

Thèse de doctorat  
de l'Université Sorbonne Paris Cité  
Préparée à l'Université Paris Diderot  
**Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité n° 562**  
*Laboratoire de Développement des Gonades*  
(UMR 967 CEA/ INSERM/ Université Paris Diderot-Paris 7/ Université Paris Sud-Paris 11)

# **Etude du rôle de MEIOB, SPATA22 et RPA au cours de la recombinaison homologue méiotique.**

Par Jonathan Ribeiro

Thèse de doctorat en Biologie

Dirigée par le Pr. Gabriel Livera et le Dr. Emmanuelle Martini

Présentée et soutenue publiquement à Fontenay-aux-roses, le 27/09/2017

Président du jury : Charbonnier, Jean-Baptiste / Docteur / Université Paris Sud, Paris Saclay, CEA, CNRS

Rapporteur : Borde, Valérie / Docteur / Université Pierre et Marie Curie, CNRS

Rapporteur : Llorente, Bertrand / Docteur / Université Aix Marseille, INSERM, CNRS

Examineur : Grey, Corinne / Docteur / Université de Montpellier, CNRS

Examineur : Mercier, Raphaël / Docteur / Université Paris Sud, Paris Saclay, INRA, AgroParisTech

Directeur de thèse : Livera, Gabriel / Professeur / Université Paris Diderot, Paris 7, CEA, INSERM

Co-directrice de thèse : Martini, Emmanuelle / Docteur / Université Paris Diderot, Paris 7, CEA, INSERM



Ce travail a été effectué au Laboratoire de Développement des Gonades (LDG)  
Directeur, Pr. Gabriel Livera

Unité mixte de recherche 967 - Cellules souches et radiations  
INSERM - CEA - Université Paris Diderot - Paris 7 - Université Paris Sud - Paris 11  
Dirigée par le Dr. Paul-Henri Roméo

Direction de la Recherche Fondamentale  
Centre CEA de Fontenay-aux-roses  
18, route du Panorama  
BP6  
92265 Fontenay-aux-roses

Jonathan Ribeiro a obtenu une bourse de thèse au concours Irtelis (programme doctoral du CEA) pour une durée de trois ans entre novembre 2013 et octobre 2016 puis un financement de la Ligue Nationale contre le Cancer de 4ème année entre novembre 2016 et septembre 2017.



## **Etude du rôle de MEIOB, SPATA22 et RPA au cours de la recombinaison homologue méiotique.**

La recombinaison homologue est un processus conservé chez les eucaryotes. Au cours de la méiose, ce mécanisme est essentiel à la formation des crossing-overs, eux-mêmes essentiels à la bonne ségrégation des chromosomes homologues. La recombinaison méiotique est assurée par l'action combinée de facteurs mitotiques et méiotiques. La protéine MEIOB a récemment été identifiée et caractérisée comme étant essentielle à la réparation des cassures double brin de l'ADN au cours de la méiose. MEIOB est un paralogue de RPA1, la grande sous-unité du complexe RPA qui est un complexe de liaison à l'ADN simple brin ubiquitaire et composé de RPA1, RPA2 et RPA3. MEIOB peut interagir avec SPATA22 et RPA2. Cette observation suggère que MEIOB, SPATA22 et RPA pourraient agir ensemble au cours de la recombinaison méiotique. En se basant sur l'homologie de structure entre MEIOB, SPATA22 et les sous-unités de RPA, nous avons caractérisé les modalités et le rôle de leur interaction. Nous avons montré que MEIOB et SPATA22 interagissent grâce à leur domaines OB-folds C-terminaux à l'image de RPA1 et RPA2 et que MEIOB et SPATA22 coopèrent pour interagir avec le complexe RPA. Par microscopie électronique, nous avons mis en évidence que la présence de MEIOB-SPATA22 induit une forte condensation du filament RPA-ADN simple brin. Nous avons également montré par immunofluorescence sur chromosomes méiotiques murins que l'hélicase BLM accumule sur les axes chromosomiques et que cette accumulation est corrélée avec l'élimination de la recombinase DMC1 des cassures méiotiques non-réparées, en absence de MEIOB. Enfin, nous avons mis en évidence par microscopie à haute résolution que l'absence de MEIOB favorise une distribution anormale des protéines recombinases. Nos résultats suggèrent que MEIOB, SPATA22 et RPA collaborent pour assurer l'intégrité des intermédiaires de recombinaison méiotiques au cours de l'invasion d'un brin homologue.

Mots clés : recombinaison homologue, MEIOB, SPATA22, RPA, ADN simple brin, BLM, DMC1, RAD51

## **Study of the role of MEIOB, SPATA22 et RPA during meiotic homologous recombination.**

Homologous recombination is a conserved process among eukaryotes. During meiosis, this mechanism is essential to the formation of crossovers and thus for the proper segregation of chromosomes. Meiotic recombination is ensured by the combined action of mitotic and meiotic factors. MEIOB has been recently identified and shown to be essential to the repair of meiotic DNA double-strand breaks. MEIOB is a paralog of RPA1, the large subunit of RPA, which is a ubiquitous ssDNA-binding trimeric composed of RPA1, RPA2 and RPA3. MEIOB has been shown to interact with SPATA22 and RPA2. This observation suggested that MEIOB, SPATA22 and RPA may work together. Based on the homology existing between structural domains of MEIOB, SPATA22 and the RPA subunits, we deciphered the modality and the role of their interactions. We show that MEIOB and SPATA22 interact through their C-terminal OB domains like RPA1 and RPA2 and cooperate to interact with the RPA complex. Using Transmission Electron Microscopy, we evidenced that the presence of MEIOB/SPATA22 induces a strong compaction of the RPA/ssDNA filament. Immunofluorescent microscopy performed on murin meiotic chromosomes revealed that in the absence of MEIOB, the BLM helicase accumulates on chromosomes axis and correlates with the eviction of the DMC1 recombinase from unrepaired meiotic breaks. Finally, we show that the absence of MEIOB favors abnormal recombinase distribution observed by SIM microscopy. Together, our results evidence that MEIOB, SPATA22 and RPA act together to insure the integrity of recombination intermediates during strand invasion.

Keywords : homologous recombination, MEIOB, SPATA22, RPA, single-stranded DNA, BLM, DMC1, RAD51

*A mes parents et à ma sœur, mon soutien indéfectible*



## **Remerciements au jury**

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de participer à l'aboutissement de mon travail de thèse.

Merci au Docteur Jean-Baptiste Charbonnier d'avoir consenti à présider mon jury de thèse.

Merci aux Docteurs Valérie Borde et Bertrand Llorente pour avoir assumé la charge d'être mes rapporteurs de thèse.

Merci également aux Docteurs Corinne Grey et Raphaël Mercier d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie enfin chaleureusement le Docteur Emmanuelle Martini et le Professeur Gabriel Livera pour m'avoir co-encadré et conseillé avec sagesse et bienveillance tout au long de ma thèse.



# **Table des abréviations**



## Table des abréviations

### A

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNsb : ADN simple brin

ADNdb : ADN double brin

AE : éléments axiaux du complexe synaptonémal

ALT : Alternative Lengthening of Telomeres

*A.thaliana* : *Arabidopsis thaliana*

ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated)

ATR : Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein

ATRIP : ATR-Interacting Protein

### B

BLM : Bloom syndrome protein

BRCA2 : Breast Cancer 2

BrdU : Bromodésoxyuridine

BTR : BLM-Topo III $\alpha$ -RMI1-2

### C

CDB : cassures double brin

CE : l'élément central du complexe synaptonémal

CO : crossing-over

CR : région centrale du complexe synaptonémal

CS : complexe synaptonémal

CXXC1 : CXXC Finger Protein 1

CDK : Cyclin-Dependent Kinases

### D

D-loop : Displacement loop

DMC1 : Disrupted Meiotic cDNA 1

DNA2 : DNA replication helicase/nuclease 2

DNA-Pkcs : DNA-dependent protein kinase

### E

EME1 : Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1

ENU : N-nitroso-N-éthylurée

ES : embryonic stem

EXO1 : Exonuclease 1

EWSR1 : Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1

## **F**

FANCI : Fanconi Anemia Group I Protein

FANCD1 : Fanconi Anemia Group D Protein

FBH1 : F-box DNA helicase protein 1

FIGL1 : FIDGETIN-LIKE-1

Fun30 : Function Unknown Now 30

## **G**

GEN1 : Gen Endonuclease Homolog 1

## **H**

H2AX : variant X de l'histone H2A

Hed1 : High copy suppressor of rED1

HEI10 : Human Enhancer of Invasion clone 10

HEK-293 : Human embryonic kidney cells 293

HFM1 : Helicase Family Member 1

HOP : HOmologous Pairing

## **I**

INO80 : INOsitol requiring 80

IHO1 : Interactor of HORMAD1 protein 1

## **K**

KASH : Klarsicht, ANC-1, Syne Homology

Kms : Karyogamy meiotic segregation protein

## **L**

LE : éléments latéraux du complexe synaptonémal

LINC : Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton

## **M**

MEI4 et 5 : MEIosis-specific 4 et 5

MEI1 : Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1

MEIOB : Meiosis-specific with OB domain-containing protein  
MEIOC : Meiosis Specific With Coiled-Coil Domain  
Mer : MEiotic Recombination 2  
Meu32 : Meiotic Expression Upregulated 32  
MLH1 : MutL Homolog  
Mms4 : Methyl MethaneSulfonate sensitivity 4  
MND1 : Meiotic Nuclear Divisions 1  
Mph1 : Mutator PHEnotype 1  
MRE11 :Meiotic Recombination 11  
MRN : MRE11-RAD50-NBS1  
MRX : Mre11-Rad50-Xrs2  
MSH : MutS Homolog  
Mug37 : Meiotically up-regulated gene 37  
MUS81 : MMS and UV Sensitive 81

## **N**

NBS1 : Nibrin  
NMRI : Naval Medical Research Institute  
NHEJ : Non-Homologous End-Joining  
NCO : noncrossing-over

## **O**

OB-fold : Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding – Fold

## **P**

P53 : Phosphoprotein P53  
PALB2 : Partner and localizer of BRCA2  
PARI : PARP1 Binding Protein  
PBS : Phosphate Buffered Saline  
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen  
Pol3 : POLymerase 3  
PRD1 : PUTATIVE RECOMBINATION INITIATION DEFECT 1  
PRDM9 : PR/SET Domain 9  
PVDF : polyvinylidene difluoride

## **R**

RAD : RADiation sensitive

RAD21-L : RADiation sensitive 21-Like  
RAD51AP1 : RAD51 associated protein 1  
Rdh54 : RaD54 Homolog  
Rec : RECombination  
RecO-RecR : Recombination protein O et R  
RECQL5 : RecQ Like Helicase 5  
RECQ1 : RecQ Like Helicase 1  
Red1 : REDuctional division 1  
REN : Réparation par Excision de Nucléotides  
RMI: RecQ Mediated Genome Instability  
RNF212 : Ring Finger Protein 212  
RPA : Replication protein A

## S

Sad1 : Spindle pole body-associated protein sad1  
Sae : Sporulation in the Absence of spo Eleven  
*S.cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*  
SDSA : Synthesis-dependent strand annealing  
Set1 : SET domain-containing 1  
SFR1 : SWI5 dependent homologous recombination repair protein 1  
Sgs1 : Slow Growth Suppressor 1  
SIM : Structured Illumination Microscopy  
SIX6OS1 : SIX6 Opposite Strand transcript 1  
SLX: Synthetic Lethal of unknown (X)  
SMARCAD1 : SWI/SNF-Related, Matrix-Associated Actin-Dependent 1  
SMC : Structural Maintenance Chromosome  
SPATA22 : Spermatogenesis-associated protein 22  
Spo11 : SPOrulation 11  
Spp1 : Set1c, Phd finger Protein 1  
Srs2 : Suppressor of Rad Six 2  
SSB : Single-Strand Binding protein  
STAG3 : Stromal Antigen 3  
STR : Sgs1-Top3-Rmi1  
SUMO : Small Ubiquitin-related MOdifier  
SUN : Sad1p, UNC-84  
SV40 : Simian Virus 40  
Swi2/Snf2 : Switch 2/Sucrose NonFermenting 2

SWI5 : SWI5 homologous recombination repair protein  
SYCE : Synaptonemal Complex Central Element Protein  
SYCP : Synaptonemal Complex Protein

## **T**

Tel1 : TELomere maintenance 1  
TERB1 : Telomere Repeat Binding Bouquet Formation Protein 1  
TEX : Testis Expressed  
TF : filaments transverses  
Topo III $\alpha$  : Topoisomerase III $\alpha$   
TopoVIB-Like : Topoisomerase VIB-Like  
TRF1 : Telomeric Repeat-binding Factor 1

## **U**

UV : rayonnement ultraviolet

## **W**

WRN : Werner syndrome RecQ like helicase

## **X**

XPA et XPG : Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A et G  
XRCC : X-ray repair cross complementing  
Xrs2 : X-Ray Sensitive 2

## **Y**

YTHDC2 : YTH Domain Containing 2

## **Z**

Zip : molecular ZIPper

53BP1 : P53-Binding Protein 1



# **Sommaire**



# Sommaire

<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>27</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>35</b>
<b>I. LA MÉIOSE</b>	<b>35</b>
I.1 Généralités	
I.2 La prophase I de méiose	37
I.3 Les cohésines et le complexe synaptonémal structurent l'architecture des chromosomes au cours de la prophase I de méiose	39
I.4 Les mouvements chromosomiques au cours de la prophase I de méiose	43
<b>II. LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE</b>	<b>45</b>
II.1 Généralités	45
II.2 Les étapes de la recombinaison homologue	46
II.2.1 Reconnaissance des CDBs de l'ADN	46
II.2.2 Prise en charge de la CDB de l'ADN par la machinerie de résection	48
II.2.3 Recherche et invasion d'un brin homologue intact	49
II.2.4 La régulation de l'invasion par la dissociation du filament RAD51	53
II.2.5 L'élimination de filaments RAD51 inactifs d'un point de vue catalytique	53
II.2.6 Régulation des intermédiaires post-synaptiques	54
II.2.7 La capture de la seconde extrémité de la CDB de l'ADN	55
II.2.8 Dissolution et résolution de la jonction double de Holliday	55
II.3 Les spécificités de la recombinaison homologue méiotique	57
II.3.1 La formation de CDBs programmées	58
II.3.2 La résection au cours de la recombinaison homologue méiotique	61
II.3.3 La recherche et l'invasion d'un brin homologue sur le chromosome homologue	63
II.3.4 La régulation des intermédiaires post-synaptiques en méiose	66
II.3.5 La résolution des intermédiaires de la recombinaison méiotique en crossing-over	70
<b>III. REPLICATION PROTEIN A (RPA) EST UN COMPLEXE ESSENTIEL AU MÉTABOLISME DE L'ADN</b>	<b>73</b>
III.1 Généralités sur RPA	73
III.1.1 Découverte de RPA	73
III.1.2 Conservation de RPA	73
III.1.3 Les différents rôles de RPA au cours du métabolisme de l'ADN	73
III.2 Les propriétés structurales et biochimiques de RPA	75
III.2.1 Structure de RPA	75

III.2.2	Activité de liaison à l'ADNsb de RPA	76
III.3	Régulation des fonctions de RPA par ses partenaires protéiques au cours de la recombinaison homologue	77
III.3.1	La protéine P53 inhibe la recombinaison homologue en inhibant l'interaction RPA-ADNsb via un mécanisme de mimétisme de l'ADNsb	78
III.3.2	La phosphorylation de RPA2 favoriserait le déplacement de RPA de l'ADNsb	78
III.3.3	Les recombinases RAD51 et DMC1 déplaceraient RPA en mimant l'ADNsb	79
III.3.4	La protéine BRCA2 et son partenaire DSS1 déplacent RPA en mimant l'ADNsb	79
III.3.5	La protéine RAD52 stabilise l'association de RPA avec l'ADNsb	80
III.3.6	Le complexe méiotique Mei5-Sae3 chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> promeut la polymérisation de DMC1 sur le filament RPA-ADNsb	80
<b>IV.</b>	<b>MEIOB ET SPATA22 SONT ESSENTIELLES À LA RECOMBINAISON MÉIOTIQUE</b>	<b>83</b>
IV.1	La découverte de MEIOB et SPATA22 chez la souris	83
IV.2	MEIOB et SPATA22 sont recrutées sur les intermédiaires de la recombinaison homologue méiotique	83
IV.3	MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la recombinaison homologue méiotique	84
IV.4	La stabilité et la localisation de MEIOB et SPATA22 sont interdépendantes	85
IV.5	MEIOB est une protéine capable de lier l'ADNsb avec une activité exonucléase putative	85
IV.6	MEIOB et SPATA22 interagissent avec RPA2	87
IV.7	MEIOB et SPATA22 sont des gènes conservés	87
IV.8	La drosophile possède un homologue de MEIOB : Hold'em (HDM)	88
IV.9	MEIOB et SPATA22 sont des antigènes du cancer	88
	<b>RÉSULTATS</b>	<b>93</b>
	<b>I. PRÉAMBULE</b>	<b>93</b>
	<b>II. ARTICLE 1 : REVUE SUR LA GESTION DE L'ADNsb PAR DES PROTÉINES HOMOLOGUES DE RPA AU COURS DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE MÉIOTIQUE</b>	<b>95</b>
	<b>III. ARTICLE 2 : LA CARACTÉRISATION DU COMPLEXE MEIOB-SPATA22 D'UN POINT DE VUE STRUCTUREL ET FONCTIONNEL</b>	<b>97</b>
III.1	SPATA22 est une protéine avec un domaine OB-fold putatif avec une potentielle activité de liaison à l'ADNsb	97
III.2	MEIOB et SPATA22 forment un complexe partageant des similitudes avec RPA d'un point de vue structurel et collaborent pour interagir avec RPA	98
III.3	MEIOB et SPATA22 collaborent pour être recrutées aux dommages à l'ADN associés à RPA	99
III.4	MEIOB-SPATA22 modifient la structure du filament RPA-ADNsb	100
III.5	La polymérisation de DMC1 est dérégulée en absence de MEIOB	101
III.6	BLM s'accumule sur les intermédiaires de recombinaison en absence de MEIOB	102
III.7	Résultats complémentaires : la caractérisation préliminaire d'un mutant ponctuel de MEIOB associé à des cas d'azoospermies humaines	104
	<b>INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES SUR LA MÉTHODOLOGIE</b>	<b>107</b>

## **DISCUSSION**

**111**

I. SPATA22 lie l'ADNsb	111
II. MEIOB et SPATA22 forment un complexe qui partage des similitudes structurelles avec RPA et collaborent pour interagir avec RPA	112
III. MEIOB et SPATA22 collaborent pour être recrutées aux dommages à l'ADN	114
IV. Les rôles potentiels de MEIOB-SPATA22 et de leur interaction avec RPA	114
V. Un autre rôle de l'interaction entre MEIOB/SPATA22 et RPA : la second-end capture ?	117
VI. La caractérisation plus approfondie du phénotype des souris <i>Meiob</i> <sup>-/-</sup>	118
VII. L'étude du rôle de MEIOB et SPATA22 chez <i>S.pombe</i>	118
VIII. Le rôle de l'activité de liaison à l'ADNsb de MEIOB	119
IX. La potentielle activité nucléase de MEIOB : mythe ou vérité ?	120
X. Ouverture sur des partenaires de MEIOB-SPATA22 autres que RPA	120
XI. Le rôle de MEIOB et SPATA22 dans les cellules cancéreuses	120
XII. Conclusion	121

## **BIBLIOGRAPHIE**

**125**



# **Table des figures**



## Table des figures

Figure 1 : Le cycle de reproduction	35
Figure 2 : Les étapes majeures de la méiose	37
Figure 3 : Les stades de la prophase I de méiose	39
Figure 4 : Représentation schématique des complexes cohésines et de leur rôle au cours de la première division méiotique	41
Figure 5 : Modèle de l'assemblage du complexe synaptonémal chez la souris	42
Figure 6 : Les mouvements chromosomiques au cours de la prophase I de méiose	44
Figure 7 : Modèle de la réparation des CDBs de l'ADN par la recombinaison homologue	47
Figure 8 : Modèles de la résection bi-directionnelle et de la gestion de la chromatine au cours de la résection	49
Figure 9 : Modèle de la formation du filament pré-synaptique et de l'invasion du brin homologue	52
Figure 10 : La dissolution ou la résolution de la jonction double de Holliday	57
Figure 11 : Modèle de la formation de la CDB en méiose	60
Figure 12 : Modèle de l'assemblage du filament pré-synaptique et de l'invasion du brin homologue en méiose principalement inspiré des données provenant des études chez <i>S.cerevisiae</i>	64
Figure 13 : Modèle de la régulation post-synaptique de la recombinaison homologue méiotique	69
Figure 14 : Modèle de la régulation de la formation des COs et des NCOs par HEI10 et RNF212 chez la souris	70
Figure 15 : La structure du complexe RPA	76
Figure 16 : La liaison de RPA à l'ADNsb	77
Figure 17: L'activité de RPA est régulée par ses partenaires au cours de la recombinaison homologue	81
Figure 18 : Modèle des rôles potentiels de MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique	86
Figure complémentaire 1 : Prédiction de la structure de Meu32 de <i>S.pombe</i>	96
Figure complémentaire 2 : Schéma récapitulatif des interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA	98
Figure complémentaire 3 : MEIOB interagit avec RPA en présence de SPATA22	99
Figure complémentaire 4 : MEIOB-SPATA22 condense le filament RPA-ADNsb	101
Figure complémentaire 5 : DMC1 forme des foyers filiformes extra-axiaux en absence de MEIOB-SPATA22	102
Figure complémentaire 6 : BLM s'accumule sur les chromosomes méiotiques quand DMC1 est éliminée de ces derniers	103
Figure complémentaire 7 : La mutation MEIOB N64I n'abolit pas la liaison à l'ADNsb de MEIOB	104
Figure 20 : Les potentiels résidus de RPA3 impliqués dans l'interaction avec MEIOB-SPATA22	113
Figure 21 : Rôles proposés de MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique	117



# **Avant-propos**



## Avant-propos

Un grand nombre de facteurs régissant les processus méiotiques ont été largement décrits, dans un premier temps, grâce à différents modèles de levures. La découverte récente de nouveaux acteurs méiotiques chez les modèles animaux et végétaux fournit une nouvelle opportunité d'approfondir notre compréhension de ces processus méiotiques. Ainsi, MEIOB (*Meiosis-specific with OB domain-containing protein*) et son partenaire SPATA22 (*Spermatogenesis-associated protein 22*) ont récemment été identifiés chez les mammifères. La caractérisation de ces facteurs conservés chez les métazoaires montre que MEIOB et SPATA22 sont essentiels à la fertilité en intervenant au cours de la recombinaison méiotique.

La recombinaison méiotique est un mécanisme essentiel à la reproduction sexuée chez la plupart des organismes eucaryotes. Cette dernière est assurée grâce à la collaboration de facteurs impliqués au cours de la recombinaison mitotique avec d'autres spécifiques de la méiose. La protéine MEIOB et son partenaire SPATA22 font partie de ces derniers facteurs. De manière intéressante, MEIOB est un paralogue d'une sous-unité du complexe RPA. RPA est un acteur clé de la recombinaison homologue à la fois en mitose et en méiose. La découverte de MEIOB soulève la question de l'avantage que peut conférer aux cellules la duplication d'une sous-unité de RPA. Pour son maintien au cours de l'évolution, la protéine MEIOB a probablement acquis des fonctions qui divergent de son complexe homologue. Quelles sont donc les fonctions de MEIOB au cours de la recombinaison méiotique qui le distinguent de RPA ? Afin d'apporter des éléments de réponse à cette question, ces travaux de thèse ont été dédiés à la compréhension des rôles de MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique.

En introduction de ce travail de thèse, nous commencerons par détailler les étapes moléculaires de la méiose et plus particulièrement la recombinaison homologue. Nous traiterons ensuite des rôles du complexe RPA afin de mieux appréhender plus tard une relation fonctionnelle entre MEIOB et RPA au cours de la recombinaison méiotique. Nous présenterons enfin l'état actuel des connaissances sur MEIOB et SPATA22. Cette introduction est centrée sur les modèles mammaliens qui ont servi au cours de ces travaux et s'appuie également sur des concepts empruntés à divers organismes, comme *Saccharomyces cerevisiae*, chez lesquels certains mécanismes ont été plus détaillés.



# **Introduction**

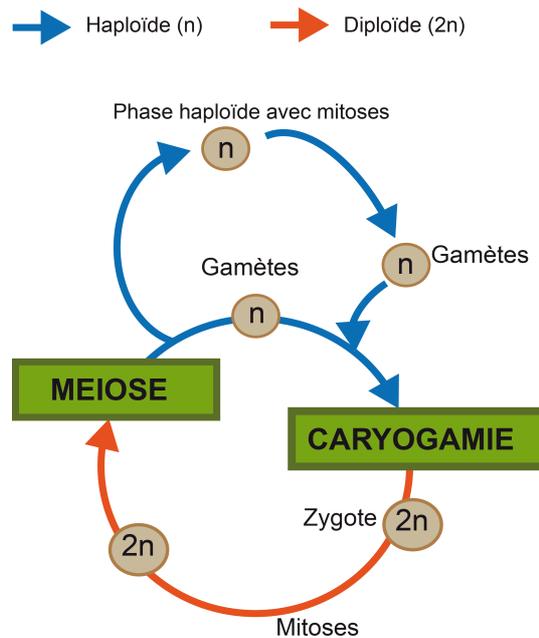


# Introduction

## I. La méiose

### I.1 Généralités

Les avancées de la microscopie au début du XIX<sup>e</sup> siècle ont permis de nombreuses découvertes en Biologie cellulaire. En 1883, Edouard Van Beneden menait une étude cytologique de la gamétogenèse chez le vers parasite de cheval *Ascaris megalocephala*. Il a observé que la ségrégation des chromosomes ne suivait pas le modèle mitotique au cours de l'ovogenèse. La découverte de la méiose fut ainsi attribuée à Edouard Van Beneden (Hamoir, 1992). La méiose est un processus largement conservé chez les eucaryotes. Le terme « méiose » a été emprunté au grec *meiōsis* qui signifie « amoindrissement, diminution ». La méiose consiste en deux divisions cellulaires successives précédées par une seule étape de réplication de l'ADN. Ces divisions divergent de la division mitotique en plusieurs points. La mitose consiste à former deux cellules filles au contenu génétique identique entre elles et identique à la cellule mère tandis que la méiose consiste en une réduction du contenu génétique de la cellule mère diploïde ( $2n$  chromosomes) pour générer des cellules haploïdes ( $n$  chromosomes) (**Figure 1**). Ces cellules haploïdes pourront fusionner ensuite pour donner un nouvel individu diploïde lors de la caryogamie.



### Figure 1 : Le cycle de reproduction

La méiose assure la réduction du contenu génétique d'une cellule diploïde ( $2n$ ) en gamètes ou spores ( $n$ ). Dans les modèles animaux, la méiose est suivie de la caryogamie alors que chez la plupart des champignons, comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, et des protistes qui peuvent avoir une phase haploïde dans leur cycle de vie, la méiose peut être suivie de mitoses avant la caryogamie.

