches de D. melanogaster sont cultivées dans un milieu de culture composé de farine de maïs, de levure de bière, d'agar, d'agent antifongique et d'eau. Ce milieu est placé dans des tubes avec un bouchon. Pour leur transfert, les drosophiles sont anesthésiées avec du NO₂.

Test de fertilité

Réalisation de croisements avec des femelles vierges sauvages dans des tubes distincts. 5 mâles et 5 femelles sont placés dans un tube, puis transféré dans un nouveau tube au bout de 24h, un comptage des œufs est effectué dans le premier tube, 24h après, les œufs non éclos sont comptés dans ces mêmes tubes. Les tubes contiennent de la gélose rose pour faciliter le comptage avec une fine couche de levure boulangère. Les tubes sont conservés en étuve à 25°C. 4 répétition de tubes de 10 individus. Calcul du taux d'éclosion est fait avec la formule :

$$\frac{(\text{nombre œufs pondus} - \text{nombre œufs non éclos})}{\text{nombre d'œufs pondus}} \times 100$$

Vérification statistique par test d'homogénéité* à 5% avec la formule :

$$\frac{(\frac{\sigma^2 X}{nX} + \frac{\sigma^2 Y}{nY})}{\text{Moyenne génotype X - Moyenne génotype Y}}$$

Génotypage et RT-PCR

K81 primer #ATG : 5'- ATG TCG GAT TCG CCC CAT G-3'
K81 primer #2 : 5'- ATC CCC CAG TAG TTC CCG CCA G -3'
K81 primer #5 : 5'-AGG AGC AGT AGT GAG AAA TC-3'
K81 primer #4 : 5'- TAG TGG TTG ATT CTT GCT CCT C-3'
K81 primer #3 : 5'- CGA AAA CCG CCA ACG TAT ACT-3'
Ro primer #12 : 5'- ATC CTA ACA CCA CCG AGC AA -3'
Rp49#F : 5'- AAG ATC GTG AAG AAG CGC AC-3'
Rp49#R 5'-ACT CGT TCT CTT GAG AAC GC-3'
Rp49#R 5'-ACT CGT TCT CTT GAG AAC GC-3'
Rp49#R 5'-ACT CGT TCT CTT GAG AAC GC-3'

Table 1 : Amorces utilisées pour les PCR et RT-PCR

Extraction d'ADN avec un tampon d'extraction contenant du Tris-HCL pH 8,2 à 10mM, EDTA 1mM, NaCl 25mM et protéinase K 20mg/ml à 200µg/ml. Taq-polymérase 5U/µl (marque Biotechrabbit). Après PCR analyse du génotypage sur gel d'agarose de 0,8 à 1,5%. Tampon de charge : bleu de bromophénol et le xylène de cyanol. GeneRuler 1kb DNA Ladder et GeneRuler 1 kb plus DN Ladder.

Cytologie pour la spermatogénèse

Anticorps utilisés : w ; P[w+;promK81- GFP::K81]/P[w+; promK81-GFP::K81] ; ms(3)97D2/ms(3)97D2 : Anticorps secondaire, Goat aMouse-Alexa Fluor 488 (Invitrogen 10256302) Marquage au DAKO-DAPI ; +/- : Anticorps primaire, anti-histone Mouse apan-Histone (Sigma MABE71) Anticorps secondaire, Goat aMouse-Alexa Fluor 488 (Invitrogen 10256302) Marquage au DAKO-DAPI ; w ; ms(3)97D2/TM3 Sb Ser : Anticorps primaire, anti-histone Mouse apan-Histone (Sigma MABE71) Anticorps secondaire, Goat aMouse-Alexa Fluor 488 (Invitrogen 10256302) Marquage au DAKO-DAPI.

Dissection de testicules de 10 individu dans du PBS-T. Observation des préparations au microscope à épifluorescence AxioVert 1- Zeiss.

Cytologie sur chromosomes polytènes

Production de larves de génotype w , P[w+ ; pUAS-mRFP1::K81]attB2A ; P[w+ ;(Act5C-Gal4)].II/CyO. Dissection de larves de 6 jours nourries généreusement a la levure boulangère. Les tubes sont placés à 25°C. dissection des larves dans du PBS-T, mise des glandes salivaires dans du DAKO-DAPI, observation au microscope à épifluorescence AxioVert - Zeiss.

Extraction d'ARN

Conditions ARNase free, conservation des tissu à -20°C dans 100 µl de Tri Reagent. Utilisation de 50 carcasses et testis par génotypes. Quantification et estimation de la pureté des ARN au Nanodrop | Spectrophotomètres Uv-vis microvolume.

3. Résultats

Dans la zone cytogénétique 97D3-97D5, trois unités de transcription indépendantes ont été identifiées jusqu'à présent : Rb97D, K81 et Ro. Pour tester la capacité des mutations ro¹, K81¹ et Rb97D¹ à compléter ou non la stérilité des mâles ms(3)97D², des croisements ont été réalisés (Table 2). Nous obtenons des larves a l'issue de chacun de ces croisements. A ce stade, nous pouvons déjà conclure que la mutation ms(3)97D²/ms(3)97D² n'entraîne pas de phénotype de stérilité chez la femelle. Également, les gènes mutants K81¹ et Rb97D¹ sont des gènes récessifs, ainsi que la mutation ms(3)97D². Enfin, la mutation Ro¹ n'implique pas de phénotype de stérilité à l'état homozygote.

♀♀ w/w ; ms(3)97D ² / ms(3)97D ² X ♂ +/Y ; K81 ¹ / TM3 Sb Ser
♀♀ +/+ ; K81 ¹ / K81 ¹ X ♂ w/Y ; ms(3)97D ² / TM3 Sb Ser
♀♀ w/w ; ms(3)97D ² / ms(3)97D ² X ♂ +/Y ; Rb97D ¹ /TM3, Sb
♀♀ w/w ; ms(3)97D ² / ms(3)97D ² X ♂ +/Y ; ro ¹ / ro ¹

Table 2 : Croisements préliminaires

Les mâles hétérozygotes collectés sont croisés avec des femelles sauvages vierges et le taux d'éclosion des œufs issus de ces croisements a été évalué. Une mutation sur le gène K81 semble être responsable du phénotype de stérilité du mutant ms(3)97D² (Table 3), les mutations récessives Rb97D¹ et Ro¹ ne sont pas portées sur le même gène que la mutation ms(3)97D².

Génotype des mâles	Génotype des femelles	Nombre d'œufs pondus	Nombre de larves	Taux d'éclosion
ms(3)97D ² / TM3 Sb Ser	+/+	426	331	77,70%
ms(3)97D ² / Rb97D ¹	+/+	253	179	70,75%
ms(3)97D ² / ro ¹	+/+	443	359	81,04%
ms(3)97D ² / K81 ¹	+/+	608	0	0,00%
K81 ¹ / TM3 Sb Ser	+/+	512	375	73,24%

Table 3 : Le phénotype du mutant de génotype ms(3)97D²/K81¹ est stérile

Afin d'être certain que le phénotype de stérilité du mutant ms(3)97D² provient bien uniquement d'une mutation sur K81 nous avons effectué un sauvetage sur deux souches naturellement mutantes, une pour le gène K81 dont nous avons restauré le gène K81 a l'aide d'un vecteur de transgénèse et une souche mutante ms(3)97D² dont nous avons également restauré le gène K81, puis nous avons effectué des croisements de ces souches avec des femelles sauvages (Table 4). Le croisement entre un mutant K81¹ avec femelle sauvage est bien

stérile, ainsi que le croisement entre un mutant $ms(3)97D^2$ et femelle sauvage est stérile également, le sauvetage du gène K81 sur le mutant $K81^1$ rétablit bien un phénotype sauvage (fertile), enfin le sauvetage du gène K81 sur le mutant $ms(3)97D^2$ rétablit également un phénotype de stérilité, ces résultats sont fiables statistiquement*. Le phénotype de stérilité des males $ms(3)97D^2$ est donc uniquement due à une mutation sur le gène K81.