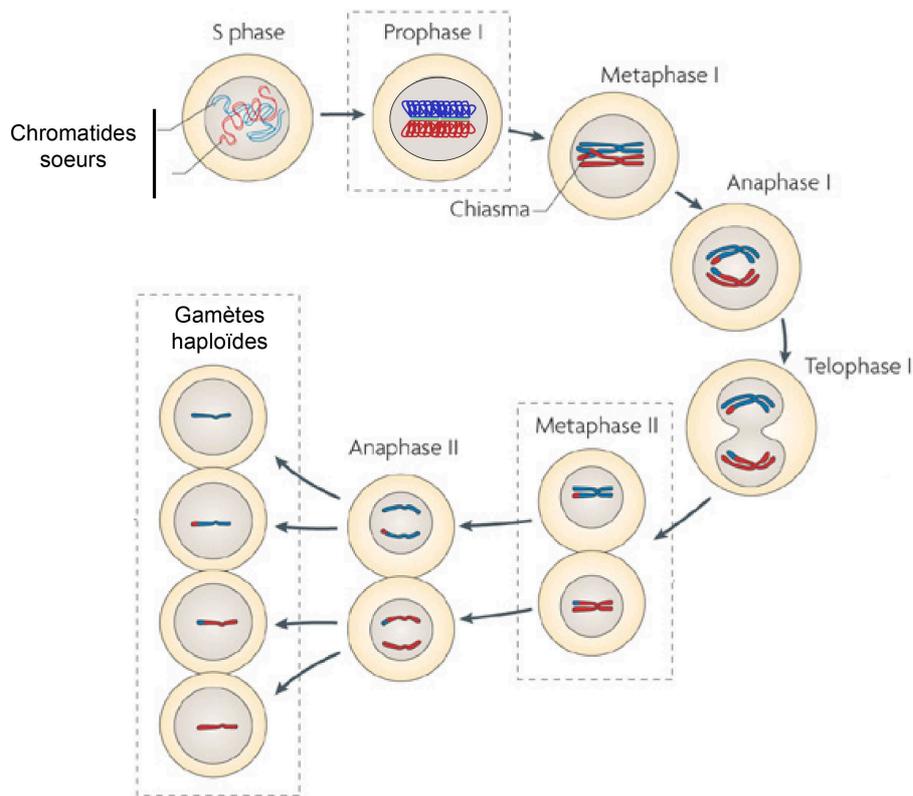
Au cours de la reproduction sexuée, un brassage génétique a lieu et ce brassage génère de la diversité génétique. Trois processus permettent ce brassage. D'une part, un brassage chromosomique a lieu au cours de la première division méiotique par la répartition aléatoire des chromosomes paternels et maternels (chromosomes homologues) entre les cellules filles. D'autre part, un brassage intra-chromosomique intervient au début de la première division méiotique suite à des échanges d'information génétique entre des

chromosomes homologues d'origine paternelle et maternelle. Enfin, la fusion de deux génomes haploïdes au cours de la caryogamie contribue aussi au brassage génétique. L'existence de ces brassages a été mise en évidence par les travaux sur le petit pois de Johann Gregor Mendel au XIX<sup>e</sup> siècle. Au début du XX<sup>e</sup> siècle, ses travaux furent re-découverts et Thomas Hunt Morgan conforta ces derniers avec ses études menées sur la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster* (Morgan, 1915). Les modèles végétaux ont ensuite permis de préciser les événements cytologiques qui ont lieu au cours des divisions méiotiques grâce à leurs larges chromosomes, facilement différenciables (Darlington, 1930; Newton and Darlington, 1929). Dès lors, les études portant sur les aspects moléculaires et génétiques de la méiose ont été menées en grande partie chez les champignons. L'étude de la ségrégation génique a notamment été extensivement étudiée chez les champignons à spores comme *Saccharomyces cerevisiae* ou à ascospores comme *Sordaria fimicola*. Les approches cytologiques et le développement de la transgénèse chez la souris ont permis d'élargir ces études aux mammifères. Dans la suite de ce chapitre, nous traiterons principalement des connaissances actuelles sur les modèles mammifères. La série d'événements cytologiques et moléculaires qui ont lieu au cours de la méiose comprend une étape de réplication de l'ADN suivie de deux divisions cellulaires.

La cellule diploïde initie la méiose par une étape de réplication de l'ADN (2n chromosomes, 2 chromatides)(pour revue (Handel and Schimenti, 2010)) (**Figure 2**). Cette étape de réplication de l'ADN est ensuite suivie par deux divisions cellulaires. Contrairement à la division mitotique qui ségrège les chromatides sœurs, la première division méiotique permet la ségrégation des chromosomes homologues entre les cellules filles (n chromosomes, 2 chromatides). La première division méiotique est ainsi appelée division réductionnelle. La seconde division méiotique consiste ensuite en la ségrégation des chromatides sœurs, à l'image de la division mitotique. À l'issue de cette division, les cellules haploïdes (n chromosomes, 1 chromatide) sont formées. Cette seconde division est qualifiée d'équationnelle.

La ségrégation des chromosomes homologues au cours de la première division méiotique est possible grâce à la mise en place d'un lien physique entre les chromosomes homologues, appelé chiasma (Handel and Schimenti, 2010)(**Figure 2**). Les chiasmata établissent une cohésion entre les paires de chromosomes homologues importante pour la formation de la plaque métaphasique jusqu'à l'entrée en anaphase I. De plus et contrairement à la division mitotique, les kinétochores des chromatides sœurs qui permettent leur attachement au fuseau de microtubules sont mono-orientés au cours de la première division méiotique (Touati and Wassmann, 2016). Cette orientation des kinétochores et les chiasmata permettent la formation de la plaque métaphasique et la migration des paires de chromatides sœurs vers un même pôle de la cellule. Au cours de la seconde division méiotique, les kinétochores sont cette fois bi-orientés comme lors d'une division mitotique. Cette bi-orientation des kinétochores permet la ségrégation des chromatides sœurs au cours de la seconde division méiotique.

Les chiasmata sont essentiels à la ségrégation des chromosomes homologues au cours de la méiose. Ces derniers sont formés au cours de la prophase I de méiose. Des événements cruciaux pour la formation des chiasmata essentiels à la bonne ségrégation des chromosomes homologues et pour la mixité génétique des cellules filles haploïdes interviennent lors de cette étape. La suite de ce manuscrit portera alors essentiellement sur la prophase I de méiose.



**Figure 2 : Les étapes majeures de la méiose**

La méiose consiste en deux divisions successives sans réplication intermédiaire de l'ADN. Dans un premier temps, la cellule diploïde réplique son ADN ( $2n, 2c$ ) puis commence les divisions méiotiques. La première division méiotique (méiose I) assure la ségrégation des chromosomes homologues qui sont répartis entre les cellules filles ( $1n, 2c$ ). Au cours de la prophase I, des liens physiques entre chromosomes homologues appelés chiasmata se mettent en place. Ils permettent la ségrégation équitable des chromosomes homologues. La seconde division méiotique assure la ségrégation des chromatides sœurs et aboutit à la formation des gamètes haploïdes ( $1n, 1c$ ) (schéma adapté de (Handel and Schimenti, 2010)).

## I.2 La prophase I de méiose

Après la découverte de la méiose par Edouard Van Beneden en 1883, ses collaborateurs, Hans von Winiwarter et George Saintmont décrivent, entre 1901 et 1909, les changements précoces qui ont lieu dans l'architecture nucléaire de l'ovocyte de mammifères (pour revue (Hamoir, 1992)). Ces travaux ont posé les bases du modèle actuel des différentes étapes de la prophase I de méiose chez les eucaryotes. Ces étapes cytologiques sont visibles en coupes histologiques et sont caractérisées par des niveaux différents de condensation et d'organisation des chromosomes (**Figure 3A**). Les différents noms de ces étapes sont issus du grec et sont les suivants : le stade leptotène (*leptos*, mince et *tenein*, étirer), suivit du stade zygotène (*zygon*, paire) et du stade pachytène (*packhus*, épais) et enfin, le stade diplotène (*diploos*, double). La diacinèse (*dia*, séparation et *kinesis*, mouvement) est l'étape qui conclut la prophase I de méiose et marque la transition avec la métaphase.

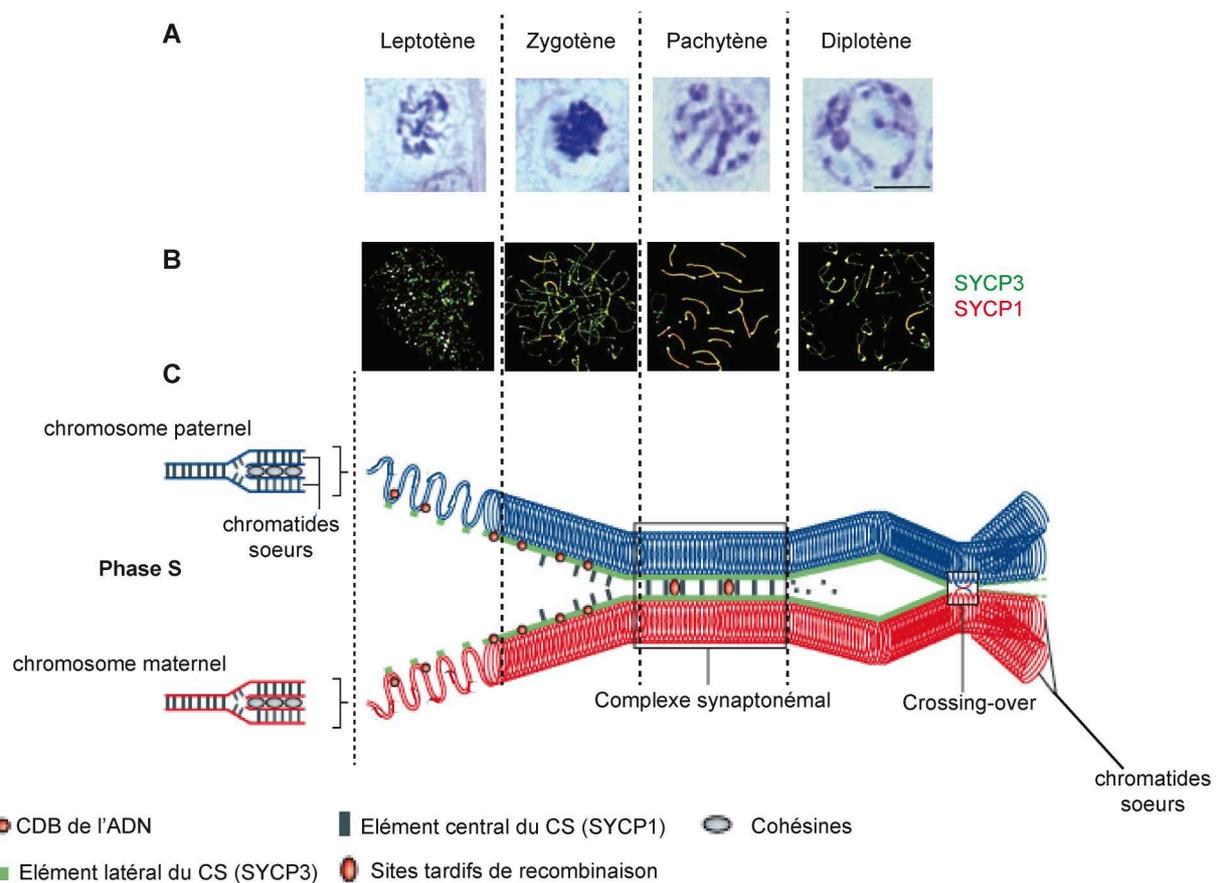
La prophase I de méiose commence après une phase de réplication de l'ADN ou phase S dite pré-leptotène. Au cours de cette phase S, les chromatides sœurs sont répliqués et restent liés par des cohésines dont certaines sont spécifiques de la méiose (Watanabe and Nurse, 1999) (**Figures 3C et 4**). De plus, la phase

S pré-leptotène est essentielle à la préparation d'événements en aval comme la recombinaison homologue méiotique ou la ségrégation des chromosomes homologues. En effet, le blocage chimique ou génétique de la phase S chez *S.cerevisiae* ou l'initiation de la prophase I de méiose sans passer par cette phase S chez *Schizosaccharomyces pombe* perturbe le déroulement de la recombinaison homologue et la ségrégation des chromosomes homologues au cours de la méiose (Borde et al., 2000; Budd et al., 1989; Schild and Byers, 1978; Simchen et al., 1976; Watanabe et al., 2001).

Suite à la phase S pré-leptotène, les cellules méiotiques entrent en leptotène. Au cours de ce stade, des cassures double brin (CDB) de l'ADN commencent à se former (Burgoyne et al., 2009; Hunter, 2015) (**Figure 3C**). La formation de ces CDBs amorce le processus de réparation des CDBs par échange de séquences nucléotidiques, la recombinaison homologue, au cours duquel une séquence homologue au brin d'ADN lésé est recherchée (Hunter, 2015). Cette recherche d'homologie permet ensuite la réparation du brin lésé par recombinaison homologue. Au cours du stade zygotène, les CDBs de l'ADN sont prises en charge pour être réparées. Puis au cours du stade pachytène, les événements tardifs de la réparation des CDBs de l'ADN ont lieu avec notamment la formation d'un produit de cette réparation qui est le crossing-over (CO). Les COs sont des échanges réciproques d'information génétique entre chromosomes homologues et sont à l'origine des chiasmata, observables cytologiquement entre deux chromosomes homologues.

En parallèle de la recombinaison méiotique, une structure protéique se met en place tout le long des chromosomes : le complexe synaptonémal (CS) (Bolcun-Filas and Schimenti, 2012)(**Figure 3B et C**). Le complexe synaptonémal garantit une cohésion stable entre les chromosomes homologues au cours de la prophase I de méiose. Le complexe synaptonémal est composé des éléments latéraux chargés entre les paires de chromatides sœurs et de l'élément central chargé entre les chromosomes homologues. Les éléments latéraux commencent à se mettre en place au cours du stade leptotène puis s'étendent tout au long des chromosomes (Burgoyne et al., 2009; Hunter, 2015)(**Figure 3B et C**). La chromatine présente une configuration en boucles formée tout au long des axes chromosomiques. Au cours du stade zygotène, les chromosomes homologues s'apparient et les éléments latéraux du CS sont entièrement chargés sur les chromosomes. En parallèle, les éléments dits « centraux » du CS commencent à se charger entre les éléments latéraux du CS (**Figure 3B et C**). Nous commençons alors à parler de synapse des chromosomes homologues. Au stade pachytène, les chromosomes homologues sont totalement appariés et les éléments centraux du CS sont entièrement chargés. La synapse est alors complète. Enfin, au stade diplotène, les éléments centraux du CS sont dissous et les chromosomes bivalents se séparent mais restent connectés au niveau des chiasmata. En diacinèse, le CS a presque complètement été dissous.

Lors de la formation de COs par recombinaison homologue méiotique et de la formation du CS, les chromosomes méiotiques sont en mouvement. Ces mouvements faciliteraient l'appariement des chromosomes homologues et la recombinaison entre ces derniers au cours de la prophase I de méiose (Shibuya and Watanabe, 2014). Ces mouvements sont permis grâce à l'ancrage des télomères à l'enveloppe nucléaire. Cet ancrage permet la transmission de mouvements cytosquelettiques aux chromosomes au cours de la prophase I de méiose (Shibuya and Watanabe, 2014).



**Figure 3 : Les stades de la prophase I de méiose**

(A) Images de cellules germinales mâles murines colorées à l'hématoxyline/éosine et acquises en microscopie photonique (adapté de (Souquet et al., 2013)). (B) Immunomarquages de SYCP1 et SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 1* et 3) sur des étalements de chromosomes méiotiques murins (adapté de (Hunter, 2015)). (C) Schéma résumant les événements moléculaires marquants qui ont lieu au cours de la prophase I de méiose. Après la réplication de l'ADN, des CDBs de l'ADN sont formées de manière programmée sur les chromosomes méiotiques qui commencent aussi leur condensation. Les chromosomes homologues synapsent ensuite et les CDBs sont réparées par recombinaison homologue. Certains intermédiaires de recombinaison sont convertis en COs (adapté de (Burgoyne et al., 2009)).

### I.3 Les cohésines et le complexe synaptonémal structurent l'architecture des chromosomes au cours de la prophase I de méiose

Le CS fait partie des acteurs, avec les cohésines, régissant l'architecture de la chromatine méiotique. La recombinaison méiotique intervient dans la réparation des CDBs méiotiques au sein de cette architecture de la chromatine. La recombinaison méiotique est donc susceptible d'être influencée par le CS et les cohésines. Nous présenterons dans la suite comment ces éléments structuraux des chromosomes méiotiques s'organisent et comment ces éléments peuvent garantir la progression de la recombinaison homologue méiotique.

- Les cohésines

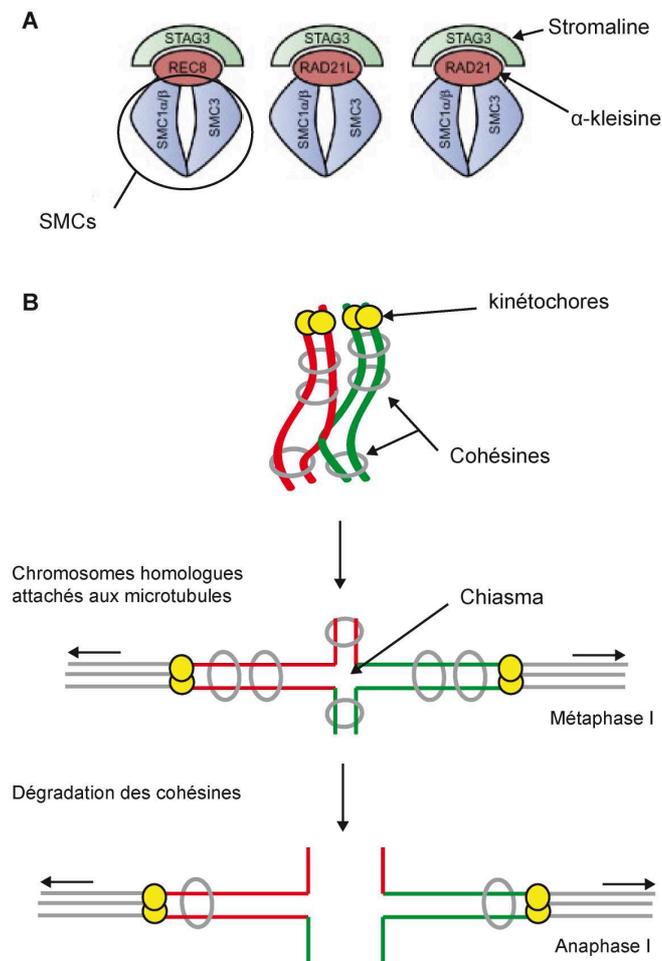
Les cohésines sont organisées sous la forme d'un complexe composé de quatre sous-unités : deux SMC (*Structural Maintenance Chromosome*) qui constituent un hétérodimère, (1) et (2), formant un anneau

enserrant les chromatides sœurs, (3) une  $\alpha$ -kleisine et (4) une stromaline maintenant l'anneau fermé (Nasmyth and Haering, 2009)(**Figure 4A**). En méiose, chez les mammifères, ces quatre sous-unités sont respectivement (1) SMC1 $\alpha$  ou  $\beta$ , (2) SMC3 (*Structural Maintenance Chromosome 1 $\alpha$ ,  $\beta$  et 3*), (3) RAD21 ou RAD21-L (*RADiation sensitive 21-Like*) ou REC8 (RECombination 8), et enfin (4) STAG3 (*Stromal Antigen 3*)(Bolcun-Filas and Schimenti, 2012). Différents types de complexes cohésines peuvent donc se former à partir de ces protéines (**Figure 4A**).

Les cohésines sont chargées sur les chromatides sœurs pendant la phase S pré-leptotène et permettent de maintenir les chromatides sœurs entre elles (Brooker and Berkowitz, 2014; Watanabe and Nurse, 1999). Cette cohésion entre les chromatides sœurs assurée par les cohésines est essentielle à la ségrégation des chromosomes homologues puis des chromatides sœurs au cours des divisions méiotiques (Brooker and Berkowitz, 2014). En effet, lors de la formation d'un CO, les chromosomes homologues échangent des bras chromosomiques tandis que les chromatides sœurs de ces bras chromosomiques restent connectées grâce aux cohésines (**Figure 4B**)(Touati and Wassmann, 2016). Au cours de la transition métaphase I - anaphase I, les cohésines localisées hors des régions centromériques et péri-centromériques sont clivées permettant ainsi la ségrégation des chromosomes homologues (Touati and Wassmann, 2016)(**Figure 4B**). Les cohésines restantes maintiendront la cohésion entre les chromatides sœurs jusqu'en anaphase II.

Les cohésines sont non seulement nécessaires au cours de la progression méiotique mais aussi à la formation du complexe synaptonémal (CS) et à l'organisation de la chromatine méiotique. En effet, l'invalidation des cohésines méiotiques induit la formation d'un CS plus court ou fragmenté et une augmentation de l'extension de la chromatine autour des axes chromosomiques chez la souris (Bannister et al., 2004; Caburet et al., 2014; Fukuda et al., 2014; Herrán et al., 2011; Hopkins et al., 2014; Revenkova et al., 2004; Winters et al., 2014). Ces résultats supportent un modèle dans lequel les cohésines organisent la chromatine méiotique en boucles et permettent la formation du CS(**Figure 5**) (Hopkins et al., 2014). Dans ce modèle, les cohésines capturent des régions distantes sur la chromatine, ce qui permet une organisation en boucles de cette dernière. Cette organisation permet ensuite l'extension de l'axe du CS qui se forme entre les boucles de chromatine.

Enfin, il a été montré que les cohésines sont également importantes pour la progression de la recombinaison méiotique. En effet, l'invalidation des cohésines méiotiques dans le modèle murin conduit à des problèmes de recombinaison méiotique illustrés par un défaut de réparation des CDBs méiotiques (Bannister et al., 2004; Caburet et al., 2014; Fukuda et al., 2014; Herrán et al., 2011; Hopkins et al., 2014; Revenkova et al., 2004; Winters et al., 2014). Cependant, le rôle précis des cohésines au cours de la recombinaison méiotique reste encore à définir. Les cohésines pourraient participer au recrutement d'acteurs de la recombinaison homologue sur les chromosomes méiotiques, ce qui permettrait par conséquent la réparation des CDBs méiotiques par recombinaison homologue.



**Figure 4 : Représentation schématique des complexes cohésines et de leur rôle au cours de la première division méiotique**

(A) Schéma représentant les complexes cohésines formés spécifiquement en méiose (adapté de (Bolcun-Filas and Schimenti, 2012)). (B) Les cohésines et les chiasmata maintiennent les chromosomes homologues en métaphase I. Les COs et les cohésines restées sur les bras chromosomiques permettent ainsi de maintenir une connexion entre les chromosomes homologues. Ainsi, lorsque les chromosomes homologues seront reliés au fuseau de microtubules en métaphase I, une tension pourra être appliquée entre les chromosomes homologues. Par conséquent, une plaque métaphasique pourra se former et activer la transition vers l'anaphase. Les cohésines sont ensuite dégradées sur les bras chromosomiques pour permettre l'anaphase I. Les cohésines sur les régions centromériques maintiennent les chromatides sœurs entre elles jusqu'en anaphase II.

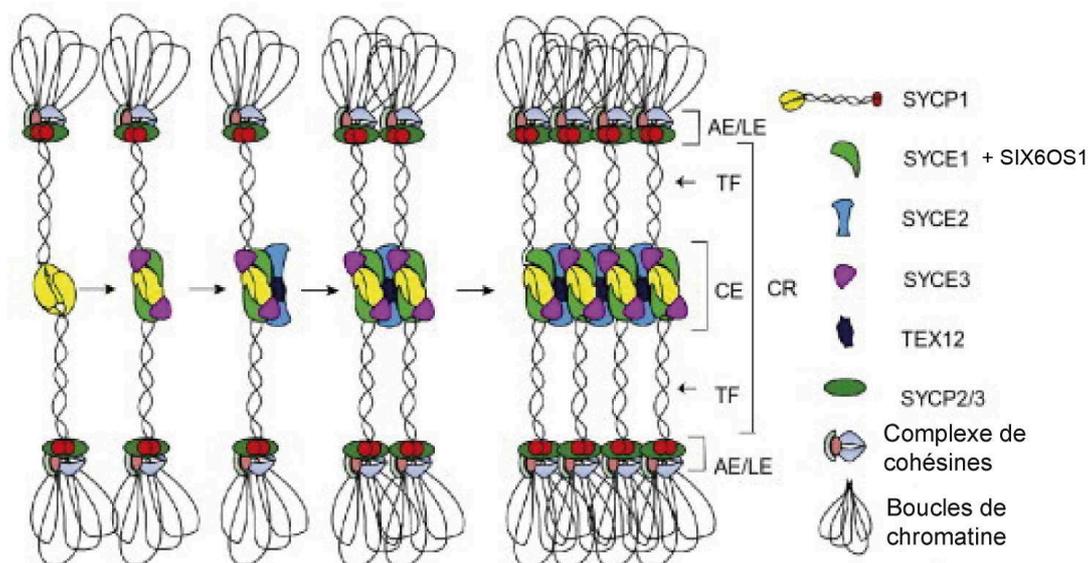
- Le complexe synaptonémal

Premièrement décrit suite aux observations de meiocytes de vertébrés et d'écrevisses faites par Fawcett et Moses en 1956 (Fawcett, 1956; Moses, 1956), le complexe synaptonémal (CS) est une très large structure protéique globalement conservée chez les eucaryotes (Fraune et al., 2012a). Chez la souris, il est composé dans un premier temps par les éléments latéraux SYCP2 et SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein 2 et 3*) (Fraune et al., 2012b). Chez la levure *S.cerevisiae*, les éléments latéraux sont composés par Hop1 (*HOmolog Pairing 1*) et Red1 (*REDuctional division 1*) (Hollingsworth et al., 1990; Smith and Roeder, 1997). Ensuite, six protéines ont été caractérisées à ce jour comme composant l'élément central du CS chez

la souris. Ces protéines sont SYCP1 (*Synaptonemal Complex Protein 1*), SYCE1, 2 et 3 (*Synaptonemal Complex Central Element Protein 1, 2 et 3*), TEX12 (*Testis Expressed 12*) et SIX6OS1 (*SIX6 Opposite Strand transcript 1*) (Fraune et al., 2012b; Gómez-H et al., 2016) (**Figure 5**). Chez la levure *S.cerevisiae*, Zip1 (*molecular ZIPper 1*) est l'homologue de SYCP1 (Sym et al., 1993).

L'assemblage du CS au cours de la prophase I de méiose a pu être étudié chez la souris par des approches génétiques et l'étude des interactions protéines-protéines. Ainsi, il a été montré que les protéines de l'élément central du CS, SYCP1, SYCE1, SYCE3 et SIX6OS1 forment un premier complexe et que TEX12 et SYCE2 en forment un second (Fraune et al., 2012b; Gómez-H et al., 2016). Ces études ont permis d'établir un modèle de la formation du CS chez la souris, dans lequel SYCP2 et 3 se chargent sur les axes latéraux et permettent le chargement de SYCP1, associé à SYCE1, SYCE3 et SIX6OS1 pour former des sites d'initiation de la synapse (**Figure 5**). Puis, TEX12 et SYCE2 permettent la propagation de la synapse en interagissant avec les filaments SYCP1.