		$\sigma^{WT} \times \varphi^{WT}$	$\sigma^{K81^1/K81^1} \times \varphi^{WT}$	$\sigma^{K81^1/K81^1 \text{ sauvé pour le gène } K81 \times \varphi^{WT}}$	$\sigma^{ms(3)97D^2 / ms(3)97D^2} \times \varphi^{WT}$	$\sigma^{ms(3)97D^2 / ms(3)97D^2 \text{ sauvé pour le gène } K81} \times \varphi^{WT}$
Œufs pondus	Total	1134	737	966	845	997
	Ecart type	44	61	77	55	86
	Variance	1907	3681	5929	3012	7376
	Moyenne	284	184	242	282	249
Œufs non éclos	Total	196	727	225	830	318
	Ecart type	16	65	29	54	57
	Variance	250	4266	842	2920	3266
	Moyenne	49	182	56	277	80
Taux de fertilité		82,72 %	1,36%	76,71%	1,78%	68,10%

Table 4 : Le taux de fécondité des mutants homozygotes $ms(3)97D^2$ et $K81^1$ redevient élevé après sauvetage du gène K81.

Afin de caractériser plus précisément la mutation du gène K81 responsable du phénotype de stérilité male du mutant $ms(3)97D^2$, une série de PCR a été entreprise (Figure 1). Nous partons du postulat qu'il s'agit d'une mutation ponctuelle, les seules mutations détectables à l'aide de PCR étant des mutations ponctuelles. La mutation $K81^1$ correspond à une insertion de 40pb et la mutation $ms(3)97D^2$ correspond à une grande délétion de 2000pb s'étendant sur une partie du gène Ro (figure 1).

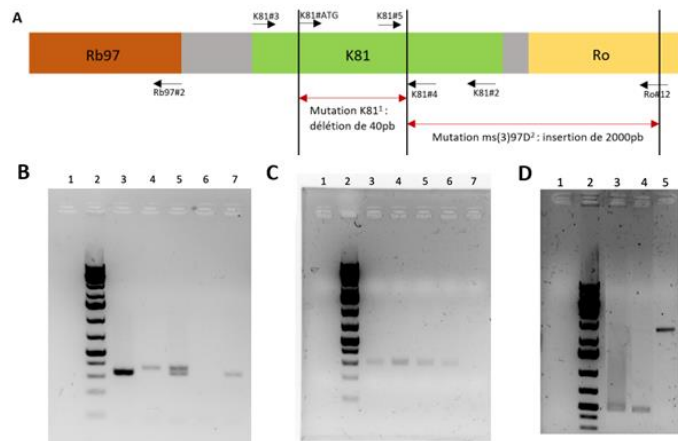


Figure 1 : La mutation $ms(3)97D^2$ est une grande délétion de 2000 paires de bases sur le gène K81 et Ro. (A) Cartographie du génome de *D. melanogaster* avec identification des mutations $ms(3)97D^2$ et $K81^1$. (B) Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR avec les amorces K81#ATG et K81#4 (fragment de 323 pb), 1 - H₂O, 2 - marqueur moléculaire (GeneRuler 1kb DNA Ladder), 3 - sauvage +/+, 4 - homozygote $K81^1/K81^1$, 5 - hétérozygote $K81^1/+$, 6 - homozygote $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$, 7 - hétérozygote $ms(3)97D^2/+$. (C) Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR avec les amorces K81#5 et K81#2 (fragment de 310 pb), 1 - H₂O, 2 - marqueur moléculaire (GeneRuler 1kb DNA Ladder), 3 - sauvage +/+, 4 - $K81^1$ hétérozygote $K81^1/+$, 5 - homozygote $K81^1/K81^1$, 6 - hétérozygote $ms(3)97D^2/+$, 7 - homozygote $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$. (D) Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR avec les amorces K81#3 et Ro#12 (fragment de 2650 pb), 1 - blanc (eau), 2 - marqueur moléculaire (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder), 3 - homozygote

$ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$, 4 - hétérozygote $ms(3)97D^2/+$, 5 - sauvage +/+. Les amorces sont décrites dans la table 1.

Afin de vérifier et de localiser la présence d'expression du gène K81 chez les drosophiles $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$, nous avons effectués une série de RT-PCR (Figure 2). La protamine Mst35Bb n'est présente que dans les testicules de drosophiles males sauvage et mutant $ms(3)97D^2$, elle est absente dans les carcasses. Chez les Homozygotes $ms(3)97D^2$ il n'y a pas d'expression de K81, tandis que chez les males sauvages il y a une expression du gène K81 mais uniquement dans les testicules.

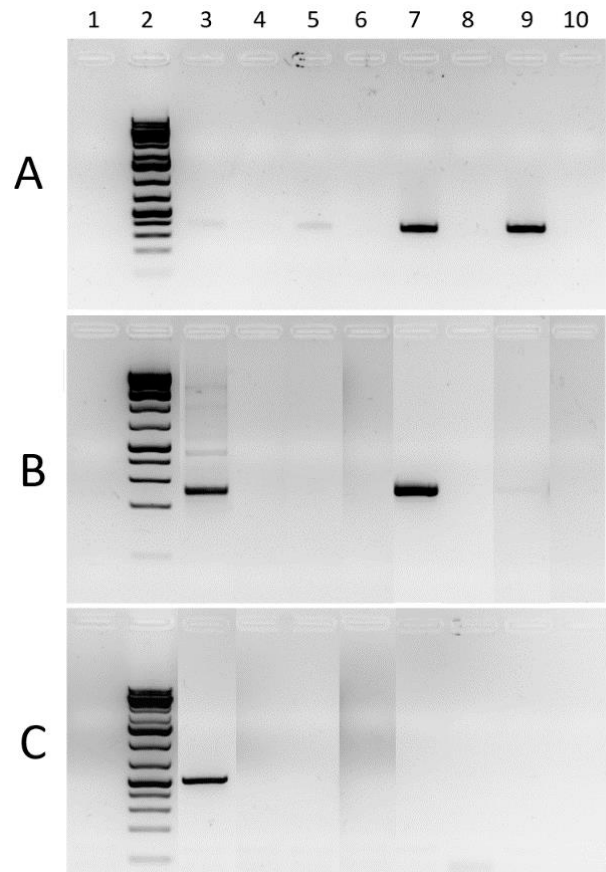


Figure 2 : Absence d'expression du gène K81 chez le mutant $ms(3)97D^2$ dans les gonades males. (A) Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR avec les amorces Rp49#F et Rp49#R (fragment de 400 pb), Rp49 est un gène ribosomique ubiquitaire chez la drosophile, (B) Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR avec les amorces Mst-35Bb#F et Mst35Bb#R (fragment de 350 pb), (C) Résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR avec les amorces K81primer#ATG et K81primer#2 (fragment d'environ 550 pb). Pistes : 1 - H₂O ; 2 - GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder ; 3 - Testis +/+ avec présence de transcriptase inverse ; 4 - Testis +/+ avec absence de transcriptase inverse ; 5 - Carcasse de males +/+ avec présence de transcriptase inverse ; 6 - Carcasse de males +/+ avec absence de transcriptase inverse ; 7 - Testis $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$ avec présence de transcriptase inverse ; 8 - Testis $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$ avec absence de transcriptase inverse ; 9 - Carcasse de males $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$ avec présence de transcriptase inverse ; 10 - Carcasse de males $ms(3)97D^2/ms(3)97D^2$ avec absence de transcriptase inverse. Les amorces sont décrites dans la table 1.