Le CS est nécessaire à la progression de la recombinaison homologue méiotique (Fraune et al., 2012b; Page and Hawley, 2004). Le rôle des éléments du CS a d'abord été caractérisé chez la levure *S.cerevisiae* puis confirmé chez le modèle murin grâce à l'étude de souris déficientes pour les différents éléments du CS (Fraune et al., 2012b; Page and Hawley, 2004). Ainsi, il a été montré chez la souris que l'absence de SYCP3, SYCP1 ou la troncation de SYCP2 conduit à des problèmes au cours de la recombinaison homologue méiotique illustrés par un défaut de la réparation des CDBs méiotiques (Vries et al., 2005; Yang et al., 2006; Yuan et al., 2000). Ces résultats montrent l'importance du CS pour la progression de la recombinaison homologue méiotique. Il est aussi intéressant de noter qu'en cas d'absence complète de recombinaison méiotique, comme chez les souris *Spo11<sup>-/-</sup>* (*SPOrulation 11*), le CS ne se forme pas complètement (Baudat et al., 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000). Ces observations suggèrent une inter-dépendance de la recombinaison homologue et de la formation du CS.



**Figure 5 : Modèle de l'assemblage du complexe synaptonémal chez la souris**

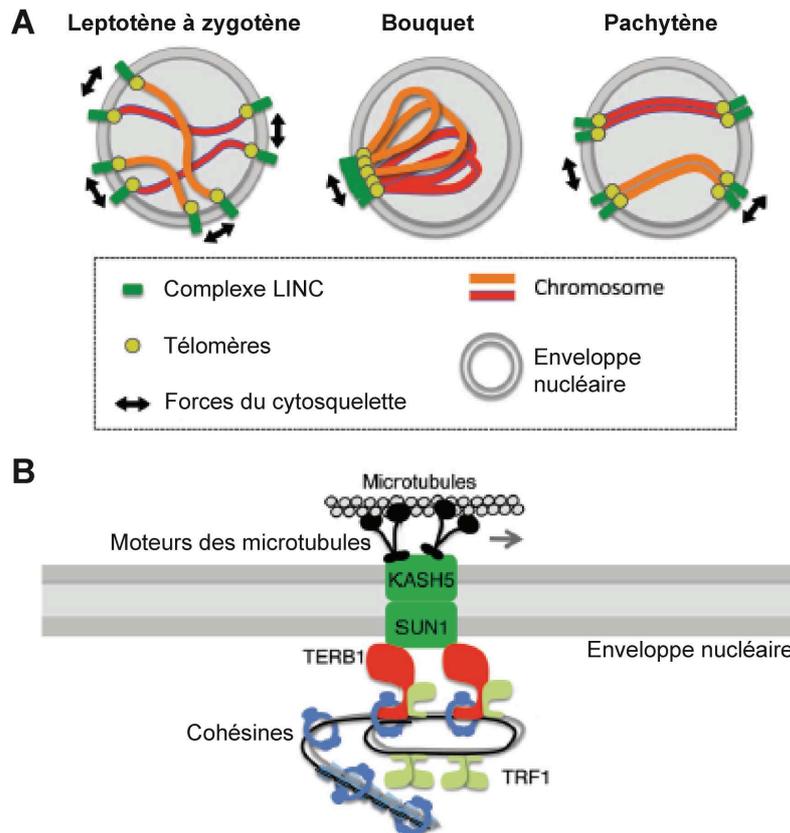
Les dimères de SYCP1 s'associent entre les axes des chromosomes formés par SYCP2/3. SYCE1/3 et SIX6OS1 stabilisent les filaments transverses (TF) de SYCP1. Ces interactions initient la synapse. TEX12 et SYCE2 permettent ensuite la propagation de la synapse en permettant des interactions entre les filaments transverses, formant ainsi l'élément central (CE) du complexe synaptonémal. AE/LE : éléments latéraux/ éléments axiaux, CR : région centrale (schéma adapté de (Bolcun-Filas and Schimenti, 2012)).

#### I.4 Les mouvements chromosomiques au cours de la prophase I de méiose

L'étude cytologique de la méiose chez la salamandre menée par Eisen en 1900 a permis de décrire pour la première fois le regroupement des chromosomes au cours de la prophase I (Eisen, 1900). Cette organisation des chromosomes méiotiques rappela la forme d'un bouquet floral à Eisen. Il donna alors le nom « bouquet » à cette organisation chromosomique (Eisen, 1900). Le bouquet est dû à un regroupement transitoire des télomères au niveau de l'enveloppe nucléaire (Scherthan, 2001). Les télomères sont ancrés à l'enveloppe nucléaire grâce au complexe LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) qui transmet aux chromosomes des forces cytosquelettiques à l'origine de mouvements chromosomiques et de la formation du bouquet chez la levure et la souris (Shibuya and Watanabe, 2014) (**Figure 6A**). Ces mouvements faciliteraient l'appariement et la recombinaison entre les chromosomes homologues (Shibuya and Watanabe, 2014).

Le complexe LINC fait le lien entre les télomères et les microtubules du cytosquelette au cours de la prophase I de méiose (Shibuya and Watanabe, 2014) Les éléments de ce complexe et leur rôle ont originellement été décrits chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Chez *S.pombe*, le complexe LINC est composé de la protéine à domaine SUN (*Sad1p*, *UNC-84*), *Sad1* (*Spindle pole body-associated protein sad1*), située dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire et d'une protéine à domaine KASH (*Klarsicht*, *ANC-1*, *Syne Homology*), *Kms1* ou *2* (*Karyogamy meiotic segregation protein 1 et 2*), localisée dans la membrane externe (Chikashige et al., 2006; Yoshida et al., 2013). Chez la souris, les homologues fonctionnels de *Sad1* et *Kms1* ou *2* sont respectivement *SUN1* et *KASH5* (Ding et al., 2007; Horn et al., 2013; Morimoto et al., 2012)(**Figure 6B**). L'absence de *SUN1* ou *KASH5* chez la souris induit un défaut de réparation des CDBs méiotiques (Ding et al., 2007; Horn et al., 2013). De plus, les COs ne sont pas formés en absence de *SUN1* (Ding et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'attachement des chromosomes à l'enveloppe nucléaire puis la transmission de mouvements cytosquelettiques aux chromosomes grâce à cet attachement sont essentiels à la recombinaison méiotique et à la formation des COs (Ding et al., 2007; Horn et al., 2013).

Le complexe LINC transmet des forces cytoplasmiques aux chromosomes méiotiques mais comment les chromosomes s'ancrent à LINC ? L'ancrage des télomères au complexe LINC serait assuré par la protéine *TERB1* (*Telomere Repeat Binding Bouquet Formation Protein 1*) chez la souris. La protéine *TERB1* est spécifique de la méiose et interagit avec la protéine télomérique *TRF1* (*Telomeric Repeat-binding Factor 1*) (Shibuya et al., 2014). *TERB1* est localisée au niveau des télomères et permet l'ancrage de ces derniers à l'enveloppe nucléaire (Daniel et al., 2014; Shibuya et al., 2014). De plus, *TERB1* interagit avec *SUN1* et permet l'accumulation du complexe LINC aux télomères (Shibuya et al., 2014). L'ensemble de ces résultats suggère que *TERB1* fait le lien entre les télomères et le complexe LINC au cours de la prophase I de méiose chez la souris (Shibuya et al., 2014)(**Figure 6B**). Enfin, *TERB1* est essentielle à la réparation des CDBs méiotiques et à la formation des COs (Shibuya et al., 2014). Ces résultats confirment que l'attachement des chromosomes à l'enveloppe nucléaire puis la transmission de mouvements cytosquelettiques aux chromosomes grâce à cet attachement sont essentiels à la recombinaison méiotique et à la formation des COs méiotiques chez la souris (Shibuya et al., 2014).



**Figure 6 : Les mouvements chromosomiques au cours de la prophase I de méiose**

(A) Au stade leptotène, les télomères s’attachent à l’enveloppe nucléaire grâce au complexe LINC. Le complexe LINC est lié au cytosquelette à l’extérieur du noyau. Il transmet ainsi les mouvements du cytosquelette aux chromosomes méiotiques au cours des stades leptotène, zygotène, le stade du bouquet et le stade pachytène. (B) Modèle de l’ancrage des télomères au complexe LINC chez les mammifères (schéma adapté de (Shibuya and Watanabe, 2014)).

La ségrégation des chromosomes homologues au cours de la première division méiotique dépend de la formation des COs entre chromosomes homologues. Ces COs sont formés grâce à la recombinaison homologue méiotique. Nous avons pu voir que la recombinaison méiotique est dépendante (1) de l’architecture du chromosome de prophase I de méiose imposée par les cohésines méiotiques et le CS et (2) des mouvements chromosomiques qui ont lieu au cours de la prophase I de méiose. Dans le chapitre qui va suivre, nous traiterons en détail les événements qui caractérisent la recombinaison homologue et nous verrons comment les spécificités de la recombinaison homologue méiotique permettent de former les COs essentiels à la ségrégation des chromosomes homologues au cours des divisions méiotiques.

## II. La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est un processus très conservé entre les espèces eucaryotes (Kowalczykowski, 2015). La majorité de nos connaissances provient des modèles levures, comme *Saccharomyces cerevisiae*, qui sont facilement manipulables génétiquement. Les connaissances génétiques et moléculaires acquises grâce aux modèles levures ont permis d'établir un modèle de la recombinaison homologue. Les acteurs de la recombinaison homologue et leurs rôles sont largement conservés chez les mammifères, ce qui suggère une conservation des mécanismes de recombinaison homologue de la levure aux mammifères. La réparation des CDBs par la recombinaison méiotique emprunte les grandes étapes de la recombinaison homologue en mitose. Cependant, la recombinaison méiotique présente en plus des spécificités qui lui sont propres et qui garantissent la formation des COs essentiels à la bonne ségrégation des chromosomes homologues. Dans le but de faciliter la compréhension de la recombinaison méiotique, nous traiterons dans un premier temps des connaissances actuelles sur les bases de la recombinaison homologue mitotique chez les modèles mammifères et les modèles levures. Nous définirons dans une seconde partie les spécificités de la recombinaison homologue méiotique dans ces modèles.

### II.1 Généralités

Dans une cellule, les molécules d'ADN peuvent être endommagées par un stress exogène ou endogène. Ces dommages peuvent être une modification de bases de l'ADN, la formation de liaisons covalentes entre les bases, la formation d'adduits à l'ADN et la cassure simple ou double brin de l'ADN (Dexheimer, 2013). Les CDBs peuvent provenir d'un stress endogène ou environnemental comme une exposition à un agent chimique ou physique (Aguilera and Gaillard, 2014; Mehta and Haber, 2014). Les CDBs peuvent aussi provenir d'une collision d'une fourche de réplication ou de la machinerie de la transcription sur un ADN endommagé (Aguilera and Gaillard, 2014; Mehta and Haber, 2014). Cependant, dans certains cas comme lors de la recombinaison méiotique, de la recombinaison V(D)J ou de la commutation isotypique, les CDBs de l'ADN peuvent être programmées et formées par réaction enzymatique (Alt et al., 2013; Baudat et al., 2013; Stavnezer et al., 2008). Pour maintenir l'intégrité de leur génome, les cellules, des procaryotes aux eucaryotes, ont développé divers systèmes de réparation adaptés à un ou plusieurs types de dommages à l'ADN.

Les CDBs de l'ADN sont létales si elles ne sont pas réparées (Ceccaldi et al., 2016). La cellule eucaryote peut employer deux systèmes de réparation des CDBs de l'ADN : la jonction d'extrémités cassées ou la réparation par utilisation d'une séquence d'ADN homologue non lésée (Ceccaldi et al., 2016). Parmi la première catégorie, nous pouvons trouver le NHEJ (en anglais *Non-Homologous End-Joining* ou NHEJ). La seconde catégorie de mécanismes de réparation des CDBs est illustrée par la recombinaison homologue. Le choix du type de réparation de la CDB est principalement régulé en fonction du cycle cellulaire. Ainsi, au cours du cycle mitotique, le NHEJ intervient au cours des phases G1 et G2 tandis que la recombinaison homologue intervient principalement au cours de la réplication et en G2, lorsque qu'une séquence homologue de l'ADN lésé est disponible sur la chromatide soeur (Karanam et al., 2012; Mathiasen and Lisby, 2014).

La recombinaison homologue intervient dans des contextes particuliers. Elle permet en phase S de réparer une CDB formée suite à la collapse d'une fourche de réplication ou suite au passage de la fourche sur

une portion (ou tract) d'ADN simple brin (Costes and Lambert, 2013). Cependant, la recombinaison homologue peut aussi intervenir dans d'autres contextes : dans la réparation de tracts d'ADN simple brin formés suite à l'arrêt d'une fourche de réplication; dans l'allongement des télomères chez *S.cerevisiae* et dans les cellules cancéreuses (mécanisme appelé *Alternative Lengthening of Telomeres*, ALT, dans les cellules cancéreuses); dans la formation des COs au cours de la prophase I de méiose et lors du changement de signe sexuel chez les champignons comme *S.cerevisiae* (Baudat et al., 2013; Cesare and Reddel, 2010; Costes and Lambert, 2013; Haber, 2012; Yamada-inagawa et al., 2007).

Après sa formation, une CDB de l'ADN est signalée par des protéines capables de détecter les CDBs de l'ADN (Maréchal and Zou, 2013a). A ce moment, la CDB peut être réparée par le NHEJ. Si la CDB n'est pas réparée par le NHEJ, le recrutement d'une machinerie va permettre une dégradation de l'ADN dans le sens 5'>3' afin de générer un ADN simple brin (ADNsb) avec une extrémité 3' de part et d'autre de la CDB (Kowalczykowski, 2015)(**Figure 7**). Cette étape est appelée la résection. L'ADNsb va être couvert par des protéines de liaison à l'ADNsb pour le protéger. Des protéines dites « recombinases » se chargent ensuite sur l'ADNsb et vont catalyser la recherche d'un brin d'ADN homologue. Cette recherche d'homologie conduit à l'envahissement d'un brin intact par le brin lésé (**Figure 7**). A cette étape, l'intermédiaire de la recombinaison homologue est appelé « D-loop » (*Displacement loop*) en référence au brin d'ADN déplacé au cours de l'invasion du brin intact. L'hybridation du brin lésé sur le brin intact va initier la synthèse d'ADN (**Figure 7**). A partir de cette étape, la D-loop peut être démantelée (1) ou maintenue (2). (1) Si la D-loop est démantelée, le brin d'ADN lésé peut s'hybrider à l'autre extrémité de la CDB grâce au court tract d'ADN néo-synthétisé. Suite à cette hybridation, les tracts d'ADNsb restants sont réparés par synthèse d'ADN pour former un noncrossing-over (NCO) (**Figure 7**). Cette voie de la recombinaison homologue est appelée le SDSA (*Synthesis-Dependent Strand Annealing*). Le NCO formé dans ce cas est un produit de réparation de l'ADN par recombinaison homologue sans échange réciproque d'ADN. (2) Si la D-loop n'est pas démantelée, la synthèse d'ADN dans la D-loop peut continuer. L'autre extrémité de la CDB de l'ADN s'hybride alors sur l'ADNsb généré lors de la formation de la D-loop. Cette étape est appelée « *second-end capture* » (**Figure 7**). Dès lors, une nouvelle synthèse d'ADN commence à partir de la second extrémité de la CDB. Les extrémités des brins néo-synthétisés sont ensuite ligaturés aux extrémités 5' de la CDB de l'ADN pour former la jonction double de Holliday (**Figure 7**). Cette jonction peut être ensuite dissoute par l'action combinée d'une hélicase et d'une topoisomérase pour former un NCO ou résolue de manière nucléolytique pour former un CO ou un NCO (**Figure 7**).

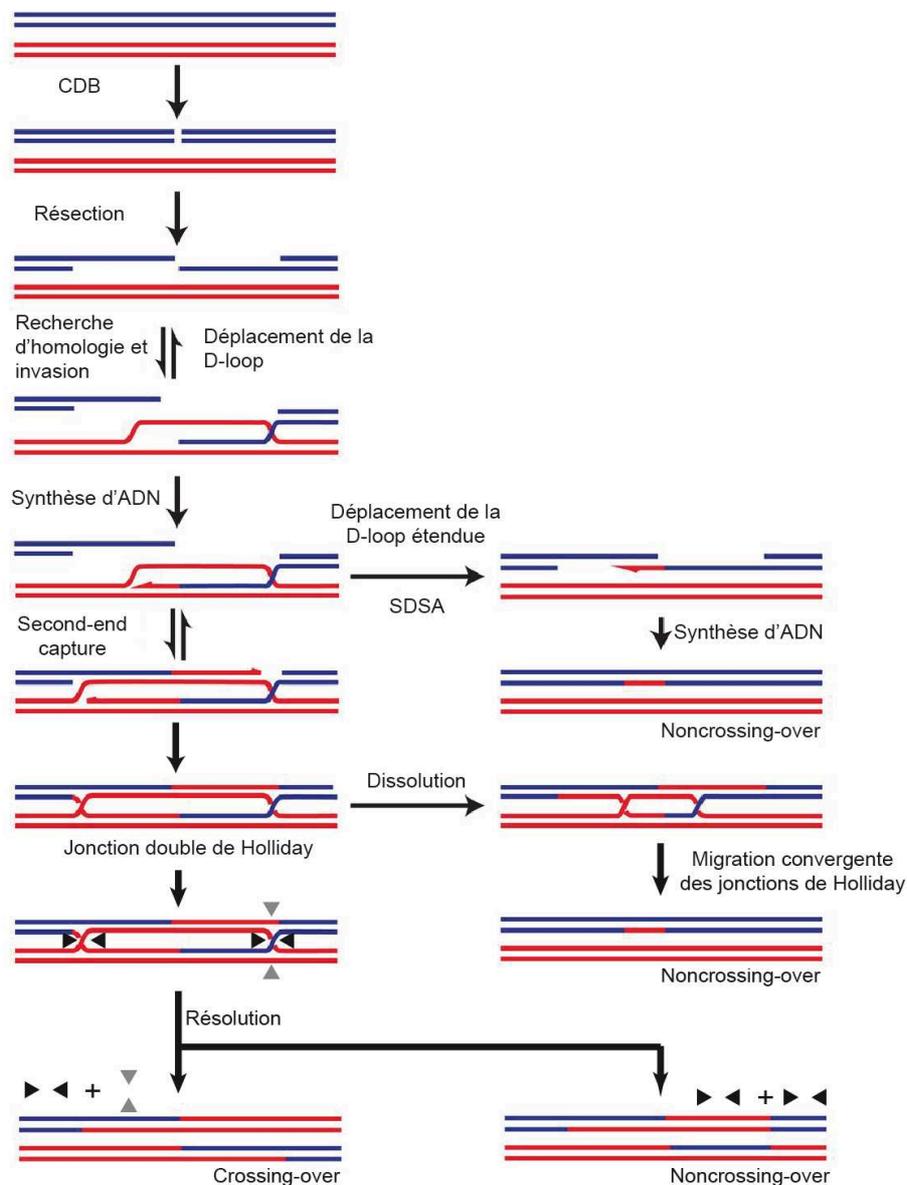
## II.2 Les étapes de la recombinaison homologue

Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons les événements qui ont lieu au cours de la recombinaison mitotique ainsi que les acteurs intervenant lors de ces étapes. Dans le but de distinguer les protéines ou gènes mammaliens de leurs homologues chez *S.cerevisiae*, une mention « y » précèdera les noms des protéines ou des gènes lorsque ces derniers proviennent de la levure *S.cerevisiae*. A défaut de cette mention, ou d'une autre précision, le gène ou la protéine est d'origine mammalienne.

### II.2.1 Reconnaissance des CDBs de l'ADN

Suite à la formation d'une CDB, les extrémités de cette dernière sont reconnues et protégées de la dégradation par le dimère Ku70/80 et par 53BP1 (*P53-Binding Protein 1*) (Mimitou and Symington, 2010;

Sun et al., 2012; Wong et al., 2010). Ces deux facteurs vont favoriser la réparation de la CDB par le NHEJ (Ceccaldi et al., 2016). Le dimère Ku recrute ensuite la kinase DNA-Pkcs (*DNA-dependent protein kinase*) (Maréchal and Zou, 2013a). La kinase ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) est aussi recrutée à la CDB en interagissant avec le complexe MRE11-RAD50-NBS1 (*Meiotic Recombination 11-RADIation sensitive 50-Nibrin* ou MRN) (Maréchal and Zou, 2013a). La détection de la CDB active ces kinases qui vont phosphoryler des cibles effectrices impliquées dans la réparation de l'ADN, la réplication, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Une des cibles bien connues de la phosphorylation par ces kinases est le variant X de l'histone H2A ( $\gamma$ H2AX pour sa forme phosphorylée)(Kinner et al., 2008). Cette phosphorylation est couramment utilisée en Biologie cellulaire pour suivre la formation et la cinétique de réparation des CDBs de l'ADN. L'activation de cette cascade de signalisation va permettre de réguler les acteurs de la réparation, arrêter le cycle cellulaire le temps de réparer la CDB de l'ADN ou induire la mort cellulaire si la CDB n'est pas réparée (Maréchal and Zou, 2013a).



**Figure 7 : Modèle de la réparation des CDBs de l'ADN par la recombinaison homologue**

Une étape est présentée avec une simple flèche lorsqu'elle est irréversible, comme la résection. Dans le cas contraire, comme pour l'invasion, une double flèche est présente. Les têtes de flèches représentent le sens de la coupure par les endonucléases lors de la résolution (schéma adapté de (Kowalczykowski, 2015)).

## II.2.2 Prise en charge de la CDB de l'ADN par la machinerie de résection

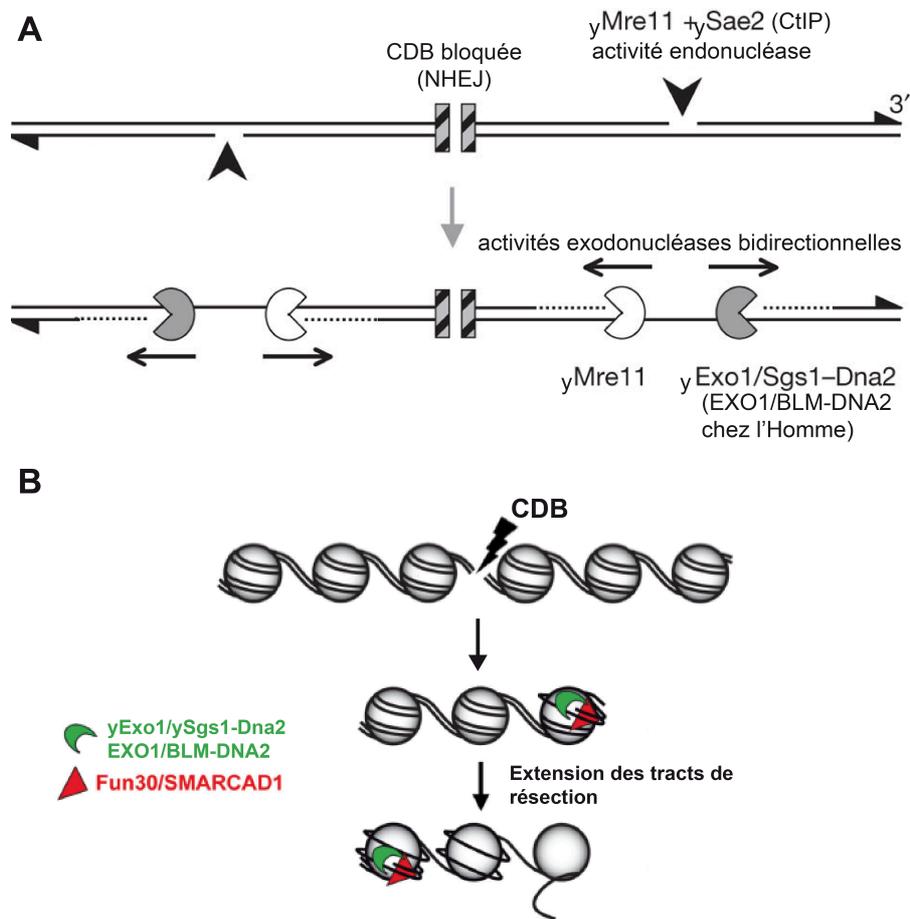
Suite à la formation d'une CDB, la recombinaison homologue démarre par la résection qui produit un ADNsb. La génération de cet ADNsb est nécessaire à la progression de la recombinaison homologue (Kowalczykowski, 2015). Deux systèmes indépendants exécutent la résection dans le sens 5'>3' (Gravel et al., 2008; Mimitou and Symington, 2008; Nimonkar et al., 2011; Symington, 2014; Zhu et al., 2008). Le premier est dépendant de EXO1 (*Exonuclease 1*) qui est une 5'>3' exonucléase. Le second système dépend de l'action concertée de l'hélicase ySgs1 (*Slow Growth Suppressor 1*), ou BLM (*Bloom syndrome protein*) chez les mammifères, et de DNA2 (*DNA replication helicase/nuclease 2*), une 5'>3' hélicase avec une activité nucléase.

Lorsque la CDB n'est pas accessible, comme lorsqu'elle est liée par Ku, la résection ne peut pas être lancée par yExo1 et ySgs1/Dna2 (**Figure 8A**)(Mimitou and Symington, 2010). MRE11, du complexe MRN et son homologue yMRX (X pour Xrs2, *X-Ray Sensitive 2*), présente une activité 3'>5' exonucléase et une activité endonucléase (Paull and Gellert, 1998). L'activité endonucléase de yMRX, avec l'aide de ySae2 (*Sporulation in the Absence of spo Eleven 2*) ou CtIP chez l'Homme, intervient dans un premier temps pour créer une incision simple brin de l'ADN près de la CDB (Cannavo and Cejka, 2014; Garcia et al., 2011; Sartori et al., 2007; Shibata et al., 2014)(**Figure 8A**). Cette incision sert ensuite de point de départ pour une résection bi-directionnelle de la CDB qui fait intervenir l'activité exonucléase 3'>5' de yMRX et les systèmes EXO1 et BLM/DNA2 (Garcia et al., 2011; Symington, 2014)(**Figure 8A**). Cette résection bi-directionnelle permet de libérer l'extrémité de la CDB et de générer l'ADNsb essentiel à la suite de la recombinaison homologue (Garcia et al., 2011; Symington, 2014).

Outre l'accessibilité de la CDB, la machinerie de résection doit gérer la présence des nucléosomes pour pouvoir dégrader l'ADN et ainsi générer l'ADNsb nécessaire à la recombinaison homologue. La chromatine doit être plus accessible pour permettre alors la résection. Les remodeleurs de la chromatine sont des acteurs centraux de la régulation de l'accessibilité de la chromatine (Längst and Manlyte, 2015). Ces facteurs pourraient aider la machinerie de la résection dans les régions nucléosomales. Le complexe remodeleur de la chromatine yINO80 (INOitol requiring 80) a été le premier décrit comme nécessaire à la résection normale de l'ADN après induction d'une CDB (Attikum et al., 2004). Ensuite, le remodeleur de la chromatine yFun30 (*Function Unknown Now 30*) a été impliqué dans la promotion de la résection des CDBs catalysée par yExo1 et ySgs1 (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012; Eapen et al., 2012). Il a été proposé que Fun30 facilite l'accès à l'ADN pour la machinerie de la résection dans les régions nucléosomales (**Figure 8B**)(Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012). L'équivalent humain de yFun30 est SMARCAD1 (*SWI/SNF-Related, Matrix-Associated Actin-Dependent 1*)(Costelloe et al., 2012). SMARCAD1 est aussi requise pour la résection car elle permet la localisation d'acteurs recrutés sur l'ADNsb qui est formé par la résection (Costelloe et al., 2012).

La résection est régulée en fonction du cycle cellulaire (Ceccaldi et al., 2016; Ferretti et al., 2013). Cette régulation régit le choix de la voie de réparation des CDBs. La progression du cycle cellulaire chez les eucaryotes est régulée par les kinases dépendantes des cyclines (en anglais *Cyclin-Dependent Kinases*, CDK) (Malumbres and Barbacid, 2005; Morgan, 1997). Chez *S.cerevisiae*, yCdk1 promeut la transition G1/S et G2/M, tandis que chez les métazoaires, CDK2 promeut la transition G1/S et la progression de la phase S (Morgan, 1997)(Malumbres and Barbacid, 2005). Chez *S.cerevisiae*, yCdk1 est essentielle pour le choix de la voie de réparation des CDBs en promouvant la résection (Aylon et al., 2004; Ira et al., 2004). Chez l'Homme, les CDKs, dont CDK2, sont essentielles à la localisation d'acteurs recrutés sur l'ADNsb qui est

formé par la résection (Deans et al., 2006; Jazayeri et al., 2006). Ces résultats suggèrent que le rôle des CDKs au cours de la résection est conservé de *S.cerevisiae* à l'Homme. Les CDKs promeuvent la résection en phosphorylant directement des acteurs de cette dernière comme NBS1 du complexe MRN, EXO1, ySae2 et yDna2 (Ferretti et al., 2013).



**Figure 8 : Modèles de la résection bi-directionnelle et de la gestion de la chromatine au cours de la résection**

(A) Modèle de la résection bidirectionnelle. Lorsque la CDB n'est pas accessible, comme lorsqu'elle est liée par Ku, yMRX-Sae2 (MRN-CtIP chez l'Homme) créent des sites d'entrée pour les nucléases yExo1 (EXO1) et yDna2 (DNA2) et l'activité nucléase de yMre11. Ces nucléases continuent ensuite la résection sur plusieurs centaines de nucléotides pour générer l'ADNsb nécessaire à la suite de la recombinaison homologue (schéma adapté de (Garcia et al., 2011)).

(B) Modèle du contrôle de la résection par yFun30/SMARCAD1 dans les régions nucléosomales flanquant une CDB. yFun30/SMARCAD1 déstabilisent les interactions entre l'ADN et les histones ce qui facilite la génération d'ADNsb par la machinerie de résection (schéma adapté de (Costelloe et al., 2012)).

### II.2.3 Recherche et invasion d'un brin homologue intact

- RAD51 au centre de la recherche de l'homologie et de l'invasion

L'ADNsb généré par la résection va servir de matrice pour la recherche d'homologie et l'invasion d'un brin d'ADN homologue non lésé. Cette étape est catalysée par les protéines recombinases (Kowalczykowski, 2015). Les protéines de la famille des recombinases sont conservées chez les procaryotes, les archéobactéries et les eucaryotes (Haldenby et al., 2009; Morrical, 2016). RAD51 est une recombinase eucaryote essentielle à la recombinaison mitotique chez les levures *S.cerevisiae*, *S.pombe* et chez les

mammifères (Lambert and Lopez, 2000; Muris et al., 1997; Shinohara et al., 1992). RAD51 a la capacité de polymériser sous la forme d'un filament sur l'ADNsb et l'ADN double brin (ADNdb) (Ogawa et al., 1993; Sung and Robberson, 1995). yRAD51 et RAD51 humaine peuvent catalyser la recherche d'homologie et l'échange de brins, ou activité recombinase, *in vitro* (Baumann et al., 1996; Sung, 1994). Cependant, RAD51 ne peut catalyser ces réactions que si le filament RAD51 est formé sur l'ADNsb (Sung, 1994; Sung and Robberson, 1995)(**Figure 9**). Ce résultat suggère que le filament RAD51-ADNdb est un intermédiaire inactif d'un point de vue catalytique (Sung and Robberson, 1995). Le filament RAD51-ADNsb capable de catalyser la recherche d'homologie et l'invasion de l'ADNdb homologue est appelé par la suite « filament pré-synaptique » en opposition au filament « post-synaptique » qui a exécuté l'invasion.

- Le déplacement de RPA

L'ADNsb généré par la machinerie de la résection est susceptible d'être la cible d'une dégradation et de former des structures secondaires. Le complexe RPA (*Replication Protein A*) lie l'ADNsb pour le protéger de la dégradation et l'empêcher de former des structures secondaires (Sugiyama et al., 1997; Wang and Haber, 2004). RPA est un complexe trimérique, composé de RPA1, RPA2 et RPA3 (Wold, 1997). RPA est extrêmement conservé chez les eucaryotes et possède une très grande affinité pour l'ADNsb (Wold, 1997). La formation d'un filament simple brin associé à RPA va recruter et activer la kinase ATR (*Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein*)(Zou and Elledge, 2003). ATR va promouvoir la suite de la recombinaison en phosphorylant des acteurs de la recombinaison (Maréchal and Zou, 2013b).

Les modèles actuels de la recombinaison homologue mitotique suggèrent que le chargement de yRPA sur l'ADNsb précède celui de la recombinase yRad51 (Lisby et al., 2004; Wang and Haber, 2004) (**Figure 9**). RAD51 doit alors déplacer RPA de l'ADNsb afin de pouvoir assurer son rôle lors de la recombinaison homologue. RAD51 interagit grâce à sa partie N-terminale avec la grande sous-unité de RPA, RPA1 (Golub et al., 1998; Stauffer and Chazin, 2004). Cette interaction permet le déplacement de RPA *in vitro* (Stauffer and Chazin, 2004). Le déplacement de RPA en faveur du chargement de RAD51 est aussi promu par des protéines appelées « médiatrices » comme yRad52 (*RADIation sensitive 52*) chez les levures (Gasior et al., 2001). Chez l'Homme, RAD52 n'est pas capable de stimuler le chargement de RAD51 sur un ADNsb couvert par RPA (Jensen et al., 2010). En revanche, BRCA2 (*Breast Cancer 2*) humaine peut assurer cette étape de la recombinaison homologue *in vitro* (Jensen et al., 2010; Liu et al., 2010; Zhao et al., 2015)(**Figure 9**). Ces résultats suggèrent que RAD52 a perdu sa fonction médiatrice de RAD51 au cours de l'évolution des mammifères. BRCA2 aurait acquis cette fonction et RAD52 pourrait s'être spécialisée sur d'autres rôles au cours de la recombinaison homologue (Jensen et al., 2010). Le déplacement de RPA de l'ADNsb à l'étape pré-synaptique sera traitée plus en détail dans une partie en aval dans ce manuscrit (voir partie III.3 Régulation des fonctions de RPA par ses partenaires protéiques au cours de la recombinaison homologue).

- Les auxiliaires de RAD51 impliqués dans la formation du filament pré-synaptique

RAD51 ne se charge pas seule sur le filament d'ADNsb pour catalyser la recherche d'homologie et l'invasion. RAD51 est accompagnée de ses paralogues qui l'aident à former le filament pré-synaptique. *S.cerevisiae* et les vertébrés possèdent plusieurs paralogues de RAD51 (Kowalczykowski, 2015). Des mutations des gènes codant yRad55 et yRad57 (*RADIation sensitive 55* et *57*) induisent une sensibilité aux agents endommageant l'ADN et une baisse de l'efficacité de la recombinaison (Lovett and Mortimer, 1987).

*In vitro*, yRad55 et yRad57 se purifient en dimères, stimulent la croissance du filament yRad51 et empêchent la dissociation de ce dernier (Sung, 1997a). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que ce dimère s'oppose à la dissociation du filament yRad51 par l'hélicase ySrs2 (*Suppressor of Rad Six 2*) (Liu et al., 2011). yRad55-Rad57 participeraient alors à la formation du filament yRad51 en empêchant sa dissociation (**Figure 9**) (Liu et al., 2011). Chez l'Homme, au moins cinq paralogs de RAD51 ont été identifiés à ce jour : RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3 (*X-ray repair cross complementing 2 et 3*) (Suwaki et al., 2011). La perturbation de la fonction des paralogs de RAD51 dans des cellules de vertébrés induit une sensibilisation des cellules à des agents génotoxiques divers. Le fait que (1) l'inactivation de ces paralogs dans les cellules de poulet DT40 atténue la formation des foyers RAD51 après irradiation et que (2) la sensibilité aux dommages de l'ADN de ces mutants soit partiellement corrigée par la surexpression de RAD51 suggère que les paralogs de RAD51 chez les vertébrés sont impliqués dans l'assemblage des filaments RAD51 au niveau des sites de CDBs de l'ADN ou dans la stabilisation de ces filaments (Takata et al., 2001) (**Figure 9**). Cependant, nous ne savons pas formellement comment les paralogs de RAD51 contribuent à la formation du filament RAD51 chez les mammifères.

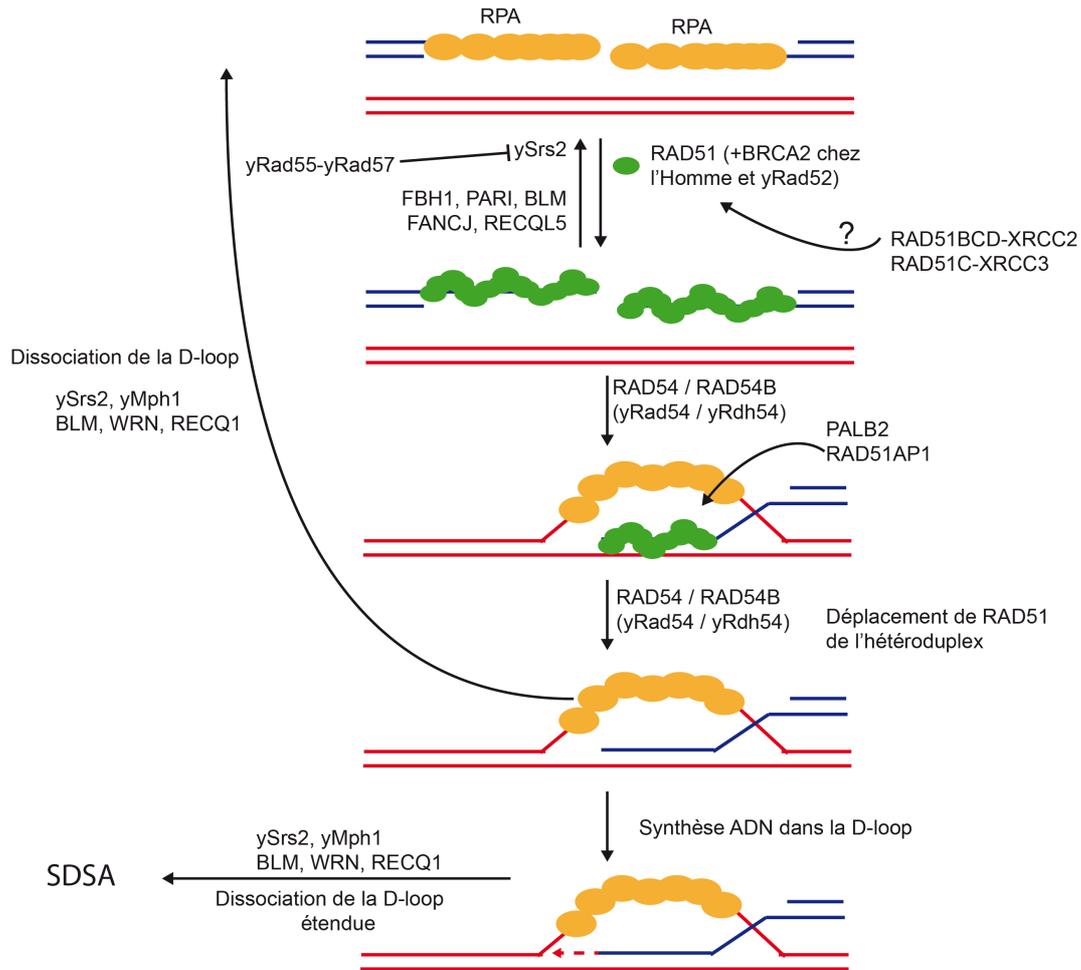
- Les protéines auxiliaires de RAD51 au cours de l'invasion

La recherche d'homologie et l'invasion d'un brin homologue est catalysée par RAD51 (Kowalczykowski, 2015). RAD51 est capable de catalyser seule ces étapes *in vitro* (Baumann et al., 1996; Sung, 1994). Cependant, la manière avec laquelle l'homologie est trouvée *in vivo*, dans le contexte du génome, n'est toujours pas élucidée. Des études de dynamique des CDBs de l'ADN *in vivo* chez *S.cerevisiae* ont montré que l'introduction d'une CDB de l'ADN à un locus induit une augmentation de la mobilité de ce locus (Dion et al., 2012; Mine-Hattab and Rothstein, 2012). Il a été suggéré que la mobilité des chromosomes facilite la recherche de l'homologie et l'appariement au brin homologue *in vivo*.

Au cours de l'invasion *in vivo*, l'ADNdb homologue est probablement peu accessible car condensé par les histones. Plusieurs facteurs interviennent pour assister RAD51 au cours de l'invasion de l'ADNdb homologue. RAD54 intervient à cette étape pour aider RAD51 (Alexeev et al., 2003). RAD54 est une protéine translocase, c'est-à-dire qu'elle peut déplacer des protéines de l'ADNdb (Mazin et al., 2010) (**Figure 9**). Cette protéine fait partie de la famille de protéines Swi2/Snf2 (*Switch 2/Sucrose NonFermenting 2*) remodelleuses de la chromatine (Flaus et al., 2006). Des études *in vitro* ont montré que Rad54 de la drosophile, *Drosophila melanogaster*, stimule l'invasion d'un brin homologue par Rad51 de manière plus efficace lorsque le brin homologue non-lésé est couvert de nucléosomes (Alexiadis and Kadonaga, 2002). Ce résultat suggère que yRad54 remodèle localement la chromatine pour permettre à yRad51 d'accéder plus facilement à la séquence homologue intacte et d'envahir ce brin. yRad54 a un homologue, yRdh54 (*Rad54 Homolog*) qui est aussi impliquée dans la recombinaison entre chromosomes homologues dans les cellules diploïdes en mitose et au cours de la recombinaison homologue méiotique (Klein, 1997; Shinohara et al., 1997). L'Homme et la souris possèdent aussi deux gènes codant des homologues de RAD54 : RAD54 et RAD54B. Chez la souris, les deux homologues de RAD54 sont nécessaires à la recombinaison homologue (Wesoly et al., 2006). Ces résultats suggèrent que les rôles de yRad54 pourraient être conservés chez la souris.

D'autres protéines ont aussi été identifiées comme aidant RAD51 lors de la recherche d'homologie et l'invasion. Le complexe RPA avait été décrit plus tôt comme une barrière au chargement de RAD51 sur l'ADNsb pré-synaptique. Cependant, RPA peut aussi jouer un rôle d'auxiliaire pour RAD51 en stabilisant le

brin d'ADNsb déplacé lors de l'étape d'invasion (Eggler et al., 2002; Sugiyama et al., 1997)(Figure 9). Enfin, il a été suggéré que PALB2 (*Partner and Localizer of BRCA2*) aide RAD51 au cours de l'invasion (Dray et al., 2010). La réduction de l'expression de PALB2 réduit l'efficacité de la recombinaison homologue dans les cellules humaines (Xia et al., 2006). Ces résultats indiquent que PALB2 est impliquée dans la recombinaison homologue. PALB2 lie préférentiellement les D-loops et stimule la formation de ces dernières par RAD51 en coopération avec une protéine partenaire de RAD51, RAD51AP1 (*RAD51 associated protein 1*) (Dray et al., 2010). PALB2 et RAD51AP1 agiraient préférentiellement à l'étape de l'invasion du brin homologue en stabilisant la D-loop formée par RAD51 (Dray et al., 2010)(Figure 9).



**Figure 9 : Modèle de la formation du filament pré-synaptique et de l'invasion du brin homologue**

Après résection, l'ADNsb est rapidement couvert par RPA. Puis les médiateurs de RAD51, BRCA2 et les paralogs de RAD51 chez l'Homme et yRad52 et les paralogs de yRad51 chez *S.cerevisiae* permettent la formation du filament RAD51 à partir de l'ADNsb recouvert par RPA. Le filament RAD51 pré-synaptique peut être dissocié par des hélicases comme ySrs2, FBH1, PARI, BLM, FANCI et RECQL5. RAD51 catalyse ensuite la recherche du brin homologue et RAD54 l'assiste pour envahir sur un brin couvert de chromatine. RPA stabilise le brin déplacé dans la D-loop pour favoriser l'invasion du brin homologue. Enfin, RAD54 grâce à son activité translocase peut déplacer RAD51 pour permettre la synthèse d'ADN. En absence de RAD51, une D-loop, étendue ou non, peut être dissociée par des hélicases.

## II.2.4 La régulation de l'invasion par la dissociation du filament RAD51

La formation du filament RAD51 pré-synaptique n'est pas irréversible. Des protéines hélicases, notamment chez les vertébrés, peuvent dissocier ce filament lorsque ce dernier peut devenir toxique pour la cellule. Les études sur l'hélicase Srs2 chez *S.cerevisiae* ont permis de mettre en place un modèle du mécanisme anti-recombinogène des protéines hélicases en montrant que ySrs2 dissocie le filament yRad51. La mutation de ySrs2 sensibilise les cellules aux UV et aux radiations (Aboussekhra et al., 1989). Cette sensibilité peut être supprimée en mutant yRad51, ce qui suggère que cette sensibilité est dépendante de la recombinaison (Aboussekhra et al., 1992). Il a été montré plus tard que ySrs2 est capable de dissocier yRad51 de l'ADNsb *in vitro* (Krejci et al., 2003; Veaute et al., 2003)(**Figure 9**) Ces résultats suggèrent que ySrs2 régule la recombinaison homologue en dissociant yRad51 de l'ADNsb.

Chez les mammifères, les hélicases FBH1 (*F-box DNA helicase protein 1*), PARI (ou *PARP1 Binding Protein*), BLM, FANCI (*Fanconi Anemia Group J Protein*) et RECQL5 (*RecQ Like Helicase 5*) sont capables de dissocier RAD51 de l'ADNsb *in vitro* (Bugreev et al., 2007; Hu et al., 2007; Moldovan et al., 2012; Simandlova et al., 2013; Sommers et al., 2009). Ces résultats suggèrent que ces hélicases pourraient déplacer RAD51 du filament pré-synaptique à l'image de ySrs2. Elles pourraient ainsi réguler la recombinaison homologue en empêchant la recherche d'homologie et l'invasion d'un brin homologue. Le nombre bien plus grand d'hélicases capables de déplacer RAD51 codées dans le génome des vertébrés suggère un niveau de régulation du filament RAD51 pré-synaptique plus complexe que chez les modèles levures comme *S.cerevisiae*. Cependant, nous ne savons pas quelle est la contribution relative de ces différentes hélicases au cours de la régulation du filament RAD51 chez les vertébrés.

## II.2.5 L'élimination de filaments RAD51 inactifs d'un point de vue catalytique

Outre sa capacité de lier l'ADNsb, RAD51 possède aussi une capacité de lier l'ADN double brin (ADNdb) et de former un filament sur ce dernier (Baumann et al., 1996; Benson et al., 1994; Ogawa et al., 1993). Ce filament est incapable de catalyser une recherche d'homologie et une invasion d'un brin homologue (Sung and Roberson, 1995). De plus, ce filament RAD51 doit être constamment dissocié pour qu'il ne puisse pas être toxique pour la cellule en interférant avec d'autres mécanismes du métabolisme de l'ADN (Shah et al., 2010). Il a d'abord été montré *in vitro* que yRad54 est capable de dissocier yRad51 de l'ADNdb (Solinger et al., 2002). Puis, *in vivo*, chez *S.cerevisiae* et dans les cellules humaines, il a été montré que RAD54 et son homologue RAD54B (ou Rhd54 chez *S.cerevisiae*) empêchent l'accumulation de RAD51 sur la chromatine, en absence de dommages à l'ADN (Mason et al., 2015; Shah et al., 2010). Ces résultats suggèrent que RAD54 déplace RAD51 de l'ADNdb *in vivo* pour empêcher que des filaments RAD51-ADNdb ne se forment et soient toxiques pour la cellule. Ces filaments RAD51 toxiques et formés sur l'ADNdb en absence de dommages ont été obtenus artificiellement lors des expérimentations citées plus tôt, en sur-exprimant RAD51 (Mason et al., 2015; Shah et al., 2010). Cependant, dans quel contexte, non expérimental, ces filaments peuvent-ils se former ? RAD51 est fortement exprimée dans certaines cellules cancéreuses et peut former des foyers en absence de dommages dans ces cellules (Raderschall et al., 2002). La formation de filaments RAD51 sur l'ADNdb dans les cellules cancéreuses pourrait interférer avec le métabolisme de l'ADN et par conséquent pourrait induire une instabilité génomique caractéristique des cellules tumorales.

## II.2.6 Régulation des intermédiaires post-synaptiques

Les modèles actuels de la recombinaison homologe suggèrent qu'après l'invasion d'un brin homologue par le filament RAD51-ADNsb, RAD51 est dissociée de l'hétéroduplex afin de permettre la synthèse d'ADN dans la D-loop. Des données expérimentales suggèrent que RAD54 serait impliquée dans la dissociation de RAD51 après la formation de la D-loop car yRad54 peut dissocier yRad51 de l'ADNdb dans une D-loop *in vitro* et la réduction de son expression dans les cellules humaines induit une accumulation de foyers RAD51 après induction de dommages et un défaut de réparation par recombinaison homologe (Li and Heyer, 2009; Spies et al., 2016)(**Figure 9**).

- L'extension de la D-loop par la synthèse d'ADN

Le déplacement de RAD51 de la D-loop libère l'extrémité 3'-OH de l'ADN lésé. Cette extrémité est alors accessible pour que les polymérases puissent commencer une synthèse d'ADN. La synthèse dans la D-loop semblerait nécessiter l'action concertée de la polymérase  $\delta$ , PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et RPA. En effet, la mutation d'une sous-unité de la polymérase  $\delta$ , Pol3, a permis de montrer que la polymérase  $\delta$  est nécessaire à la recombinaison homologe, en particulier lors de la synthèse d'ADN au niveau de la D-loop, chez *S.cerevisiae* (Fabre et al., 1991; Maloisel et al., 2008). De plus, des expériences menées avec des protéines humaines et de *S.cerevisiae* ont montré que la polymérase  $\delta$  est capable de synthétiser de l'ADN dans des D-loops produites par RAD51 (Li et al., 2009; Sneed et al., 2013). Ces études ont aussi montré que la synthèse d'ADN au niveau de la D-loop par la polymérase  $\delta$  est fortement stimulée par la protéine PCNA. Son rôle ici est d'augmenter fortement la processivité, c'est-à-dire l'ajout progressif de nucléotides dans la molécule d'ADN sans s'arrêter, par des ADN polymérases comme la polymérase  $\delta$  (Langston and Donnell, 2008). Enfin, ces études *in vitro* ont aussi montré le rôle de RPA dans l'extension de la D-loop en stabilisant l'ADNsb déplacé au cours de la progression de la polymérase  $\delta$  (Sneed et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la polymérase  $\delta$ , aidée par PCNA et RPA, pourrait assurer la synthèse d'ADN dans la D-loop (Li et al., 2009; Sneed et al., 2013).

La synthèse d'ADN dans la D-loop pourrait impliquer d'autres polymérases comme la polymérase  $\zeta$ . La polymérase  $\zeta$  est impliquée dans la radiorésistance chez *S.cerevisiae*, la drosophile, les cellules de poulet DT40 et les cellules humaines (McVey et al., 2016). *In vitro*, la polymérase  $\zeta$  de *S.cerevisiae* est capable de synthétiser de l'ADN dans une D-loop sur de courts tracts et en absence de PCNA (Li et al., 2013). La polymérase  $\zeta$  pourrait alors commencer la synthèse d'ADN dans la D-loop avant le recrutement de PCNA et la polymérase  $\delta$  (Li et al., 2013).

- Le démantèlement de la D-loop étendue

Si la synthèse d'ADN s'est faite sur un tract suffisamment long et que la D-loop est démantelée, la recombinaison homologe peut emprunter la voie du SDSA (Kowalczykowski, 2015). Comme nous allons le voir, de nombreuses données biochimiques suggèrent que le démantèlement de la D-loop est assurée par des hélicases. Si la D-loop qui a initié la synthèse d'ADN (D-loop étendue) n'est pas démantelée, la synthèse d'ADN peut continuer et la seconde extrémité de la CDB peut s'hybrider sur la D-loop pour former plus tard une jonction double de Holliday qui peut être éventuellement convertie en COs (Kowalczykowski, 2015). Par conséquent, l'absence de ces hélicases se traduit généralement par une augmentation de la fréquence des

COs *in vivo*. Des hélicases telles que BLM humaine, ySrs2, et les hélicases homologues des hélicases BLM et de FANCM (*Fanconi Anemia Group M Protein*), respectivement ySgs1 (Slow Growth Suppressor 1) et yMph1 (Mutator PHenotype 1), chez *S.cerevisiae* réguleraient la formation des COs mitotiques en démantelant les D-loops. En effet, ySrs2, ySgs1, yMph1 et BLM humaine sont capables de démanteler des D-loops *in vitro* (Bachrati et al., 2006; Dupaigne et al., 2008; Fasching et al., 2015; Prakash et al., 2009)(Ira et al., 2003). De plus, l'absence de ySrs2 ou ySgs1 ou yMph1 conduit à une augmentation de la fréquence de formation de COs mitotiques (Ira et al., 2003; Prakash et al., 2009). Enfin, des cellules humaines déficientes pour BLM présentent une forte perte d'hétérozygotie qui provient d'événements de conversions géniques associés à la formation de COs entre chromosomes homologues (LaRocque et al., 2011; Suzuki et al., 2016). ySrs2, ySgs1, yMph1 et BLM pourraient alors inhiber la formation des COs en démantelant des D-loops étendues (**Figure 9**). Cependant, comme nous avons pu le voir plus tôt, certaines de ces hélicases participent aussi à la dissociation du filament RAD51 comme BLM et ySrs2 (voir partie II.2.4 La régulation de l'invasion par la dissociation du filament RAD51). L'intervention des hélicases à plusieurs étapes de recombinaison homologue suggère que cette dernière semblerait être régulée à plusieurs niveaux par les hélicases. Le choix d'une régulation par les hélicases à une étape de la recombinaison homologue pourrait être régit par des partenaires des hélicases ou des modifications post-traductionnelles de ces dernières.