Dans l'hypothèse où le phénotype de stérilité male du mutant $ms(3)97D^2$ serait dû à une anomalie lors de la spermatogénèse, et plus précisément sur la disparition des histones et l'apparition des protamines, nous avons réalisé une analyse cytologique sur tissus fixés

des testis de drosophile (Figure 3). Les différentes étapes de la spermatogénèse étant facile à visualiser chez la drosophile. La spermatogénèse débute à l'extrémité apicale du testicule par des cellules souches germinales. Après division des cellules souches on obtient des spermatogonies primaires. Chaque spermatogonie subit par la suite 4 mitoses incomplètes dans un cyste formant ainsi 64 spermatides haploïdes reliées par des ponts cytoplasmiques. Cette étape de différenciation se caractérise par l'élongation du flagelle, un allongement et une condensation des noyaux et une réorganisation complète de leur chromatide. Les histones sont éliminées et remplacées par des protamines. Après observation au microscope à épifluorescence on peut conclure que les double mutants $ms(3)97D^2$ ont une étape de disparition des histones identiques à celle des sauvages. On observe bien les spermatides matures sans coloration verte (absence d'histones) et des spermatides en cours de maturation avec une coloration verte (donc présence d'histones). La révélation de la coloration verte sur les observations de la lignée $w; P[w+; prom K81 - GFP::K81] / P[w+; prom K81 - GFP::K81]; ms(3)97D^2 / ms(3)97D^2$ nous permet d'affirmer qu'il y a bien présence de K81 dans les testis. Nous pouvons donc conclure que la mutation est à effet paternel et n'a aucun effet sur la spermatogénèse.

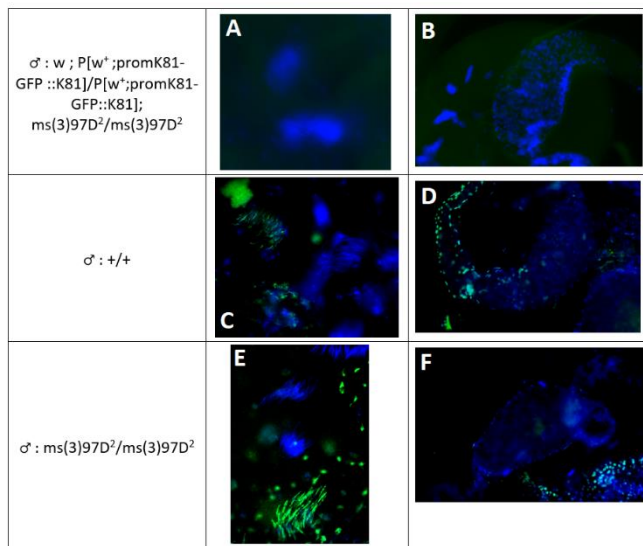


Figure 3 : Absence d'implication de la protéine K81 lors de la spermatogénèse (A), (B), (C), (D), (E), (F) Observation au microscope à épifluorescence de testicules de Drosophile de différentes souches. (A), (B) La coloration bleue indique l'ADN (marquage au DAPI) et la coloration verte la protéine K81 (marquage à la GFP). (C), (D), (E), (F) La coloration bleue indique l'ADN (marquage au DAPI) et la coloration verte indique les histones (marquage à la GFP). (A), (C), (E) Observation de spermatides. (B), (D), (F) Observation d'un cyste contenant des spermatocytes.