### II.2.7 La capture de la seconde extrémité de la CDB de l'ADN

Si la D-loop n'est pas déplacée par une hélicase, cette dernière peut devenir une jonction double de Holliday après l'étape de la second-end capture (Kowalczykowski, 2015). Nos connaissances sur cette étape nous proviennent majoritairement de données biochimiques. Nous savons que (1) la second-end capture peut être catalysée par yRad52, (2) elle implique des interactions protéines-protéines entre yRad52 et yRPA couvrant la D-loop et l'autre extrémité de la CDB de l'ADN et que (3) la synthèse d'ADN dans la D-loop facilite la second-end capture *in vitro* (McIlwraith and West, 2008; Nimonkar et al., 2009). Ces résultats suggèrent que yRPA et yRad52 sont des acteurs majeurs de la second-end capture. Chez l'Homme, RAD52 est capable d'hybrider deux ADNsb complémentaires couverts par RPA *in vitro* (Jensen et al., 2010). Ce résultat suggère que même si RAD52 humaine a perdu sa fonction médiatrice de RAD51, le rôle de RAD52 au cours de la second-end capture pourrait être conservé de la levure à l'Homme (Jensen et al., 2010). Les données *in vivo* suggèrent que yRad52 pourrait être impliquée au cours de la second-end capture lors de la recombinaison méiotique (Lao et al., 2008). Cependant, RAD52 n'est pas essentielle à la fertilité murine (Rijkers et al., 1998). Ce résultat suggère que, contrairement à yRad52, RAD52 n'est pas essentielle à la second-end capture puisqu'en son absence les COs méiotiques sembleraient être formés correctement. La second-end capture devrait alors être assurée par un facteur autre que RAD52 au cours de la recombinaison méiotique chez les mammifères. A ce jour, nous ne savons pas quels sont les acteurs qui interviennent au cours de la second-end capture chez les mammifères, notamment au cours de la recombinaison méiotique.

### II.2.8 Dissolution et résolution de la jonction double de Holliday

- La dissolution de la jonction double de Holliday

La jonction de Holliday est une jonction à quatre voies qui engage deux molécules d'ADNdb (ou duplex) (Holliday, 1964). La libération des deux duplex peut se faire via un processus appelé la

« dissolution ». La dissolution nécessite une hélicase pour faire converger les deux jonctions de Holliday et une topoisomérase pour catalyser le passage d'un brin d'ADN au travers d'une coupure transitoire d'un autre brin d'ADN. Ainsi, les deux molécules d'ADN sont séparées sans échange réciproque d'ADN. On parle alors de NCO. La dissolution serait assurée par le complexe BLM-TopoIII $\alpha$ -RMI1 et 2. Ce complexe et son homologue chez *S.cerevisiae* sont capables de catalyser la dissolution *in vitro* (Cejka et al., 2010; Raynard et al., 2006; Singh et al., 2008; Wu and Hickson, 2003; Wu et al., 2006; Xu et al., 2008)(**Figure 10**). Le complexe BLM-Topo III $\alpha$ -RMI1 est aussi conservé chez la plante *Arabidopsis thaliana* et des études génétiques suggèrent un rôle de ce complexe au cours de la dissolution chez cette espèce et chez *S.cerevisiae* (Chang et al., 2005; Mullen et al., 2005; Séguéla-Arnaud et al., 2015). Ces résultats suggèrent que le complexe BLM-Topo III $\alpha$ -RMI1 et 2 est un complexe conservé au cours de l'évolution.

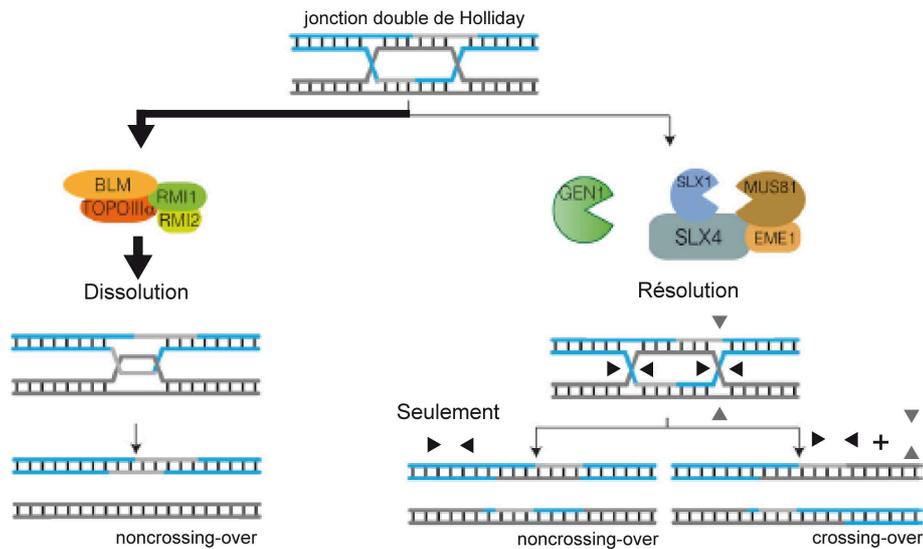
- La résolution de la jonction double de Holliday

Le second moyen de séparer les deux molécules d'ADN engagées dans une jonction double de Holliday repose sur un clivage par une endonucléase. Selon le plan de coupe adopté, la jonction double de Holliday peut être convertie en NCO ou en CO. Ce processus est appelé la « résolution ». La première endonucléase caractérisée comme capable de cliver les jonctions de Holliday est un dimère : Mus81-Eme1 chez *S.pombe* (Mus81-Mms4 chez *S.cerevisiae*) et MUS81-EME1 chez l'Homme (*MMS and UV Sensitive 81, Essential Meiotic Structure-Specific Endonuclease 1*)(Boddy et al., 2001; Chen et al., 2001; Ciccia et al., 2003; Öğrünç and Sancar, 2003)(**Figure 10**). Bien que des protéines yMus81 et MUS81 purifiées à partir d'extraits cellulaires puissent cliver une jonction de Holliday fermée (Boddy et al., 2001; Chen et al., 2001), les protéines recombinantes clivent préférentiellement des jonctions ouvertes (Bastin-Shanower et al., 2003; Osman et al., 2003). Une modification post-traductionnelle de MUS81 ou de son partenaire EME1 pourrait conférer au dimère la capacité de cliver les jonctions fermées. Cette idée est renforcée par le fait que la phosphorylation de Eme1 de *S.pombe* par les homologues de CDK1 et ATR stimule la capacité de Mus81-Eme1 de cliver une jonction de Holliday fermée (Dehé et al., 2013). Ce résultat suggère que la capacité de cliver les jonctions fermées du dimère Mus81-Eme1 pourrait être régulée par modification post-traductionnelle via des acteurs régulant le cycle cellulaire ou impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN (Dehé et al., 2013).

D'autres endonucléases capables de cliver la jonction double de Holliday ont été caractérisées comme le dimère ySlx1-Slx4 ou SLX1-SLX4 chez l'Homme (*Synthetic Lethal of unknown (X) function 1 et 4*) (Fekairi et al., 2009; Fricke and Brill, 2003; Svendsen et al., 2009) et yYen1 ou GEN1 chez l'Homme (*Gen Endonuclease Homolog 1*)(Ip et al., 2008)(**Figure 10**). Chez l'Homme, SLX1-SLX4 et MUS81-EME1 forment un complexe et l'activité nucléase de ce complexe sur la jonction de Holliday est plus grande que celle des dimères seuls (Wyatt et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggère que plusieurs endonucléases peuvent intervenir au cours de la résolution.

La formation de COs en mitose et entre des chromosomes homologues peut s'avérer délétère car elle engendre une perte d'hétérozygotie qui est souvent associée au cancer (Cavenee et al., 1983). La résolution peut produire un NCO ou un CO à partir d'une jonction double de Holliday. D'un point de vue biologique, la dissolution serait alors à employer de préférence car elle ne produit que des NCOs. Des études génétiques chez *S.cerevisiae* ont suggéré que la résolution est la voie majeure préférentiellement utilisée pour la gestion des jonctions double de Holliday. En effet, la déficience du complexe ySgs1-Top3-Rmi1 induit l'accumulation d'intermédiaires tardifs de recombinaison suite à la formation des dommages à l'ADN

(Ashton et al., 2011). Ces intermédiaires sont lentement réparés. Cependant, la délétion de yMus81 dans ce contexte exacerbe le phénotype observé avec la déficience du complexe ySgs1-Top3-Rmi1. Ces résultats suggèrent que la dissolution constitue la voie majeure de traitement des jonctions doubles de Holliday dans la cellule et que la résolution peut prendre le relai si besoin (Ashton et al., 2011)(**Figure 10**). Ainsi, la majeure partie des jonctions doubles de Holliday sont converties en NCOs pour assurer la stabilité du génome en mitose chez la levure *S.cerevisiae*. Chez les mammifères, le choix de la résolution ou de la dissolution n'a pas encore été étudié. Cependant, les faits que (1) la formation de COs mitotiques est un événement rare dans les cellules humaines et que (2) la perte d'hétérozygotie est associée à des cas pathologiques comme les cancers supposent que la formation d'un CO mitotique est fortement réprimée dans les cellules saines (Cavenee et al., 1983; Moynahan and Jasin, 2010). La dissolution pourrait alors être également la voie préférentielle de traitement des jonction doubles de Holliday chez l'Homme.



**Figure 10 : La dissolution ou la résolution de la jonction double de Holliday**

La voie préférentiellement utilisée chez *S.cerevisiae* pour convertir une jonction double de Holliday est la dissolution. Les endonucléases structurelles prennent le relai si besoin pour convertir cet intermédiaire de la recombinaison homologue en produit de la recombinaison (adapté de (Matos and West, 2014)).

### II.3 Les spécificités de la recombinaison homologue méiotique

Nous avons traité dans la partie précédente de la recombinaison homologue mitotique. Ce mécanisme conservé des procaryotes aux eucaryotes est impliqué dans la réparation des CDBs de l'ADN. Au cours de la prophase I de méiose, la recombinaison homologue méiotique emprunte des mécanismes de la recombinaison mitotique. Cependant, la recombinaison méiotique présente des spécificités qui permettent de favoriser la formation de ces COs entre chromosomes homologues. Ces spécificités de la recombinaison méiotique est apportée par des acteurs spécifiques de la recombinaison méiotique qui viennent modifier le devenir des produits de recombinaison. Dans la partie qui suit, nous détaillerons donc le rôle de ces acteurs spécifiques de la méiose au cours des différentes étapes de la recombinaison homologue.

### II.3.1 La formation de CDBs programmées

- Création des CDBs par SPO11 et ses protéines accessoires

La recombinaison homologue méiotique est initiée par la formation de CDBs programmées (Lam and Keeney, 2015). Ces CDBs sont ensuite réparées par la recombinaison méiotique. Une proportion de ces CDBs sera convertie en COs essentiels à la ségrégation des chromosomes méiotiques. Ces CDBs sont catalysées au début de la prophase I de méiose par la protéine SPO11 (*SPO* *r*ulation *I*1)(Baudat et al., 2000; Bergerat et al., 1997; Grelon et al., 2001; Hartung et al., 2007; Keeney et al., 1997; Romanienko and Camerini-Otero, 2000). L'inactivation du gène *Spo11* chez *S.cerevisiae*, *A.thaliana* et la souris conduit à une absence de formation de CDBs méiotiques. Cette absence de CDBs, et par conséquent de recombinaison homologue et de formation de COs en méiose, se traduit par un arrêt des spermatocytes en prophase I et la stérilité chez la souris (Baudat et al., 2000; Romanienko and Camerini-Otero, 2000).

SPO11 est une protéine homologue de Top6A (*Topoisomerase 6A*), la sous-unité catalytique de la topoisomérase VI des archéobactéries (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997). La topoisomérase VI est un hétérodimère (Bergerat et al., 1994). Top6A est accompagnée d'une sous-unité régulatrice essentielle pour son activité catalytique, Top6B (Buhler et al., 1998). Pendant près de vingt ans, l'identité d'une potentielle protéine partenaire de SPO11 similaire à Top6B est restée inconnue. Il a été montré récemment que SPO11 forme aussi un dimère similaire avec TopoVIB-Like (*Topoisomerase VIB-Like*) chez la plante *Arabidopsis thaliana* et la souris (Robert et al., 2016a; Vrielynck et al., 2016)(**Figure 11A**). Les protéines de la famille des TopoVIB-Likes sont conservées chez les eucaryotes puisque l'homologue de TopoVIB-Like chez *S.cerevisiae* est yRec102 (*RECombination 102*)(Robert et al., 2016a). TopoVIB-Like chez *A.thaliana* et la souris et yRec102 sont nécessaires à la formation des CDBs méiotiques, ce qui suggère que ces protéines pourraient réguler l'activité catalytique de SPO11 (Bullard et al., 1996; Robert et al., 2016a; Vrielynck et al., 2016). SPO11 forme donc un complexe, avec TopoVIB-Like, similaire à la topoisomérase VI pour catalyser les CDBs méiotiques (Robert et al., 2016a; Vrielynck et al., 2016).

SPO11 et TopoVIB-Likes forment les CDBs méiotiques avec l'aide de protéines auxiliaires. Chez *S.cerevisiae*, ces protéines supplémentaires ont été caractérisées comme importantes pour la formation des CDBs méiotiques et la plupart de ces protéines montrent une localisation préférentiellement associée à l'axe des chromosomes méiotiques (pour revue (Lam and Keeney, 2015)). L'inactivation des gènes codant ces protéines chez *S.cerevisiae* conduit à une perturbation de la formation des CDBs méiotiques. Chez la souris, deux orthologues de ces protéines auxiliaires de SPO11-TopoVIB-Like ont été identifiés à ce jour : MEI4 (*MEIosis-specific 4*) et REC114 (*RECombination 114*) (Kumar et al., 2010). MEI4 est essentielle à la formation des CDBs méiotiques. En effet, les souris *Mei4*<sup>-/-</sup> présentent un phénotype similaire aux souris *Spo11*<sup>-/-</sup> c'est-à-dire une absence de recrutement de RPA, RAD51 et de son paralogue spécifique de la méiose, DMC1 (*Disrupted Meiotic cDNA 1*)(Kumar et al., 2010). Enfin, nous ne savons pas à ce jour si REC114 est nécessaire à la formation des CDBs méiotiques chez la souris à cause de l'absence d'un modèle murin déficient pour cette protéine. Cependant, son interaction avec MEI4 suggère que REC114 pourrait être impliquée dans la formation des CDBs méiotiques en collaboration avec MEI4 (Kumar et al., 2010).

Les vertébrés possèdent un facteur supplémentaire essentiel à la formation des CDBs méiotiques : IHO1 (*Interactor of HORMAD1 protein 1*) (Stanzione et al., 2016). IHO1 co-localise avec les protéines auxiliaires de SPO11, MEI4 et REC114 sur les chromosomes méiotiques et interagit avec REC114. De plus, l'inactivation d'*Iho1* chez la souris induit une absence du marquage  $\gamma$ H2AX spécifique des CDBs. Ces

résultats suggèrent qu'IHO1 pourrait collaborer avec REC114 et MEI4 pour permettre la formation de CDBs chez les vertébrés (Stanzione et al., 2016).

D'autres protéines nécessaires à la formation des CDBs méiotiques sont conservées chez *A.thaliana* et la souris mais pas chez *S.cerevisiae*. PRD1 chez *A.thaliana* (*PUTATIVE RECOMBINATION INITIATION DEFECT 1*) est nécessaire à la formation des CDBs méiotiques (De Muyt et al., 2007). En effet, son invalidation chez *A.thaliana* abolit la formation des CDBs méiotiques et des foyers DMC1. De plus, PRD1 interagit physiquement avec SPO11 (De Muyt et al., 2007). Ces résultats suggèrent que PRD1 collabore avec SPO11 pour la formation des CDBs méiotiques. MEI1 (MEIosis defective 1) est l'homologue de PRD1 chez la souris (De Muyt et al., 2007). Cependant, MEI1 ne semble pas être essentielle à la formation des CDBs méiotiques contrairement à son homologue chez *A.thaliana* (Libby et al., 2002). En effet, les spermatocytes de souris *Mei1*<sup>-/-</sup> présentent une formation de CDBs mise en évidence par la présence du marquage  $\gamma$ H2AX caractéristique des CDBs (Libby et al., 2002). Curieusement, RAD51 n'est pas détectable dans les spermatocytes de ces souris. L'ensemble de ces résultats suggère que MEI1, chez la souris, pourrait avoir un rôle mineur dans la formation des CDBs par SPO11 en méiose et un rôle plus important dans leur maturation comme lors de la résection.

Le complexe yMRX est nécessaire à la résection mitotique et méiotique (voir parties II.2.2 Prise en charge de la CDB de l'ADN par la machinerie de résection ; II.3.2 La résection au cours de la recombinaison homologue méiotique). Cependant, yMRX est aussi nécessaire à la formation des CDBs méiotiques chez *S.cerevisiae* (Keeney, 2007). En effet, l'invalidation de chaque membre du complexe yMRX chez *S.cerevisiae* abolit la formation des CDBs méiotiques ce qui suggère que MRX participe à la formation des CDBs méiotiques chez *S.cerevisiae* (Cao et al., 1990; Ivanov et al., 1992; Johzuka and Ogawa, 1995).

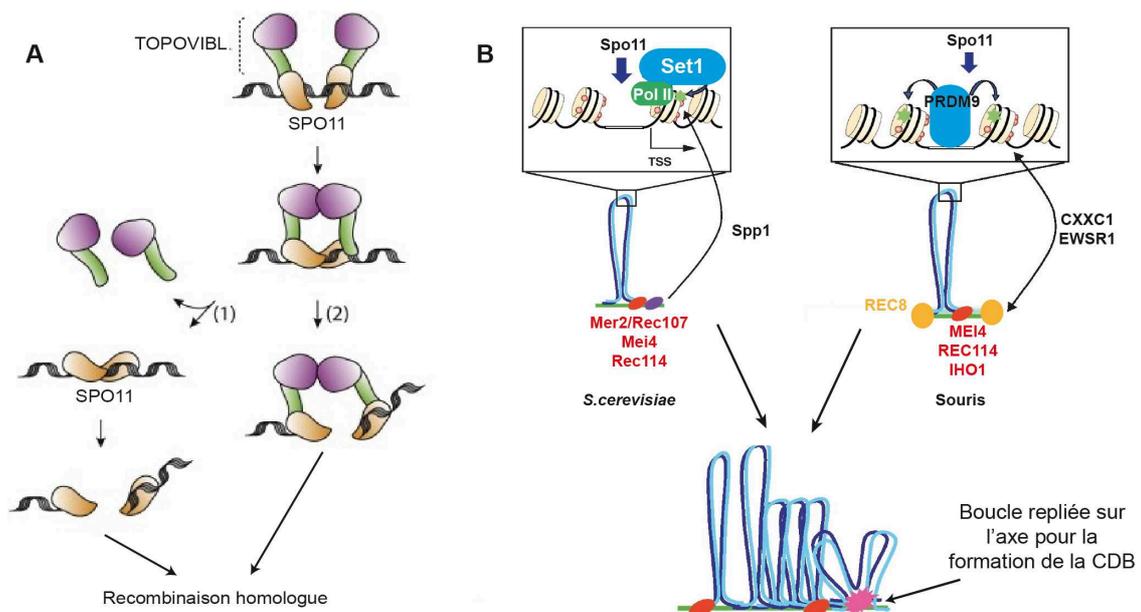
Nous avons pu voir dans cette dernière partie que l'absence de protéines auxiliaires de SPO11 abolit la formation des CDBs programmées essentielles à la recombinaison méiotique. Cependant, le rôle de ces protéines au cours de la formation de la CDB méiotique n'est pas encore très clair. En revanche, des découvertes récentes sur les rôles des protéines auxiliaires de SPO11 permettent de proposer que ces protéines peuvent réguler l'activité catalytique de SPO11 ou la position de la formation de la CDB méiotique dans le contexte chromatinien (Keeney, 2007; Lam and Keeney, 2015; Robert et al., 2016b). Nous verrons dans la suite de ce manuscrit comment certains de ces facteurs auxiliaires de SPO11 participent à la coordination entre la chromatine et la formation de la CDB méiotique pour réguler la localisation de ces CDBs.

- Localisation des CDBs méiotiques

La cartographie moléculaire des extrémités des CDBs méiotiques chez *S.cerevisiae* ainsi que la cartographie des COs chez les mammifères ont permis de déterminer que les événements de recombinaison sont préférentiellement situés dans de petites régions appelées points chauds de recombinaison (Grey et al., 2011)(Baudat and Nicolas, 1997). Chez *S.cerevisiae*, les points chauds sont associés à des régions promotrices des gènes, où la chromatine est ouverte et accessible (Borde et al., 2009). Ces régions accessibles de la chromatine sont associées à des marques de la chromatine « ouverte » comme la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) (Borde et al., 2009). ySet1 (*SET domain-containing 1*), une histone méthyltransférase, dépose H3K4me3 au niveau des points chauds de recombinaison (Borde et al., 2009). Ensuite, une sous-unité du complexe ySet1, appelée ySpp1 (*Set1c, Phd finger Protein 1*) reconnaît H3K4me3 et interagit avec la protéine auxiliaire de ySpo11, yMer2/Rec107 (*MEiotic Recombination 2/*

*RECombination 107*(Acquaviva et al., 2013; Sommermeyer et al., 2013). Ces interactions permettent le rapprochement physique entre les points chauds de recombinaison, riches en H3K4me3, situés sur les boucles de chromatine et la machinerie de formation des CDBs qui est située sur les axes chromosomiques (**Figure 11B**)(Acquaviva et al., 2013; Sommermeyer et al., 2013).

Les études récentes de la formation des CDBs méiotiques chez la souris ont permis de mettre en place un modèle similaire de la régulation de la localisation des CDBs. La protéine PRDM9 (*PR/SET Domain 9*) joue un rôle semblable à la protéine ySet1. PRDM9 est une H3K4 méthyltransférase nécessaire à la progression méiotique (Hayashi et al., 2005). PRDM9 reconnaît des loci spécifiques dans le génome grâce à des domaines de liaison de motifs ADN (Baudat et al., 2010). Les loci reconnus par PRDM9 sont couramment associés à des points chauds de recombinaison (Baudat et al., 2010). Ces résultats suggèrent que PRDM9 contrôle la localisation des CDBs méiotiques chez la souris et que ce contrôle implique une séquence génomique spécifique et une modification des histones. Plus récemment, il a été montré que PRDM9 interagit avec l'homologue de ySpp1, CXXC1 (*CXXC Finger Protein 1*) et aussi avec EWSR1 (Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1)(Imai et al., 2017; Parvanov et al., 2017). CXXC1 interagit avec H3K4me3 et la protéine auxiliaire de SPO11, IHO1, tandis que EWSR1 interagit avec la cohésine REC8. Ces interactions permettraient de coupler H3K4me3 déposée par PRDM9 sur des loci précis et l'axe des chromosomes où se situe la machinerie de formation des CDBs de l'ADN en méiose (Imai et al., 2017; Parvanov et al., 2017)(**Figure 11B**).



**Figure 11 : Modèle de la formation de la CDB en méiose**

(A) La CDB méiotique est catalysée par un dimère de SPO11 en complexe avec TOPOVIB-like. Ensuite, soit (1) TOPOVIB-like n'est pas essentielle à la catalyse de la CDB après la formation du dimère de SPO11 soit (2) l'ensemble du complexe est nécessaire pour cliver l'ADN et initier la recombinaison homologue (adapté de (Robert et al., 2016a)). (B) Le couplage entre la formation de la CDB méiotique et l'axe des chromosomes associé à la réparation. Chez *S.cerevisiae*, ySpo11 est associée aux régions accessibles de la chromatine dont les promoteurs pauvres en nucléosomes. ySet1 est en complexe avec la RNA polymérase II et dépose H3K4me3 sur ces régions (les étoiles vertes). ySpp1 fait le lien entre ces régions et l'axe des chromosomes en interagissant avec H3K4me3 et yMer2. Chez la souris, SPO11 est associée aux régions proches des loci liés par PRDM9. Grâce à son activité méthyltransférase, PRDM9 dépose H3K4me3 sur les nucléosomes voisins. CXXC1 et EWSR1 ont été proposés pour lier ces régions ciblées par PRDM9 et l'axe des chromosomes. Une fois que la boucle est repliée sur l'axe, SPO11 et la région à cliver sont à proximité des partenaires de SPO11 associés à l'axe et la formation de la CDB est catalysée (schéma adapté de (Borde and de Massy, 2013)).

- Régulation de la formation des CDBs en méiose

Nous avons vu qu'il existe des mécanismes impliqués dans la localisation et la formation des CDBs relativement bien conservés de la levure à la souris. En plus de ces mécanismes permettant de contrôler la localisation des CDBs, il existe un mécanisme permettant de contrôler le nombre de CDBs. En effet, la formation d'une CDB active une boucle de régulation négative qui inhibe en retour la formation d'autres CDBs. Cette régulation est assurée par la kinase ATM. Le recrutement à la cassure de MRN permet le recrutement et l'activation de la kinase ATM (Maréchal and Zou, 2013a). Ensuite, ATM va phosphoryler une large gamme de protéines pour initier la réponse aux dommages à l'ADN. Il a été montré que l'absence d'ATM chez la souris conduit à l'augmentation d'un facteur 10 de la formation des CDBs en méiose (Lange et al., 2011). Ce résultat suggère que l'activation d'ATM par la formation de la CDB méiotique entraîne une cascade de signalisation qui inhibe en retour la formation d'une CDB par SPO11 (Lange et al., 2011). Plus récemment, il a été montré chez *S.cerevisiae* que yTel1 (*TELomere maintenance 1*), l'homologue d'ATM, inhibe la formation de la CDB méiotique avec une portée locale, sur quelques boucles de chromatine méiotique (Garcia et al., 2015). Par conséquent, la formation d'une CDB méiotique inhibe localement la formation de cassures sur des locus adjacents limitant ainsi la formation de ces dernières (Garcia et al., 2015). Le nombre de données concernant les cibles d'ATM au cours de ce processus est encore relativement faible. Cependant, nous savons que yTel1 (ATM) phosphoryle yRec114 et que cette phosphorylation réduit la formation des CDBs induites en méiose (Carballo et al., 2013). Ce résultat suggère que yTel1 (ATM) régule la formation des CDBs en méiose en ciblant directement les protéines accessoires de SPO11 (Carballo et al., 2013).

### II.3.2 La résection au cours de la recombinaison homologue méiotique

Contrairement aux topoisomérases classiques qui sont libérées de l'ADN après l'avoir reliqué, ySpo11 reste liée de manière covalente aux extrémités 5' de la CDB après avoir clivé l'ADN (Keeney et al., 1997). SPO11 doit donc être libérée de la chromatine pour permettre la suite de la recombinaison homologue. Chez *S.cerevisiae*, yMRX intervient à cette étape comme pour une CDB non-accessible en mitose (Garcia et al., 2011). Cependant, le mode de résection en méiose semble varier par rapport au mode mitotique. En effet, seule la résection par yExo1, après yMRX, est nécessaire pour cette étape tandis que l'hélicase ySgs1, qui collabore avec yDna2 pour la résection, semble être dispensable pour la résection en méiose (Mimitou et al., 2016; Zakharyevich et al., 2010).

Chez les mammifères, les modalités de la résection méiotique ne sont pas aussi bien élucidées que chez *S.cerevisiae* et les acteurs impliqués dans la résection pourraient être différents. La polymérase  $\beta$  semble participer à la libération de SPO11 après catalyse d'une CDB chez la souris. En effet, l'inactivation conditionnelle du gène codant la polymérase  $\beta$  dans les cellules germinales provoque une réduction de la libération de SPO11 de l'ADN chez la souris (Kidane et al., 2010). Ce défaut se traduit par une réduction du nombre de foyers RPA, RAD51 et DMC1 probablement due à un problème de maturation de la cassure SPO11. Nous pouvons nous demander comment une polymérase comme la polymérase  $\beta$  peut participer à la résection. Certaines polymérases possèdent une activité exonucléase 3'-5' qui pourrait être utile pour la résection après introduction d'une cassure simple brin de l'ADN près d'un complexe ADN-SPO11. Cependant, la polymérase  $\beta$  n'a pas d'activité exonucléase (Bebenek and Kunkel, 2004). Cette propriété de la polymérase  $\beta$  rend encore plus curieux le fait qu'elle soit impliquée au cours de la résection méiotique

chez la souris. En revanche, la polymérase  $\beta$  a une activité dRP (5'-2-deoxyribose-5-phosphate) lyase qui lui permet d'exciser les désoxyriboses-5-phosphates au cours de la réparation de l'ADN par excision de bases (Sobol and Wilson, 2001). Cependant, il a pas été montré que ce type d'activité pouvait catalyser ou faciliter l'élimination de protéines liées de manière covalente à l'ADN comme SPO11. Il a alors été proposé que la polymérase  $\beta$  pourrait servir de plateforme pour d'autres protéines participant à la résection afin de favoriser la libération de SPO11 de l'ADN (Kidane et al., 2010).

MRE11 intervient au cours de la résection mitotique dans les cellules mammaliennes grâce à ses différentes activités nucléases (Buis et al., 2008; Shibata et al., 2014). De plus, yMRX intervient au cours de la résection méiotique comme pour une CDB non-accessible en mitose chez *S.cerevisiae* (Garcia et al., 2011). La conservation du rôle de MRN au cours de la résection méiotique n'a pas encore été établie. En effet, le rôle de MRE11 au cours de la progression méiotique n'a pu être étudié que grâce à un allèle hypomorphe de *Mre11* caractérisé par une troncation d'un domaine de liaison à l'ADN de la protéine MRE11. Or, les souris hypomorphes pour *Mre11* présentent, en méiose, un nombre de foyers DMC1 comparable aux souris sauvages ce qui suggère que la résection a eu lieu dans ce contexte (Inagaki et al., 2016). Ce résultat suggère deux hypothèses : (1) MRE11 est dispensable pour la résection au cours de la recombinaison méiotique chez la souris ou (2) la troncation de MRE11 associée à cet allèle hypomorphe n'est pas suffisante pour abolir la fonction de MRE11 au cours de la résection méiotique. En absence d'une invalidation conditionnelle de *Mre11* dans les cellules germinales, le rôle de MRE11 au cours de la résection méiotique chez la souris ne pourra pas être exploré.

La résection méiotique dépend aussi de la protéine yExo1 chez *S.cerevisiae* (Mimitou et al., 2016; Zakharyevich et al., 2010). Cependant, nous ne savons pas si ce rôle d'EXO1 est conservé chez la souris. En effet, les souris *Exo1<sup>-/-</sup>* ne présentent de problème méiotique que lors de la formation des COs soit bien plus tard que la résection (Wei et al., 2003). De plus, un mutant de *Exo1* déficient pour son activité nucléase ne présente aucun problème méiotique ni de fertilité (Schaetzlein et al., 2013). Ces résultats pourraient suggérer qu'EXO1 et son activité nucléase sont dispensables pour la résection méiotique chez la souris. Cependant, chez *S.cerevisiae*, même si la longueur des tracts de résection est raccourcie en absence de yExo1, la réparation des CDBs a quand même lieu par recombinaison homologue méiotique (Zakharyevich et al., 2010). Ce résultat suggère que même si la résection est affectée en absence de yEXO1 chez *S.cerevisiae*, la longueur des tracts produits par yMRX est suffisante pour permettre la recombinaison méiotique. Cette situation pourrait être aussi conservée chez la souris, en absence d'EXO1.

La résection mitotique fait également intervenir BLM/DNA2 chez l'Homme (Gravel et al., 2008; Nimonkar et al., 2011). Nous pouvons nous demander si BLM peut conserver ce rôle en méiose chez la souris. L'invalidation conditionnelle de BLM dans les cellules germinales induit une accumulation normale de RAD51 sur les chromosomes méiotiques (Holloway et al., 2010). Ce résultat suggère que la résection a lieu normalement en absence de BLM chez la souris. BLM semble alors être dispensable à la résection méiotique chez la souris, comme ySgs1 chez *S.cerevisiae*. Cependant, nous ne savons pas si DNA2 est nécessaire ou non à la résection méiotique chez la souris. DNA2 pourrait assurer la résection méiotique sans BLM ou en collaboration avec une autre hélicase.

### II.3.3 La recherche et l'invasion d'un brin homologue sur le chromosome homologue

En mitose, RPA lie rapidement l'ADNsb après la machinerie de la résection. Cependant, en méiose et chez la souris, il n'est pas tout à fait établi que RPA soit le premier à lier l'ADNsb. En effet, le fait que le nombre de foyers RAD51 soit plus important que le nombre de foyers RPA en leptotène chez la souris suggère que RAD51 pourrait être chargé sur l'ADNsb avant RPA en méiose (Moens et al., 2002; Plug et al., 1998). Cependant, chez la levure *S.cerevisiae*, yRPA arrive clairement avant yRad51 sur les chromosomes méiotiques (Gasior et al., 1998). Ces résultats suggèrent que des différences puissent exister entre les espèces concernant la cinétique de recrutement de RPA et RAD51 sur l'ADNsb au cours de la recombinaison homologue méiotique.

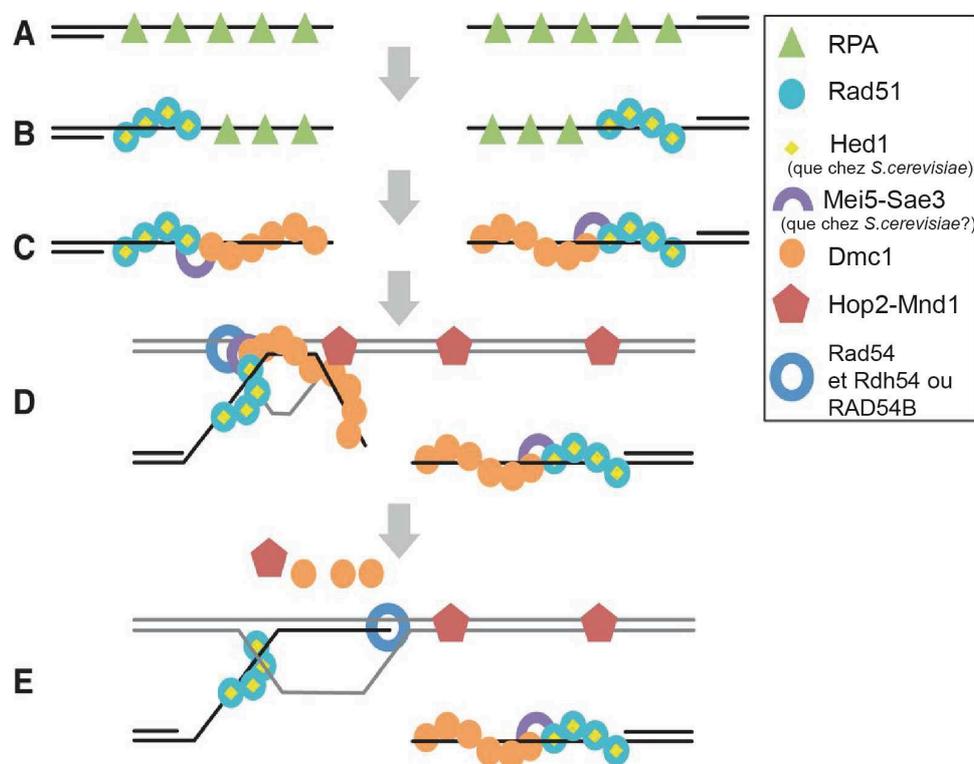
- Le chargement des recombinaisons en méiose

Une fois que de l'ADNsb a été généré par résection, ce dernier est couvert par les recombinaisons pour catalyser la recherche d'homologie afin d'envahir une séquence homologue. Le filament pré-synaptique au cours de la recombinaison méiotique a la caractéristique de présenter une recombinaison en plus de RAD51. Cette recombinaison, DMC1 (*Disrupted Meiotic cDNA 1*) est spécifique et essentielle à la recombinaison méiotique (**Figure 12**). Le rôle de DMC1 au cours de la recombinaison homologue en méiose est largement conservé dans de nombreuses espèces (Bishop et al., 1992; Couteau et al., 1999; Fukushima et al., 2000; Pittman et al., 1998; Schwacha and Kleckner, 1997; Yoshida et al., 1998).

La présence d'une seconde recombinaison au cours de la recombinaison méiotique soulève une question : comment les recombinaisons RAD51 et DMC1 s'organisent pour permettre la progression de la recombinaison méiotique ? La génération récente de mutants de Rad51 capables de former un filament sur l'ADNsb mais incapables de catalyser la recherche d'homologie chez *S.cerevisiae* et *A.thaliana* a permis de fournir des éléments de réponse à cette question. Ces mutants ont permis de montrer que la présence de Rad51 est nécessaire à la recombinaison méiotique mais pas son activité de recherche d'homologie et d'échange de brins (Cloud et al., 2012; Da Ines et al., 2013). En méiose, yDmc1 assurerait la recherche d'homologie et l'invasion du brin homologue et yRad51 serait accessoire en créant probablement des sites d'initiation pour la polymérisation de yDmc1 sur l'ADNsb (Bishop, 2012)(**Figure 12**). Aujourd'hui, ce modèle reste encore à être démontré chez la souris.

Au cours des étapes pré-synaptiques méiotiques, le chargement de DMC1 est stimulé comme pour RAD51 en mitose. BRCA2 joue aussi le rôle de médiateur du chargement des recombinaisons sur l'ADNsb au cours de la recombinaison méiotique. *In vivo*, l'inactivation de *Brca2* est létale chez la souris (Sharan et al., 1997). Un transgène *BRCA2* humain peut restaurer la viabilité des souris invalidées pour *Brca2* (Sharan et al., 2004). Cependant, ce transgène présente une expression réduite dans les gonades. Cette particularité de ce transgène a permis d'étudier le rôle de BRCA2 au cours de la gaméto-genèse. Les souris exprimant ce transgène sont stériles et présentent un défaut de chargement de DMC1 et RAD51 mais aucun défaut pour le chargement de RPA sur les chromosomes méiotiques. Ces résultats suggèrent que BRCA2 est nécessaire à la recombinaison méiotique en permettant le chargement des recombinaisons sur l'ADNsb. Une étude récente *in vitro* a montré que BRCA2 peut stimuler l'activité recombinaison de DMC1 à partir d'un ADNsb couvert par RPA (Martinez et al., 2016). Ces résultats suggèrent que BRCA2 peut charger DMC1 sur un ADNsb couvert par RPA au cours de la recombinaison méiotique (Martinez et al., 2016).

Comme observé au cours de la recombinaison mitotique, yRad52 est nécessaire au chargement de yRad51 en méiose (Gasior et al., 1998, 2001). L'absence de yRad52 induit un délai mais n'abolit pas le chargement de yDmc1 sur les chromosomes méiotiques (Bishop, 1994). Ce résultat suggère que yRad52 a un rôle au cours du chargement de yDmc1 mais qu'en son absence, d'autres facteurs peuvent permettre le chargement de yDmc1. Le dimère yMei5-Sae3 (*MEIosis 5 - Sporulation in the Absence of spo Eleven 3*) pourrait être l'un de ces facteurs car (1) il est nécessaire au chargement de yDmc1 sur les chromosomes méiotiques et (2) interagit avec yDmc1 et promeut la polymérisation de yDmc1 sur le filament RPA-ADNsb (Ferrari et al., 2009)(Hayase et al., 2004; Tsubouchi and Roeder, 2004)(**Figure 12**). L'ensemble de ces résultats suggère que le chargement de yDmc1 requiert absolument yMei5-Sae3 et qu'il serait aidé par yRad52. Le rôle méiotique des homologues de yMei5-Sae3, SWI5-SFR1 (*SWI5 homologous recombination repair protein - SWI5 dependent homologous recombination repair protein 1*), chez les mammifères n'a pas encore été exploré à ce jour et le complexe n'est pas spécifique de la méiose (Argunhan et al., 2017).



**Figure 12 : Modèle de l'assemblage du filament pré-synaptique et de l'invasion du brin homologue en méiose principalement inspiré des données provenant des études chez *S.cerevisiae***

(A) Après résection, RPA couvre l'ADNsb. Cette étape n'a peut-être pas lieu chez la souris comme discuté dans ce manuscrit. (B) RPA est déplacé par les recombinaisons et leurs médiateurs. yRad51 est liée à yHed1 chez *S.cerevisiae*. (C) yDmc1 (DMC1) est chargée grâce à ses médiateurs comme yMei5-Sae3 chez *S.cerevisiae* et BRCA2 chez la souris. Ce filament s'allonge ensuite. (D) DMC1 catalyse la recherche d'homologie et l'invasion d'une séquence homologue sur le chromosome homologue. DMC1 est aidée par HOP2-MND1 qui favorise la formation de la D-loop en stabilisant les interactions entre l'ADNsb envahissant et l'ADNdb. (E) Les translocases comme RAD54 et son paralogue déplacent les recombinaisons et leurs médiateurs pour permettre la formation de l'hétéroduplex (schéma adapté de (Brown and Bishop, 2014)).

- L'invasion du brin homologue et les facteurs accessoires au cours de l'invasion

Lorsque les recombinaisons sont chargées sur l'ADNsb, le filament pré-synaptique peut catalyser la recherche d'homologie et l'invasion d'une séquence homologue. La recombinaison homologue méiotique a la particularité de montrer une préférence pour le chromosome homologue comme matrice de réparation (Cole et al., 2014; Schwacha and Kleckner, 1997). L'hybridation du brin cassé sur le chromosome homologue va produire un hétéroduplex comprenant parfois des mésappariements de l'ADN. Jusqu'à récemment, peu de caractéristiques biochimiques distinguaient RAD51 de DMC1. Elles sont toutes les deux capables de promouvoir la recherche d'homologie et l'invasion pour former une D-loop (Brown and Bishop, 2014). Une étude biophysique menée avec yRad51 et yDmc1 a montré que yRad51 et yDmc1 stabilisent les interactions entre les nucléotides complémentaires de deux ADNsb en faisant des pas de trois nucléotides (ou triplet) (Lee et al., 2015). Lorsqu'un nucléotide n'est pas complémentaire dans un triplet, yRad51 ne stabilise pas les interactions entre nucléotides dans ce triplet. Cependant, yDmc1 est capable de stabiliser ce triplet avec un mésappariement. Cette différence notable entre les deux recombinaisons pourrait refléter le rôle de yDmc1 dans la promotion de l'invasion du chromosome homologue au cours de la recombinaison méiotique (Lee et al., 2015). Cependant, cette différence reste encore à être montrée chez l'Homme ou la souris avec les protéines de ces espèces.

Le modèle actuel de la formation du filament pré-synaptique méiotique propose la formation d'un filament mixte yDmc1-Rad51 avec yRad51 comme protéine accessoire pour yDmc1 (Brown and Bishop, 2014). Cependant, comment est régulée ou inhibée yRad51 pour que le filament n'envahisse pas la chromatide sœur mais le chromosome homologue ? La protéine yHed1 (*High copy suppressor of rEDI*) semble être impliquée dans cette régulation de yRad51. yHed1 est une protéine spécifique de la méiose qui interagit spécifiquement avec yRad51 (Tsubouchi and Roeder, 2006)(**Figure 12**). L'absence de yHed1 restaure la cinétique de réparation des CDBs méiotiques altérée en absence de yDmc1. De plus, la sur-expression de yHed1 dans des cellules mitotiques sensibilise les cellules aux dommages à l'ADN. L'ensemble de ces résultats suggère que yHed1 inhibe yRad51 en méiose pour favoriser l'action de yDmc1 (Tsubouchi and Roeder, 2006). Il a été observé que yHed1 inhibe l'interaction entre yRad51 et yRad54 ou yRdh54 et qu'elle inhibe la formation de D-loops catalysées par yRad51 et yRad54 *in vitro* (Busygina et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que yHed1 empêche yRad51 d'envahir une séquence homologue en inhibant son interaction avec yRad54. Ainsi, yDmc1 peut interagir avec les translocases yRad54 ou yRdh54 pour envahir le chromosome homologue (Busygina et al., 2008). yHed1 ne semble pas être conservée chez la souris (Tsubouchi and Roeder, 2006). Un mécanisme similaire pourrait être conservé chez les mammifères mais le rôle de yHed1 serait alors porté par une autre protéine.

Comme pour RAD51 en mitose, l'envahissement d'une séquence homologue par DMC1 est aussi favorisée par des facteurs accessoires. HOP2 et MND1 (*HOMologous Pairing 2 - Meiotic Nuclear Divisions 1*) font partie de ces protéines accessoires de DMC1. L'invalidation de chaque membre du dimère HOP2-MND1 conduit, chez *S.cerevisiae* et la souris, à l'accumulation de CDBs méiotiques, ce qui suggère que HOP2-MND1 est essentiel à la réparation des CDBs par la recombinaison méiotique (Pezza et al., 2014; Tsubouchi and Roeder, 2002). De manière curieuse, yMnd1 est localisée sur les chromosomes méiotiques en absence de CDBs méiotiques (Tsubouchi and Roeder, 2002). Ce résultat suggère que yHop2-Mnd1 est sur la chromatine avant même le chargement des recombinaisons et l'invasion (Tsubouchi and Roeder, 2002). Des études *in vitro* ont montré que yHop2-Mnd1 et HOP2-MND1 stimulent la formation de D-loops catalysées par yDmc1 ou DMC1 (Petukhova et al., 2005)(Chen et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le dimère

HOP2-MND1 assiste l'invasion d'une chromatide du chromosome homologue catalysée par le filament DMC1-RAD51 (**Figure 12**).

### II.3.4 La régulation des intermédiaires post-synaptiques en méiose

- La polymérisation de l'ADN

Après l'invasion du brin homologue, la synthèse d'ADN se fait dans la D-loop comme expliqué plus tôt (voir paragraphe I.2.6 Régulation des intermédiaires post-synaptiques). La synthèse dans une D-loop générée après l'invasion d'une chromatide du chromosome homologue peut poser un problème pour les polymérases : l'amorce pour la synthèse d'ADN n'est pas totalement complémentaire au brin matrice. Certaines polymérases dépourvues d'activité exonucléase, comme la polymérase  $\beta$ , sont incapables d'initier une synthèse d'ADN lorsque un mésappariement de l'ADN est à l'extrémité 3'-OH (Bebenek and Kunkel, 2004). Par contre, la polymérase  $\delta$ , chez l'Homme et chez *S.cerevisiae*, possède cette activité exonucléase (Fazlieva et al., 2009; Jin et al., 2005). Or, chez *S.cerevisiae*, nous savons que la polymérase  $\delta$  est impliquée dans la recombinaison homologue méiotique et plus précisément dans la formation des COs méiotiques (Maloisel et al., 2004). Ce résultat suggère que les polymérases possédant une activité exonucléase pourraient être impliquées au cours de l'extension de la D-loop en méiose. Cependant, aucune ADN polymérase n'a été décrite comme essentielle à la recombinaison méiotique chez les mammifères. Les mammifères possèdent 16 ADN polymérases (McVey et al., 2016). Il est alors probable que les polymérases aient des rôles redondants au cours de la synthèse dans la D-loop en méiose chez les mammifères.

Les mésappariements de l'ADN dans la D-loop peuvent être également corrigés par le mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN (ou *mismatch repair*) en complément d'une activité exonucléase d'une ADN polymérase. Le mécanisme de réparation des mésappariements de l'ADN fait intervenir de nombreuses protéines à la fois en mitose et en méiose comme MLH1 (MutL Homolog 1) (Spies and Fishel, 2015). Dans ce manuscrit, nous traiterons essentiellement du rôle plus tardif de MLH1, au cours de la formation des COs méiotiques essentiels à la bonne ségrégation des chromosomes homologues.

- La répression de la formation des COs en méiose

Le démantèlement d'une D-loop permet d'empêcher la formation d'un CO, après la synthèse d'ADN dans cette D-loop. Une telle régulation en méiose permet de contrôler le nombre de COs formés par paires de chromosomes homologues. Nous avons vu précédemment que le démantèlement d'une D-loop requiert l'action de protéines hélicases au cours de la recombinaison mitotique (voir paragraphe II.2.6 Régulation des intermédiaires post-synaptiques). Chez *S.cerevisiae*, l'hélicase  $\gamma$ Sgs1 (avec Top3 et Rmi1) a été proposée comme étant responsable du démantèlement de la D-loop étendue pour mener les intermédiaires de la recombinaison vers la voie du SDSA au cours de la recombinaison méiotique (Kaur et al., 2015; De Muyt et al., 2012; Oh et al., 2008; Tang et al., 2015) (**Figure 13**). Cependant, il a été proposé que le complexe Sgs1-Top3-Rmi1 contrôle aussi la formation des NCOs via la dissolution comme en mitose (Kaur et al., 2015; Tang et al., 2015) (**Figure 13**). Des mutations de RECQA ou B (homologues de  $\gamma$ Sgs1 chez *A.thaliana*), ou TOP3 chez *A.thaliana* ou l'inactivation conditionnelle de *Blm* chez la souris provoquent une augmentation de la fréquence de formation des COs méiotiques (Holloway et al., 2010; Séguéla-Arnaud et al., 2015). Ces résultats suggèrent que les rôles de  $\gamma$ Sgs1-Top3-Rmi1 sont conservés chez les plantes et les mammifères. Cependant, ces résultats ne permettent pas de distinguer si ce complexe agit principalement sur le

démantèlement des D-loops étendues ou sur la dissolution des jonctions doubles de Holliday chez ces espèces (**Figure 13**).

Le complexe BLM-TopoIII-Rmi1/2 ne constitue pas le seul système responsable du démantèlement des D-loops étendues au cours de la recombinaison méiotique. Il a été proposé que l'homologue de l'hélicase FANCM chez la plante *A.thaliana* et la levure *S.pombe* soit impliqué dans la répression de la formation des COs en favorisant la voie du SDSA comme voie de réparation des CDBs en méiose (Crismani et al., 2012; Lorenz et al., 2012)(Girard et al., 2015)(**Figure 13**).

La voie du SDSA et la dissolution des jonctions doubles de Holliday sont deux voies de répression de la formation des COs. Cependant, en méiose, une troisième voie indépendante a récemment été proposée. Cette voie fait intervenir la protéine FIGL1 (*FIDGETIN-LIKE-1*) chez *A.thaliana* (Girard et al., 2015). FIGL1 ne semblerait pas agir sur la D-loop étendue mais sur le filament RAD51-DMC1 en méiose. FIGL1 humaine interagit avec RAD51 (Yuan and Chen, 2013). Il a ainsi été proposé que FIGL1 interagisse avec les filaments RAD51/DMC1 pour les dissocier afin de réguler l'invasion au cours de la recombinaison méiotique chez *A.thaliana* (Girard et al., 2015). Le rôle anti-CO de FIGL1 en méiose pourrait être conservé chez la souris car FIGL1 a été identifiée comme étant importante pour la progression méiotique chez la souris (L'Hôte et al., 2011).

- Promotion de la formation des COs en méiose

En opposition aux facteurs anti-COs méiotiques capables de dissocier des D-loops étendues et de favoriser la voie du SDSA, d'autres facteurs sont impliqués dans la stabilisation des intermédiaires de la recombinaison homologue. Ces intermédiaires stabilisés vont pouvoir être orientés vers la voie des COs afin de générer au moins un CO par paire de chromosomes homologues. Chez *S.cerevisiae*, des protéines dont le rôle est de stabiliser ou de promouvoir la formation des intermédiaires tardifs de la recombinaison homologue ont été classées dans un groupe : le ZMM (**Figure 13**). Cet acronyme provient des acteurs impliqués dans ce mécanisme chez *S.cerevisiae* qui sont : Zip1/2/3/4 (*molecular ZIPper 1, 2 3 et 4*), Msh4/5 (*MutS Homolog 4 et 5*) et Mer3 (*MEiotic Recombination 3*) (Lynn et al., 2007). Chez la souris, presque tous les membres du ZMM sont conservés avec : SYCP1 (Zip1), RNF212 (*Ring Finger Protein 212*)(Zip3), HEI10 (*Human Enhancer of Invasion clone 10*)(Zip3), TEX11 (*Testis Expressed sequence 11*)(Zip4), MSH4 et 5 et HFM1 (*Helicase Family Member 1*) (Mer3) (Adelman and Petrini, 2008; Edelmann et al., 1999; Guiraldelli et al., 2013; Hunter, 2015; Kneitz et al., 2000; De Vries et al., 1999; Vries et al., 2005; Yang et al., 2008). Jusqu'à ce jour, aucun orthologue de yZip2 n'a été identifié chez la souris et l'Homme.