Afin de mieux comprendre le rôle de la protéine K81 et son action, nous avons décidé d'utiliser une propriété spéciale des drosophiles, la présence de chromosomes polytènes dans les glandes salivaires de larves de drosophile. Dans les glandes salivaires de la drosophile, une amplification généralisée de l'ADN produit des chromosomes polytènes. Ce processus, appelé polyténisation, a lieu lorsque de l'ADN se réplique de façon répétée sans que les chromosomes fils ne se séparent. Le résultat est un chromosome géant constitué de nombreuses copies parallèles de lui-même. Ces chromosomes géants contiennent jusqu'à 1000 brins d'ADN appariés et permettent une cartographie cytologique des caractéristiques structurales des chromosomes à une résolution inégalée. Cette propriété exceptionnelle des drosophiles pourra ainsi nous servir à observer directement l'interaction de K81 avec l'ADN et permettre de caractériser cette interaction. Chez les chromosomes polytènes de

drosophile les 4 chromosomes de la drosophile sont reliés par un chromocentre (Figure 4, G). Nous avons le chromosome X, chromosome 4, chromosome 3 qui a deux bras ainsi que le chromosome 2 qui possède aussi deux bras (figure 4, G). Nous observons 5 à 6 zones de colocalisation de la protéine K81 avec l'ADN (Figure 4, C-F), cela nous permet de dire que K81 interagit avec l'ADN. Mais nous laissons aussi supposer que K81 interagit avec les régions télomériques de l'ADN.

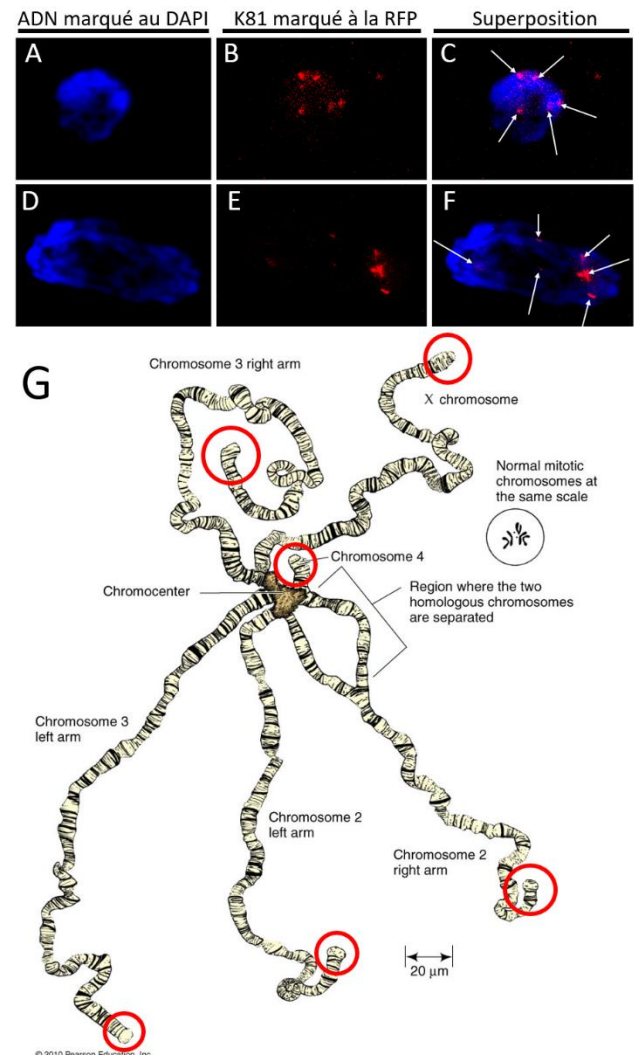


Figure 4 : Colocalisation de K81 sur l'ADN sur les extrémités des chromosomes (A), (D) Observation du marquage de l'ADN au DAPI. (B), (E) Observation de K81 en rouge marqué à la RFP. (C), (F) Superposition des images (A), (B) ainsi que (D), (E). Les flèches blanches indiquent les endroits où il y a une colocalisation de K81 avec l'ADN. (G) Schéma de chromosomes polytènes de larves de *D. melanogaster* observés. Les cercles rouges indiquent les parties télomériques de ces chromosomes.