Les membres du ZMM peuvent être classés en trois sous-groupes sur la base de critères fonctionnels : (1) des protéines ayant des similitudes avec des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN comme yMer3/HFM1 et MSH4-MSH5, (2) les protéines impliqués dans la modification post-traductionnelle par SUMOylation (*Small Ubiquitin-related Modifier*) ou ubiquitination comme HEI10, RNF212, yZip2, yZip3 et yZip4 et enfin (3) des membres du complexe synaptonémal comme yZip1 et SYCP3 (Lynn et al., 2007). L'importance de protéines du complexe synaptonémal au cours de la recombinaison méiotique a déjà été traité précédemment (voir partie I.3 Les cohésines et le complexe synaptonémal structurent l'architecture des chromosomes au cours de la prophase I de méiose). Nous traiterons donc en détail les rôles de membres des deux premiers sous-groupes du ZMM. Nous commencerons par passer en revue les rôles de yMer3/HFM1 et MSH4-MSH5 au cours de la promotion de la formation d'intermédiaires tardifs de la recombinaison

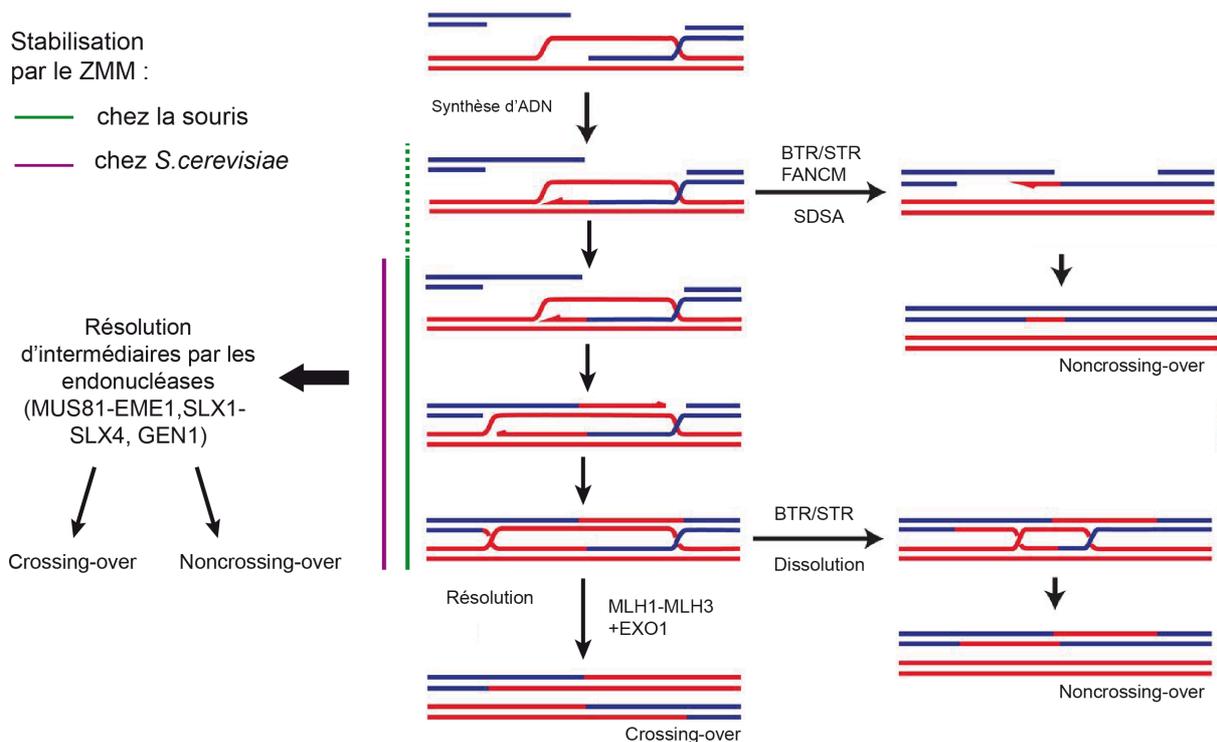
méiotique. Ensuite, nous verrons comment HEI10 et RNF212, deux protéines SUMO ou ubiquitine ligases peuvent orchestrer la formation des COs méiotiques chez la souris.

Au cours de la recombinaison homologe, l'extension de la D-loop précède la formation d'une jonction double de Holliday. yMer3 ou yHFM1 est une hélicase qui peut promouvoir l'extension de l'hétéroduplex dans une D-loop, *in vitro* (Mazina et al., 2004). yMer3 et HFM1 sont des facteurs pro-COs car leur invalidation réduit la fréquence de formation des COs chez *S.cerevisiae*, la souris et *A.thaliana* (Börner et al., 2004; Guiraldelli et al., 2013; Mercier et al., 2005; Nakagawa and Ogawa, 1999). De plus, l'activité hélicase de yMer3 contribue à son rôle pro-COs (Nakagawa and Kolodner, 2002). De manière intéressante, il a récemment été proposé que yMer3 possède aussi un rôle, indépendant de son rôle pro-COs, dans la répression de l'extension de la D-loop (Duroc et al., 2017). Ce rôle est indépendant de l'activité hélicase de yMer3 et repose sur son interaction avec ses partenaires yMlh1-Mlh2 (*MutL Homolog 1 et 2*) (Duroc et al., 2017). Un modèle a été proposé pour uniformiser les rôles de yMer3 au cours de la recombinaison méiotique : dans un premier temps, (1) yMer3 pourrait lier les D-loops naissantes pour amorcer leur extension. Puis, (2) yMlh1-Mlh2 interagirait avec yMer3 pour empêcher la sur-extension de la D-loop. Enfin, (3) yMer3 promouvoir tardivement la formation des COs grâce à son activité hélicase (Duroc et al., 2017).

Les intermédiaires de la recombinaison méiotique peuvent être stabilisés et protégés de l'action des hélicases pour éviter leur démantèlement et promouvoir la formation de jonctions doubles de Holliday. Le dimère MSH4-MSH5 assurerait cette stabilisation des intermédiaires de la recombinaison méiotique. Les mutants *Msh4* et *Msh5* chez *S.cerevisiae* présentent une réduction drastique de la fréquence de formation des COs (Hollingsworth et al., 1995; Ross-Macdonald and Roeder, 1994). Cependant, la formation des NCOs n'est pas affectée en absence de yMsh5 (Börner et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le ZMM intervient presque exclusivement dans la formation des COs chez *S.cerevisiae*.

Cette exclusivité du ZMM pour la formation des COs n'est probablement pas conservée chez la souris. En effet, le nombre de foyers MSH4 chez la souris est bien supérieur au nombre de COs formés par cellules méiotiques soit environ 150 foyers MSH4 pour 25 COs (Kneitz et al., 2000). Ces résultats suggèrent que des intermédiaires pris en charge précocement par le ZMM peuvent être convertis en NCO au cours de la recombinaison méiotique chez la souris.

Enfin, il a été montré plus tard que le dimère humain MSH4-MSH5 lie préférentiellement les jonctions de Holliday *in vitro* (Snowden et al., 2004). Ce résultat et le fait que le dimère soit essentiel pour la progression de la recombinaison méiotique et la formation des COs suggèrent que MSH4 et MSH5 interagissent avec les intermédiaires de la recombinaison post-synpatiques. Cette interaction stabilise ces intermédiaires et permet leur progression vers la voie des COs (Snowden et al., 2004). Cette liaison s'oppose probablement à l'action des hélicases qui peuvent démanteler les intermédiaires de la la recombinaison en méiose.



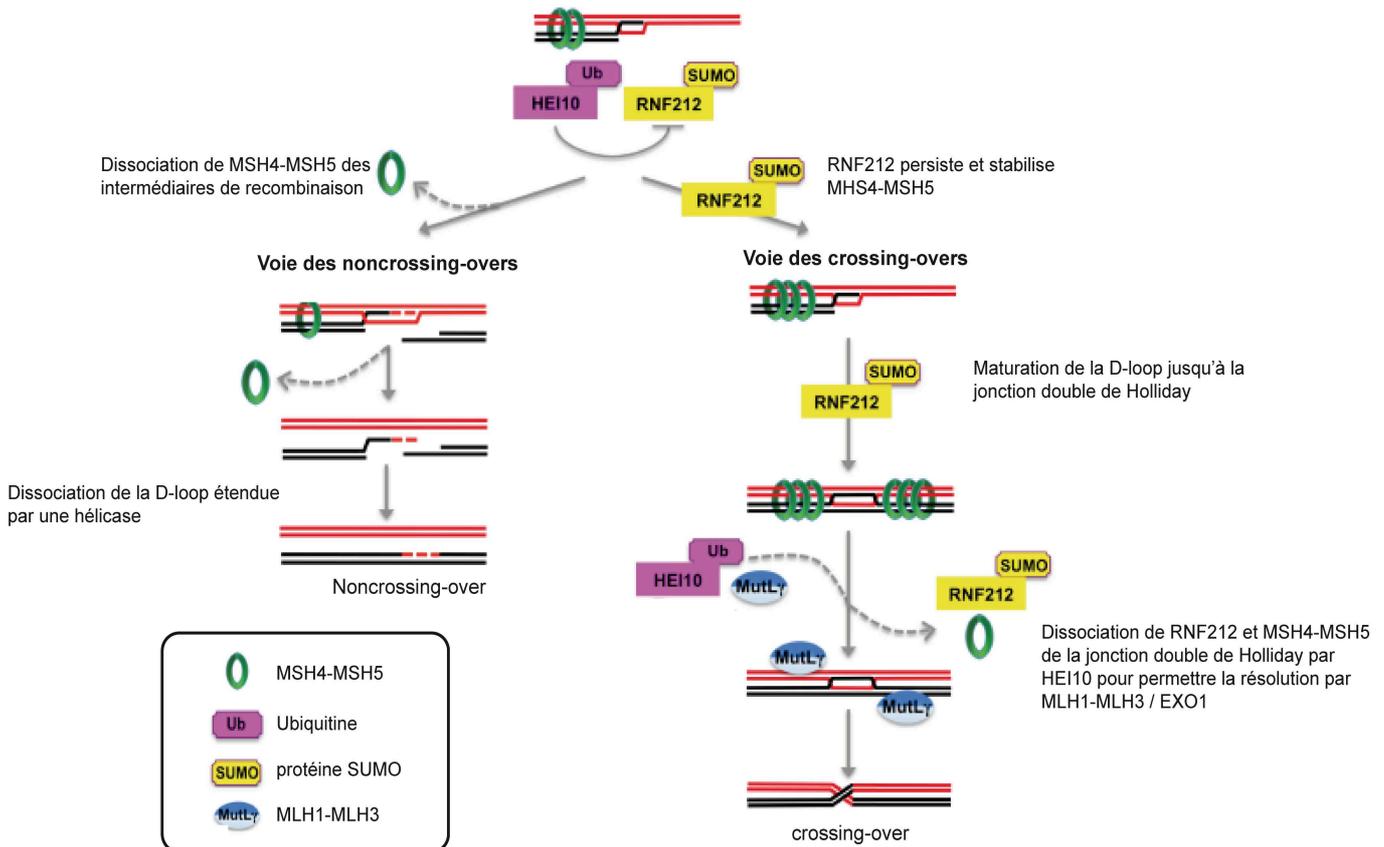
**Figure 13 : Modèle de la régulation post-synaptique de la recombinaison homologue méiotique**

Après l'invasion d'une chromatide du chromosome homologue, certains intermédiaires de recombinaison peuvent être stabilisés par les membres du ZMM pour faciliter leur progression vers la formation d'un CO. Chez la souris, une proportion des intermédiaires stabilisés dans un premier temps par le ZMM est ensuite orientée vers une voie de formation de NCOs, le SDSA ou la dissolution, par des hélicases et BTR (BLM-Topo III $\alpha$ -RMI1-2). Alors que chez *S.cerevisiae*, les NCOs sont formés de manière indépendante des ZMM ce qui suggère que les ZMM prennent en compte principalement des intermédiaires qui deviendront des COs (Lynn et al., 2007). Les NCOs seraient formés par le SDSA ou la dissolution de la jonction double de Holliday par STR ( $\gamma$ Sgs1-Top3-Rmi1) chez *S.cerevisiae*. MutL $\gamma$  (MLH1-MLH3) est aidé par EXO1 pour former des COs à partir d'intermédiaires stabilisés par le ZMM. Certains intermédiaires sont résolus par les endonucléases comme MUS81-EME1, SLX1-SLX4, GEN1 en COs ou NCOs (schéma adapté de (Kowalczykowski, 2015)).

Les modifications post-traductionnelles par SUMOylation ou ubiquitination régulent de nombreux mécanismes dont la recombinaison méiotique. RNF212 et HEI10 sont deux protéines homologues de la protéine SUMO E3 ligase  $\gamma$ Zip3 chez *S.cerevisiae* (Hunter, 2015).  $\gamma$ Zip3 est importante pour la formation des COs en méiose (Agarwal and Roeder, 2000). Son homologue murin, RNF212, est aussi une SUMO ligase. De manière analogue au mutant  $\gamma$ Zip3, l'absence de RNF212 conduit à une absence presque totale des COs dans les cellules méiotiques en métaphase I (Reynolds et al., 2013). De plus, l'absence de RNF212 altère le maintien de MSH4 sur les nodules de recombinaison. L'ensemble de ces résultats suggère que RNF212 joue un rôle majeur dans la régulation de la formation des COs en méiose et que son action passerait par une stabilisation de MSH4-MSH5 sur les intermédiaires de recombinaison (Reynolds et al., 2013) (Figure 14). HEI10 jouerait plutôt un rôle d'antagoniste de RNF212 (Qiao et al., 2014). HEI10 est une ubiquitine ligase qui promeut la dissociation de RNF212 et MSH4-MSH5 des chromosomes méiotiques (Figure 14). Sans cette action de HEI10, RNF212 reste associée à MSH4-MSH5 et la progression de la recombinaison méiotique ainsi que la formation des COs sont altérées. Ces résultats ont permis de mettre en place un modèle dans lequel RNF212 permet la stabilisation des intermédiaires de recombinaison via une stabilisation de MSH4-MSH5 sur ces intermédiaires. Ces intermédiaires progressent dans la recombinaison

homologue puis HEI10 permet la dissociation de RNF212 et MSH4-MSH5 de ces intermédiaires pour qu'ils puissent progresser jusqu'à la formation des COs (Qiao et al., 2014)(Figure 14).

Grâce à leur activités SUMO et ubiquitine ligases, HEI10 et RNF212 pourraient réguler la recombinaison homologue méiotique en modifiant des acteurs de la recombinaison. Les cibles protéiques de RNF212 et HEI10 au cours de la recombinaison méiotique sont pas encore identifiées à ce jour. MSH4-MSH5 pourrait être une cible de RNF212 car le dimère est souvent associé avec RNF212 sur les intermédiaires de la recombinaison méiotique et que la persistance de MSH4-MSH5 sur ces intermédiaires dépend de RNF212 (Reynolds et al., 2013).



**Figure 14 : Modèle de la régulation de la formation des COs et des NCOs par HEI10 et RNF212 chez la souris**

Le dimère MSH4-MSH5 interagit avec les intermédiaires post-synaptiques pour les stabiliser. RNF212 est associée à ce dimère et stabilise sa position sur les intermédiaires. En revanche, HEI10 peut dissocier ces protéines des intermédiaires de recombinaison pour favoriser la voie de formation des NCOs. Si RNF212 et MSH4-MSH5 persistent, la maturation de la D-loop progresse jusqu'à la formation de la jonction double de Holliday. A ce moment, HEI10 joue un second rôle, un rôle pro-COs, en dissociant RNF212 et MSH4-MSH5 de la jonction double de Holliday pour permettre la résolution de cette dernière par le dimère MLH1-MLH3 aidé par EXO1 (schéma adapté de (Qiao et al., 2014)).

### II.3.5 La résolution des intermédiaires de la recombinaison méiotique en crossing-over

Grâce à leur stabilisation par les membres du ZMM, les intermédiaires de la recombinaison homologue peuvent progresser jusqu'à la formation d'une jonction double de Holliday qui pourra être convertie en CO ou NCO. Comme en mitose, la jonction double de Holliday peut être soit dissoute soit résolue (voir paragraphe II.2.5 Dissolution et résolution de la jonction double de Holliday). Le dimère MLH1-MLH3 (*MutL Homolog 1* et 3) catalyserait la résolution des jonctions doubles de Holliday en COs au

cours de la recombinaison méiotique chez de nombreux organismes. En méiose, MLH1 et MLH3 (yMlh1 et yMlh3) sont nécessaires à la formation normale des COs chez la souris et *S.cerevisiae* (Baker et al., 1996; Edelman et al., 1996; Hunter and Borts, 1997; Lipkin et al., 2002; Wang et al., 1999). De plus, yMlh1 et yMlh3 forment un complexe en méiose et chez la souris, ces deux protéines co-localisent en foyers discrets en pachytène et le nombre de ces foyers coïncide avec le nombre de chiasmata formés (Baker et al., 1996; Lipkin et al., 2002; Wang et al., 1999). L'ensemble de ces résultats suggère que MLH1 et MLH3 sont impliqués dans la résolution de la jonction double de Holliday en CO (**Figures 13 et 14**).

Les évidences cytologiques et génétiques suggèrent que le dimère MLH1-MLH3 pourrait être impliqué dans la résolution de la jonction double de Holliday en CO. Cependant, aucune donnée biochimique ne montrait que ce dimère pouvait présenter une activité endonucléase, comme MUS81-EME1, indispensable pour cette étape. Des études récentes ont montré que le dimère yMlh1-Mlh3 purifié pouvait présenter une activité endonucléase *in vitro* (Ranjha et al., 2014; Rogacheva et al., 2014). Cependant, cette activité n'a été démontrée que sur de l'ADNbd et non sur une jonction de Holliday. Un modèle récent propose que yMlh1-Mlh3 ne clive pas directement la jonction de Holliday comme une endonucléase telle que yMus81-Mms4. yMlh1-Mlh3 a la capacité de reconnaître la jonction de Holliday et former des polymères sur l'ADNbd et cette formation de polymères stimule l'activité endonucléase du dimère (Manhart et al., 2017; Ranjha et al., 2014). yMlh1-Mlh3 introduit ensuite des cassures simple brin de l'ADN sur l'ADNbd, près des jonctions de Holliday. Ces cassures permettent de résoudre la jonction double de Holliday en CO après migration des jonctions de Holliday (Manhart et al., 2017). Ce modèle reste encore à être confirmé *in vivo*. Cependant, la formation de polymères de yMlh1-Mlh3 pourrait expliquer pourquoi MLH1 est visible en foyers au cours des stades tardifs du pachytène alors que la protéine n'est pas visible dans d'autres contextes comme lors de la réparation des mésappariement de l'ADN (ou *mismatch repair*) (Baker et al., 1996).

Le dimère MLH1-MLH3 n'agirait pas seul au cours de la résolution des jonctions doubles de Holliday en COs. EXO1 participerait à cette résolution avec MLH1-MLH3. EXO1 est nécessaire chez la souris et *S.cerevisiae* pour la formation des COs en méiose (Wei et al., 2003; Zakharyevich et al., 2010). Cependant, son activité nucléase est dispensable pour son activité pro-CO (Schaetzlein et al., 2013; Zakharyevich et al., 2010). En revanche, il a été montré que l'interaction entre yExo1 et yMlh1 est importante pour l'activité pro-CO de yExo1 et yMlh1 (Zakharyevich et al., 2010). Ces résultats suggèrent que yExo1 agit comme un co-facteur de yMlh1-Mlh3 au cours de la résolution des jonctions doubles de Holliday en COs (Zakharyevich et al., 2010)(**Figures 13 et 14**). Cependant, nous ne savons pas aujourd'hui comment yExo1 aide yMlh1-Mlh3 pour résoudre les jonctions doubles de Holliday en COs. yExo1 pourrait stimuler l'activité endonucléase de yMlh1-Mlh3 ou stimuler la polymérisation du dimère.

MLH1-MLH3/EXO1 ne constituent pas le seul système responsable de la conversion des jonctions doubles de Holliday en méiose. Chez *S.cerevisiae*, l'absence de yMlh1 ou yExo1 n'abolit pas complètement la formation des COs (Zakharyevich et al., 2010). Ce résultat suggère que d'autres systèmes peuvent contribuer à la conversion des jonctions doubles de Holliday au cours de la recombinaison méiotique. D'autres voies de conversion des intermédiaires en produits de la recombinaison méiotique impliquent l'hélicase ySgs1, et les endonucléases yMus81-Mms4, ySlx1-Slx4 et yYen1 (Zakharyevich et al., 2012).

Chez la souris, le traitement, indépendant de MLH1-MLH3, des jonctions doubles de Holliday en méiose pourrait suivre un modèle similaire. Cependant, seuls les rôles de BLM et MUS81 au cours de la recombinaison méiotique ont été explorés chez la souris. L'analyse détaillée de la prophase I de méiose des souris *Mus81<sup>-/-</sup>* a révélé une persistance de BLM sur les chromosomes méiotiques mais un nombre normal de

COs après la prophase I (Holloway et al., 2008). Ce résultat suggère que BLM, probablement avec Topo III $\alpha$  et RMI1 et 2, est intervenue pour dissoudre les jonctions doubles de Holliday formées en méiose normalement résolues par MUS81-EME1 (**Figure 13**). Enfin, l'implication des endonucléases SLX1-SLX4 et GEN1 au cours de la résolution en méiose n'a pas été explorée chez la souris en dépit du fait que les souris invalidées pour les gènes codant ces endonucléases sont viables (Castor et al., 2013; Wang et al., 2016b).

Dans ce chapitre, nous avons passé en revue les événements qui prennent place lors de la réparation des CDBs par la recombinaison homologe et les spécificités de la recombinaison homologe en méiose qui lui permettent de former les COs entre chromosomes homologues. Nous avons également pu voir qu'un certain nombre d'acteurs de la recombinaison interviennent à la fois en mitose et en méiose au cours de la recombinaison homologe alors que d'autres sont spécifiques de la méiose. Mon travail de thèse consistait à étudier un de ces facteurs spécifiques de la méiose et son partenaire : MEIOB (*Meiosis-specific with OB domain-containing protein*) et SPATA22 (*Spermatogenesis-associated protein 22*). MEIOB étant un paralogue d'une sous-unité du complexe RPA, nous avons cherché à comprendre les interactions fonctionnelles entre MEIOB-SPATA22 et RPA pour comprendre comment MEIOB et SPATA22 pourraient apporter des spécificités à la recombinaison méiotique. Dans le prochain chapitre, nous résumerons les connaissances que nous avons sur le rôle de RPA au cours de la recombinaison homologe. Nous présenterons ensuite l'état actuel des connaissances sur MEIOB et SPATA22, deux facteurs récemment identifiés.

### III. Replication protein A (RPA) est un complexe essentiel au métabolisme de l'ADN

RPA est un trimère capable de lier l'ADNsb avec une très forte affinité (Fanning et al., 2006). Il est pour cela impliqué dans plusieurs mécanismes du métabolisme de l'ADN qui présentent au moins à une étape une génération d'ADNsb (Wold, 1997). Dans le chapitre qui va suivre, nous détaillerons les caractéristiques moléculaires de RPA. Nous détaillerons ensuite la régulation de son activité de liaison à l'ADNsb au cours de la recombinaison homologe. En particulier, nous verrons comment les interactions entre RPA et ses partenaires peuvent moduler les activités de RPA pour assurer le bon déroulement de la recombinaison homologe.

#### III.1 Généralités sur RPA

##### III.1.1 Découverte de RPA

La réplication du génome du virus simien SV40 (Simian Virus 40) a été un modèle de référence pour l'étude de la réplication *in vitro* (Fanning and Zhao, 2009). Wold et Kelly ont montré en 1988 que la réplication du virus SV40 nécessite la présence de RPA (Wold and Kelly, 1988). RPA est un trimère composé d'une grande sous-unité de 70 kDa environ, une moyenne d'environ 30 kDa et une petite de 14 kDa. Ces sous-unités ont été appelées par la suite RPA1, RPA2 et RPA3 respectivement. Toujours dans cette même étude, Wold et Kelly ont montré que RPA purifié est capable de lier l'ADNsb. Ainsi commencèrent plus de vingt-cinq ans d'étude sur ce facteur impliqué dans une large gamme de mécanismes.

##### III.1.2 Conservation de RPA

Le trimère RPA est particulièrement conservé chez l'ensemble des eucaryotes (Wold, 1997). Chaque sous-unité présente entre 25 et 30 % d'identité entre les protéines humaines et les protéines de *S.cerevisiae*. La conservation de RPA chez les eucaryotes suggère que les trois gènes codant les sous-unités de RPA sont des gènes ancestraux. L'apparition de ces gènes pourrait être contemporaine à l'apparition des eucaryotes, il y a plus d'un milliard d'années (Koumandou et al., 2013). De plus, la découverte d'un complexe similaire à RPA chez les archéobactéries, avec la grande sous-unité partageant des similitudes avec RPA1 (Komori and Ishino, 2001), nous laisse suggérer que l'ancêtre de RPA est peut-être encore plus ancien. L'ancestralité des gènes codant les sous-unités de RPA suggère que RPA est un complexe essentiel pour la cellule eucaryote.

##### III.1.3 Les différents rôles de RPA au cours du métabolisme de l'ADN

Dans les cellules, de nombreux mécanismes du métabolisme de l'ADN sont susceptibles de générer de l'ADNsb car la lecture de l'ADN se fait couramment sous sa forme simple brin. Par exemple, au cours de la réplication, les deux brins d'ADN sont dissociés pour la synthèse de l'ADN et au cours de la recombinaison homologe, de l'ADNsb est généré pour catalyser la recherche d'homologie (Fragkos et al.,

2015; Kowalczykowski, 2015). RPA est un trimère avec une très forte affinité pour l'ADNsb (Fanning et al., 2006). Cette forte affinité pour l'ADNsb place RPA comme un potentiel acteur du métabolisme de l'ADN. Or chez *S.cerevisiae*, les gènes codant les trois sous-unités du complexe RPA sont essentiels (Brill and Stillman, 1991; Heyer et al., 1990). Chez la souris, une mutation ponctuelle conçue dans le but d'altérer la liaison à l'ADNsb de RPA1 est létale à l'état homozygote (Wang et al., 2005). Ces phénotypes montrent que RPA est impliqué au cours d'un ou de plusieurs mécanismes essentiels pour la survie cellulaire. Par la suite, il a été montré grâce à des études sur des allèles plus permissifs de yRPA1 et yRPA2 que yRPA est essentiel à (1) la réplication, (2) la recombinaison homologue mitotique et (3) la réparation par excision de nucléotides (REN)(Longhese et al., 1994; Santocanale et al., 1995; Umezu et al., 1998). Dans les cellules humaines, la réduction du stock de RPA provoque la formation de CDBs de l'ADN pendant la phase S (Toledo et al., 2014). De plus, RPA interagit avec RAD51 et co-localise partiellement avec ce dernier après irradiations des cellules humaines (Golub et al., 1998). Enfin, RPA interagit avec des acteurs majeurs de la REN comme XPA et XPG (*Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group A et G*) (He et al., 1995). L'ensemble de ces résultats suggère que les rôles de RPA au cours de la réplication, la recombinaison homologue et la REN pourraient être conservés de la levure à l'Homme.

Le rôle de RPA au cours de la recombinaison méiotique a d'abord été étudié chez la levure *S.cerevisiae*. Ces études ont montré que RPA est nécessaire à la recombinaison homologue méiotique (Soustelle et al., 2002). Chez l'Homme et la souris, RPA est recruté sur les chromosomes méiotiques précocement en zygotène et est maintenu jusqu'en pachytène (Oliver-Bonet et al., 2007; Plug et al., 1998). Ces résultats suggèrent que RPA a des rôles précoces et tardifs au cours de la recombinaison homologue en méiose chez l'Homme et la souris (Oliver-Bonet et al., 2007; Plug et al., 1998). Cependant, ces données ne permettent pas de savoir à quelles étapes précises de la recombinaison méiotique intervient RPA. D'après les données provenant de l'étude de la recombinaison mitotique, RPA pourrait être recruté sur l'ADNsb pré-synaptique, la D-loop et pourrait intervenir au cours de la second-end capture au cours de la recombinaison méiotique (Kowalczykowski, 2015). De manière générale, RPA est susceptible de lier tous les tracts d'ADNsb générés au cours de la recombinaison méiotique.

Les plantes constituent une opportunité, d'un point de vue génétique, pour décortiquer les différents rôles de RPA au cours du métabolisme de l'ADN et en particulier au cours de la recombinaison méiotique. En effet, les plantes ont dupliqué et conservé des homologues de RPA1. Un homologue de RPA1 peut alors être invalidé sans porter atteinte à la survie de la plante. Il a ainsi pu être observé que RPA1C et RPA1A assurent des rôles précoces et redondants au cours de la réparation des CDBs par recombinaison méiotique (Aklilu et al., 2014). De plus, il a été suggéré que RPA1A intervient à une étape tardive de la recombinaison méiotique conduisant à la formation des COs comme la second-end capture (Osman et al., 2009). Les études des homologues de RPA1 chez *A.thaliana* suggèrent un besoin de RPA aux étapes précoces et tardives de la recombinaison méiotique comme ce qui est suggéré chez les mammifères. Cependant, nous ne savons pas comment RPA1A peut assurer la second end capture au cours de la recombinaison méiotique ni avec quelle protéine RPA1A collabore pour cette étape.