4. Discussion

La présente étude se concentre sur la caractérisation de la mutation des drosophiles *D. melanogaster* $ms(3)97D^2$, qui ont été trouvées présentant une stérilité mâle ainsi qu'une altération oculaire rugueuse. En utilisant des approches de génotypage PCR et de tests de fertilité, nous avons identifié que la mutation était localisée sur le gène K81 et Ro, nous savons par ailleurs que K81 est essentiel pour la fertilité des drosophiles mâles [7]. Une analyse cytologique nous a permis de constater que l'absence de protéine K81 n'avait pas d'impact sur la

spermatogénèse. Avec une analyse cytologique de chromosomes polytènes la localisation de la protéine K81 sur les supposés extrémités des chromosomes a également été constatée. Aux extrémités des chromosomes, il y a les télomères qui sont des structures dont la fonction principale est de préserver la stabilité du génome en empêchant la fusion des extrémités chromosomiques. On peut donc supposer que l'absence de protéine K81 altère le fonctionnement des télomères, permettant ainsi la fusion des extrémités des chromosomes, ce qui pourrait expliquer la stérilité associée.

Il serait par la suite approprié d'entreprendre des recherches pour déterminer si un homologue humain du gène K81 existe et s'il est impliqué dans des fonctions similaires. Ces investigations pourraient améliorer notre compréhension de la stérilité masculine et conduire à la mise au point de nouvelles thérapies pour en traiter les causes.

Conflits d'intérêts

L'auteur ne déclare aucun conflit d'intérêts.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Ludvine Walter, notre tutrice pédagogique pour ce stage, pour ses conseils avisés, son soutien constant et son accompagnement tout au long de ce projet. Je suis reconnaissante envers les institutions qui ont soutenu cette recherche, notamment l'Université Claude Bernard Lyon 1 et le Laboratoire de la Plateforme de Génétique, RdC Bat. Mendel. Je remercie également mes collaborateurs de la salle 4 pour leur contribution essentielle à cette recherche. Enfin, je remercie Béatrice Horard, responsable de cette UE, sans qui le projet n'aurait pas eu lieu.

Liste des abréviations

K81 : le gène CG14251
WT : Wild Type/Sauvage
Ro : le gène rough (yeux rugueux)
GFP : Green Fluorescent Protein – protéine fluorescente verte
RFP : Red Fluorescent Protein- protéine fluorescente rouge
D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

Références

- [1] Karsch-Mizrachi, I., & Haynes, S. R. (1993). The Rb97D gene encodes a potential RNA-binding protein required for spermatogenesis in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 21(9), 2229-2235.
- [2] Heberlein, U., Penton, A., Falsafi, S., Hackett, D., & Rubin, G. M. (1994). The C-terminus of the homeodomain is required for functional specificity of the *Drosophila* rough gene. *Mechanisms of Development*, 48(1), 35-49.
- [3] Miller, D., Brinkworth, M. H., & Iles, D. T. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa : more than the sum of its parts ? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, 139(2), 287-301.
- [4] Loppin, B., Dubruielle, R., & Horard, B. (2015). The intimate genetics of *Drosophila* fertilization. *Open Biology*, 5(8), 150076.
- [5] Lindsley, D. L., & Zimm, G. G. (1992). *The Genome of Drosophila Melanogaster*.
- [6] La Marca, J. E., & Somers, W. G. (2014). The *Drosophila* gonads : models for stem cell proliferation, self-renewal, and differentiation. *AIMS genetics*, 01(01), 055-080.

- [7] Dubruielle, R., Orsi, G. A., Delabaere, L., Cortier, E., Couble, P., Marais, G. A. B., & Loppin, B. (2010). Specialization of a *Drosophila* Capping Protein Essential for the Protection of Sperm Telomeres. *Current Biology*, 20(23), 2090-2099.