De nombreuses données de la littérature suggèrent que RPA et sa capacité de lier l'ADNsb occupent une place centrale dans le métabolisme de l'ADN. Dans la suite de ce chapitre, nous explorerons les découvertes sur la structure de RPA et sur ses activités biochimiques associées à sa liaison à l'ADNsb qui ont permis de mieux comprendre les modalités d'interactions entre RPA et l'ADNsb. Nous verrons ensuite

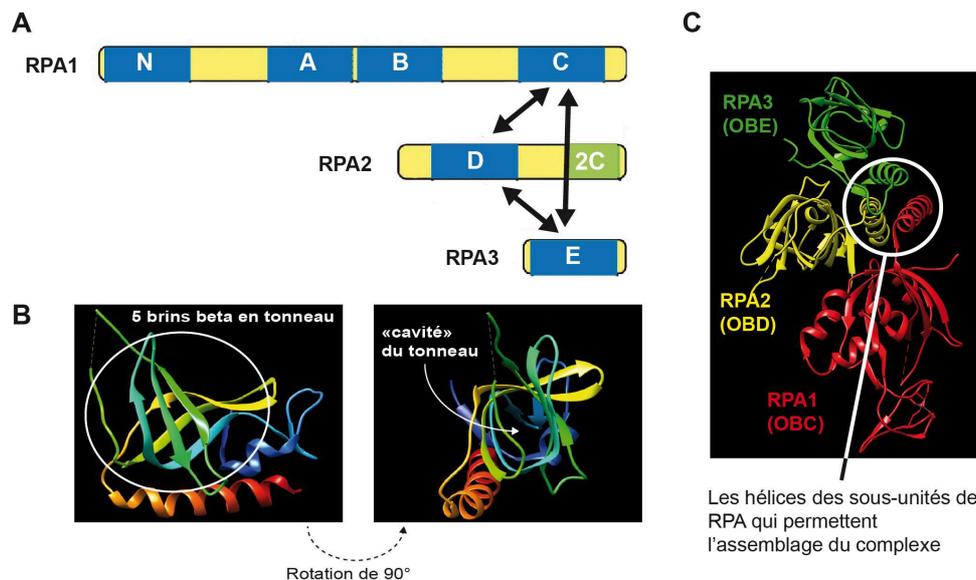
comment les partenaires de RPA peuvent réguler les interactions entre RPA et l'ADNsb pour assurer la progression de la recombinaison homologue.

### III.2 Les propriétés structurales et biochimiques de RPA

#### III.2.1 Structure de RPA

RPA est un trimère avec une grande sous-unité, une moyenne et une petite. La structure de RPA a été résolue par étapes, en cristallisant d'abord des parties de RPA1, puis RPA2 avec RPA3 et enfin les domaines des trois protéines essentiels pour la formation du complexe (Bochkarev et al., 1997, 1999, Bochkareva et al., 2002, 2005)(Bochkarev et al., 1997, 1999, Bochkareva et al., 2002, 2005). Ces études ont montré que le complexe RPA possède six repliements protéiques particuliers appelés OB-folds (*Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding*) dont quatre sont en tandem dans la grande sous-unité RPA1 (**Figure 15A**). L'OB-fold est un repliement protéique caractérisé par 5 à 6 brins beta organisés en tonneau plus ou moins écrasé (**Figure 15B**). Les domaines résolus par cristallographie révèlent que les OB-folds de RPA ne sont pas organisés seuls en domaines (Gomes and Wold, 1995, 1996; Kim et al., 1996; Lin et al., 1996). Ils sont souvent accompagnés de structures secondaires annexes comme des brins beta ou des hélices alpha (**Figure 15B**). Pour faire la distinction entre le repliement OB-fold et les domaines contenant des OB-folds, nous utiliserons le terme « domaine OB-fold » pour ces derniers.

Les modalités d'interaction entre les sous-unités de RPA ont aussi été étudiées par cristallographie. Ainsi, la partie C-terminale de RPA1 nécessaire pour son interaction avec les deux domaines OB-folds de RPA2 et RPA3 ont été cristallisés ensemble (Bochkareva et al., 2002). Cette étude a permis de montrer que le trimère RPA est formé grâce à la collaboration de ses trois sous-unités. Cette collaboration se fait via l'interaction entre des hélices, une pour chaque sous-unité de RPA, provenant des domaines OB-folds de chaque sous-unité (**Figure 15C**). RPA est donc un trimère qui a la caractéristique de présenter six domaines OB-folds dont quatre sont en tandem dans la grande sous-unité RPA1 (**Figure 15A**).



**Figure 15 : La structure du complexe RPA**

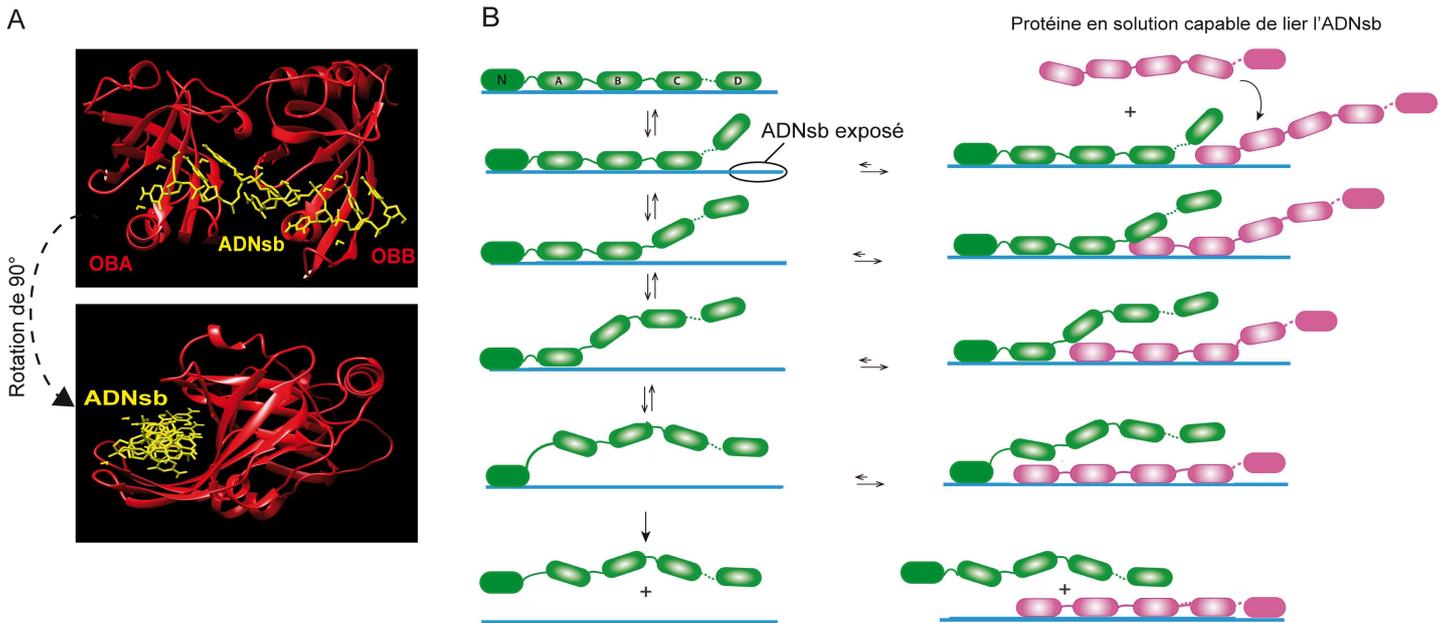
(A) Représentation schématique du complexe RPA. Les carrés bleus représentent les domaines OB-folds de RPA. Les OBC, D et E visualisés en (C) interagissent pour permettre la formation du trimère. Les interactions sont représentées par des flèches doubles. « 2C », en vert, représente le domaine C-terminal de RPA2 (schéma adapté de (Fanning et al., 2006)). (B) Représentation en rubans du domaine OB-fold de RPA2. L'OB-fold de ce domaine est entouré en blanc (image de gauche). Une rotation à 90° de cette représentation permet d'apprécier l'organisation en tonneau de l'OB-fold (image de droite)(modèle provenant de (Bochkareva et al., 2002), référence Protein Data Bank 1L1O et visualisé grâce au logiciel USCF Chimera (Pettersen et al., 2004)). (C) Représentation en rubans des domaines de RPA1, 2 et 3 responsables de la formation du complexe RPA. Nous pouvons observer la proximité de trois hélices, une hélice par sous-unité. L'interaction de ces trois hélices permet la formation du trimère ( modèle provenant de (Bochkareva et al., 2002)référence Protein Data Bank 1L1O et visualisé grâce au logiciel USCF Chimera (Pettersen et al., 2004)).

### III.2.2 Activité de liaison à l'ADNsb de RPA

Le trimère RPA possède six domaines OB-folds. Les OB-folds ont la particularité d'interagir, entre autres, avec l'ADNsb (Murzin, 1993). RPA pourrait alors interagir avec l'ADNsb grâce à ces OB-folds. Il a été observé, par cristallographie, que les domaines engagés dans une interaction avec l'ADNsb sont les deux domaines OB-folds centraux de RPA1 (OB A et B), son domaine OB-fold C-terminal et le domaine OB-fold de RPA2 (Bochkarev et al., 1997; Fan and Pavletich, 2012). RPA3 n'a pas été observé en contact avec l'ADNsb dans ce cristal (Fan and Pavletich, 2012). Enfin, la partie N-terminale de RPA1 (OBN) a été caractérisée comme étant capable de lier l'ADNsb mais avec une faible affinité (Daughdrill et al., 2001). L'ADNsb vient s'insérer dans un sillon formé par les domaines OB-folds de RPA (Bochkarev et al., 1997; Fan and Pavletich, 2012)(**Figure 16A**). RPA a donc cinq de ses domaines OB-folds qui montrent une capacité de lier l'ADNsb.

RPA est un complexe capable de lier l'ADNsb (Wold and Kelly, 1988). L'affinité de RPA pour l'ADNsb est extrêmement grande, entre  $10^{-9}$  et  $10^{-10}$  M (Fanning et al., 2006). Cette affinité est supérieure à celle d'autres protéines de la recombinaison homologue comme RAD52 humaine qui a une affinité entre  $10^{-7}$  et  $10^{-9}$  M (Grimme et al., 2010) ou yRad51 qui a une affinité d'environ  $3.10^{-7}$  M pour l'ADNsb (Antony et al., 2009). Ce résultat suggère que RPA pourrait être l'une des premières protéines à lier l'ADNsb *in vivo*. Cette hypothèse est aussi suggérée par des études de la recombinaison homologue en mitose et en méiose

chez *S.cerevisiae* (Gasior et al., 1998; Lisby et al., 2004) Un modèle récent proposé suite à une série d'expériences en molécules uniques suggère que la liaison de yRPA à l'ADNsb n'est pas figée mais dynamique (Gibb et al., 2014a). Dans ce modèle, les domaines de liaison à l'ADNsb de yRPA réalisent des cycles d'associations-dissociations avec l'ADNsb (**Figure 16B**). Cependant, lorsqu'une autre protéine de liaison à l'ADNsb est présente en solution, comme yRad51, cette dernière va favoriser la dissociation de yRPA en occupant la place libérée par yRPA lors de ces cycles d'associations-dissociations avec l'ADNsb (**Figure 16B**). Ce modèle propose ainsi que d'autres protéines capables de lier l'ADNsb, comme RAD51, peuvent déplacer RPA en mettant à profit cette dynamique de RPA (Gibb et al., 2014a).



**Figure 16 : La liaison de RPA à l'ADNsb**

(A) Représentation en rubans des deux domaines OB-folds centraux de RPA1 (OBA et B, en rouge). L'ADN s'insère dans un sillon formé par ces deux domaines organisés en tandem (modèle provenant de (Bochkarev et al., 1997), référence Protein Data Bank 1JMC et visualisé grâce au logiciel USCF Chimera (Pettersen et al., 2004)). (B) Modèle de la liaison dynamique de RPA à l'ADNsb. Les domaines de liaison à l'ADNsb de RPA (domaines verts ou roses) peuvent s'associer ou se dissocier de l'ADN de manière dynamique. Lorsque RPA est seul, sans protéine libre en solution, l'association de RPA à l'ADNsb reste relativement stable. En revanche, lorsqu'une protéine capable de lier l'ADNsb est présente en solution, comme RPA ou RAD51, cette dernière peut occuper le tract d'ADNsb exposé par RPA lors de ses cycles d'associations-dissociations à l'ADNsb. Ce mécanisme va alors favoriser la dissociation complète de RPA. (schéma adapté de (Gibb et al., 2014a)).

### III.3 Régulation des fonctions de RPA par ses partenaires protéiques au cours de la recombinaison homologue

RPA lie l'ADNsb pour le protéger de la dégradation et l'empêcher de former des structures secondaires (Sugiyama et al., 1997; Wang and Haber, 2004). Le rôle de RPA n'est cependant pas restreint à la protection de l'ADNsb. RPA peut aussi servir de plateforme sur l'ADNsb pour un bon nombre de protéines. En retour, ces interactions peuvent parfois profondément influencer la capacité de RPA de lier l'ADNsb. Par exemple, il a été montré que l'oncogène P53 (*Phosphoprotein P53*) est capable d'inhiber la

liaison de RPA à l'ADNsb (Dutta et al., 1993). Ces interactions peuvent réguler les mécanismes impliquant le complexe RPA comme la recombinaison homologe. Dans la suite de ce manuscrit, nous explorerons comment des protéines peuvent réguler la recombinaison homologe en interagissant avec RPA pour le stabiliser ou le dissocier de l'ADNsb.

### III.3.1 La protéine P53 inhibe la recombinaison homologe en inhibant l'interaction RPA-ADNsb via un mécanisme de mimétisme de l'ADNsb

L'oncogène P53 est capable d'interagir avec le domaine OB-fold N-terminal (OBN) de RPA1 (Dutta et al., 1993). Cette interaction inhibe l'interaction entre RPA et l'ADNsb. L'interaction entre P53 et l'OBN de RPA1 a été étudiée par cristallographie. Cette étude a révélé que la modalité d'interaction entre P53 et l'OBN de RPA est très similaire à celle décrite pour l'interaction entre les OBA et B de RPA1 et l'ADNsb (Bochkareva et al., 2005). De plus, l'étude a montré que P53 et l'ADNsb sont en compétition pour l'OBN de RPA1. Ces résultats suggèrent, de manière très intéressante, que P53 mime l'ADNsb pour interagir avec RPA et inhiber son interaction avec l'ADNsb (**Figure 17A**). Le fait que l'inhibition de l'OBN de RPA, qui a une faible affinité pour l'ADNsb (Daughdrill et al., 2001), soit suffisante pour inhiber la liaison du trimère RPA est très curieux. Nous avons vu plus tôt que la liaison de RPA à l'ADNsb est dynamique et qu'un modèle suggère que cette dynamique implique des cycles d'associations/dissociations des domaines OB-folds de RPA à l'ADNsb (Gibb et al., 2014a)(voir partie III.2.2 Activité de liaison à l'ADNsb de RPA). Il est probable que l'inhibition d'un de ces domaines, même s'il a une faible affinité pour l'ADNsb, soit suffisante pour changer drastiquement cette dynamique en faveur de la dissociation de RPA.

Le rôle de l'inhibition de RPA par P53 a aussi été étudié *in vivo* dans les cellules humaines (Romanova et al., 2004). Il a ainsi été révélé que l'interaction entre P53 et RPA inhibe la recombinaison homologe. L'ensemble de ces résultats suggère que P53 inhibe la recombinaison homologe en empêchant RPA de lier l'ADNsb.

### III.3.2 La phosphorylation de RPA2 favoriserait le déplacement de RPA de l'ADNsb

Après la résection de l'ADN, le chargement de RPA sur l'ADNsb permet le recrutement de la kinase ATR via son partenaire ATRIP (*ATR-interacting protein*) (Zou and Elledge, 2003). ATR peut ensuite phosphoryler RPA2 au niveau de sa partie N-terminale (Olson et al., 2006). Cette région de RPA2 a la possibilité d'être phosphorylée par une large gamme d'autres kinases (résumé dans (Vassin et al., 2009)). En somme, la partie N-terminale de RPA2 peut être hyper-phosphorylée. De manière curieuse, il a été observé que cette région de RPA2, dont les résidus phosphorylables ont été remplacés par des résidus phosphomimétiques, est capable d'entrer en compétition avec P53 pour l'interaction avec l'OBN de RPA1 (Bochkareva et al., 2005). Puisque (1) P53 mime l'ADNsb pour interagir avec le domaine OBN de RPA1 et que (2) le domaine N-terminal phosphorylé de RPA2 peut entrer en compétition avec P53 pour l'OBN, ce domaine phosphorylé pourrait aussi agir sur RPA via un mécanisme de mimétisme de l'ADNsb. Ainsi, la phosphorylation de RPA2 pourrait contribuer au déplacement de RPA au cours de la recombinaison homologe. Or, il a été montré qu'une sur-expression d'une forme non-phosphorylable de RPA2 réduit le nombre de foyers RAD51 formés après induction d'un stress répliatif dans les cellules humaines (Shi et al.,

2010). Ce résultat suggère que la phosphorylation de RPA2 pourrait inhiber la capacité de RPA de lier l'ADNsb en permettant à la région N-terminale de RPA2 d'interagir avec le domaine OBN de RPA1 (**Figure 17A**). Par conséquent, cette inhibition pourrait favoriser le chargement de la recombinaise RAD51 pour permettre la progression de la recombinaison homologe.

### III.3.3 Les recombinaises RAD51 et DMC1 déplaceraient RPA en mimant l'ADNsb

Après l'étape de résection, RPA couvre l'ADNsb pour le protéger de la dégradation et l'empêcher de former des structures secondaires (Sugiyama et al., 1997; Wang and Haber, 2004). Le complexe est ensuite remplacé par une recombinaise, RAD51 seule en mitose et RAD51 et DMC1 en méiose. Le chargement de RAD51 permet la recherche d'homologie et l'invasion d'une séquence homologue nécessaire à la réparation d'une CDB par recombinaison homologe. Il a été montré que les protéines humaines RAD51 et DMC1 peuvent interagir avec RPA *in vitro* (Golub et al., 1998). Plus tard, une seconde étude a montré que la partie N-terminale de RAD51 interagit avec l'OBA de RPA1 (Stauffer and Chazin, 2004). De manière intéressante, il a été observé que la partie N-terminale de RAD51 a la capacité d'entrer en compétition directe avec l'ADNsb pour la liaison avec l'OBA de RPA1 (**Figure 17A**). Ce résultat rappelle la compétition entre P53, l'hyperphosphorylation de RPA2 et l'ADNsb pour l'OBN de RPA1. Un mutant de RAD51 déficient pour son interaction avec RPA déplace moins efficacement RPA que la protéine sauvage (Stauffer and Chazin, 2004). RAD51 interagit donc avec RPA pour le déplacer de l'ADNsb et cette interaction pourrait impliquer un mimétisme de l'ADNsb par RAD51. Cette étude n'a pas été menée avec la protéine DMC1 humaine. Par conséquent, nous ne savons pas si DMC1 interagit avec RPA pour le déplacer comme le fait RAD51. Cependant, RAD51 et DMC1 sont des protéines très similaires en terme de séquence peptidique (52 % d'identité entre les deux protéines humaines). Il est alors probable que DMC1 puisse déplacer RPA comme RAD51.

### III.3.4 La protéine BRCA2 et son partenaire DSS1 déplacent RPA en mimant l'ADNsb

Au cours de la recombinaison homologe, les recombinaises sont assistées par des protéines médiatrices pour assurer leur chargement sur l'ADNsb après la résection. BRCA2 joue ce rôle de protéine médiatrice des recombinaises chez les mammifères. La protéine BRCA2 est essentielle au chargement de RAD51 sur l'ADNsb au cours de la réparation des CDBs par recombinaison homologe (Yuan et al., 1999). Il a ensuite été démontré *in vitro* que BRCA2 stimule le chargement de RAD51 sur un ADNsb saturé par RPA et que cette réaction est stimulée par le partenaire de BRCA2, DSS1 (Jensen et al., 2010; Liu et al., 2010). Ces résultats suggèrent que le dimère BRCA2-DSS1 est essentiel au chargement de RAD51 sur l'ADNsb au cours de la recombinaison homologe. Cependant, le mécanisme d'action de BRCA2-DSS1 n'avait pas été encore élucidé à ce moment. Il a été montré plus récemment que DSS1 interagit avec RPA et la cartographie de cette interaction a révélé que DSS1 interagit avec les OBN, A et B de RPA1 (Zhao et al., 2015)(**Figure 17A**). Il a ensuite été montré que l'interaction DSS1-RPA mime l'interaction entre RPA et l'ADNsb. Les auteurs de cette étude ont démontré par la suite qu'une protéine DSS1 déficiente pour l'interaction avec RPA n'est plus capable de stimuler efficacement l'activité médiatrice de BRCA2 sur l'activité de RAD51. Cette protéine DSS1 mutante est aussi déficiente pour la formation des foyers RAD51 *in vivo* après irradiation. L'ensemble de ces résultats suggère que DSS1 mime localement l'ADNsb pour

déplacer RPA (Zhao et al., 2015)(**Figure 17B**). BRCA2 peut ensuite déposer RAD51 sur l'ADNsb qui a été exposé suite au déplacement de RPA.

### III.3.5 La protéine RAD52 stabilise l'association de RPA avec l'ADNsb

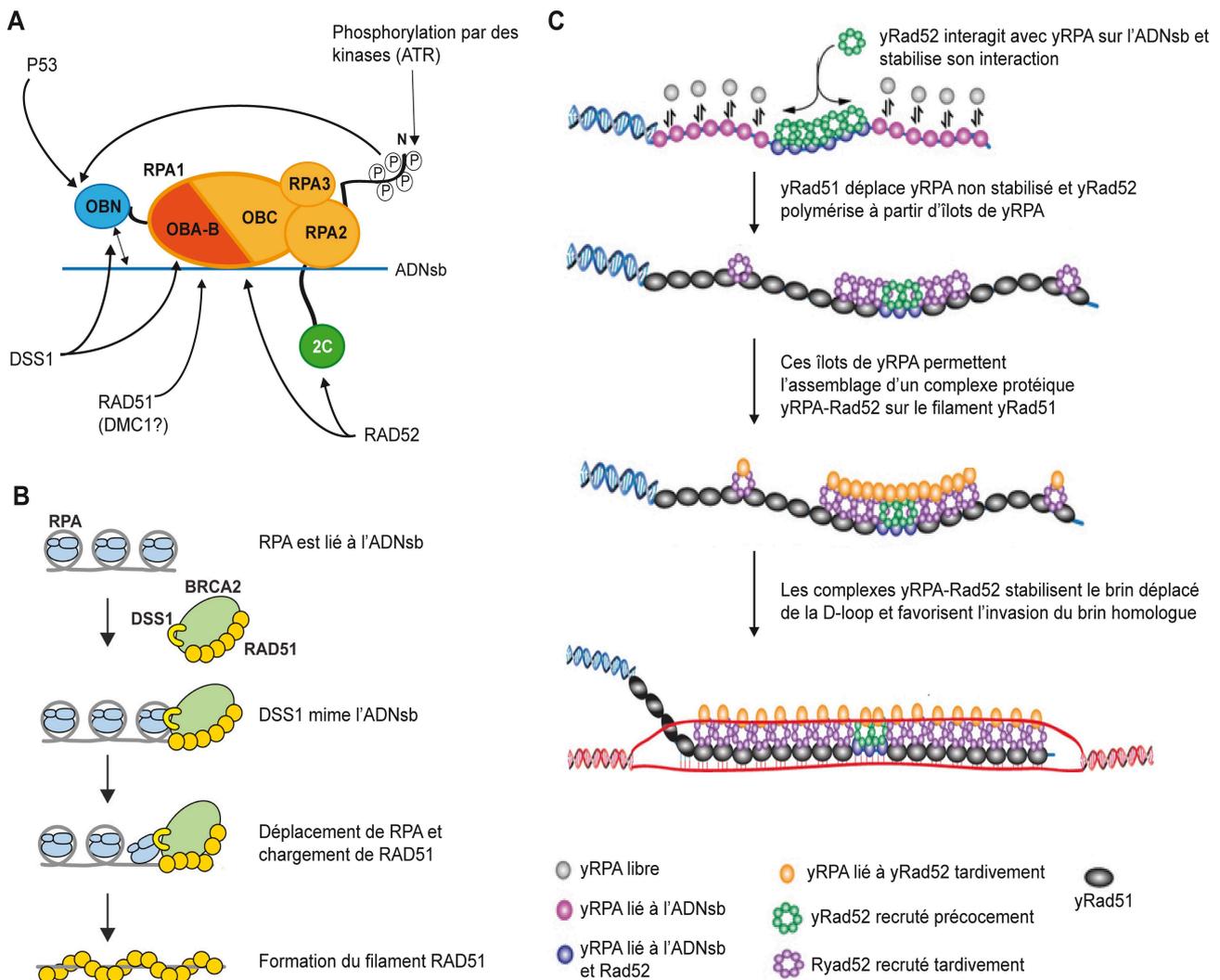
Rad52 est essentielle à la recombinaison homologue chez *S.cerevisiae* (Malone and Esposito, 1980; Prakash and Taillon-Miller, 1981). Des études *in vitro* ont montré que yRad52 est nécessaire à l'activité recombinase de yRad51 lorsque l'ADNsb est d'abord couvert par yRPA (New et al., 1998; Sung, 1997b). De plus, yRad52 est capable d'interagir avec yRPA (Shinohara et al., 1998). Ces résultats suggèrent que yRad52 pourrait être impliquée dans la dissociation de yRPA de l'ADNsb afin de favoriser le chargement de yRad51 sur l'ADNsb au cours de la recombinaison homologue. Deux récentes études sur molécules uniques ont montré que (1) yRad51 seule peut déplacer efficacement yRPA en présence d'ATP et (2) yRad52 ne déplace pas yRPA de l'ADNsb mais au contraire stabilise l'association de yRPA avec l'ADNsb (Gibb et al., 2014a, 2014b). Ces résultats sont en opposition avec un probable rôle de yRad52 dans le déplacement de yRPA. Ensuite, il a été observé que yRad51 polymérise sur le filament yRPA mais que des « ilots » de yRPA persistent, associés à yRad52 (Gibb et al., 2014b). Puis, les auteurs de ces études ont observé que ces ilots de yRPA sur le filament yRad51 peuvent servir de nouveaux sites de liaison pour yRad52 et yRPA qui s'assemblent sur le filament yRad51. Afin d'uniformiser ces observations, un modèle a été proposé dans lequel yRad51 déplace seule yRPA en profitant du fait que la liaison de yRPA à l'ADNsb est dynamique (Gibb et al., 2014b)(**Figure 17C**). Un filament yRad51 se forme alors. Mais ce filament yRad51 est entre coupé de régions dans lesquelles yRad52 a stabilisé des « ilots » de yRPA sur l'ADNsb. Ces ilots serviront de sites de liaison pour de nouvelles protéines yRPA et yRad52 qui s'assemblent autour du filament yRad51. Cette structure nouvelle sur le filament yRad51 composée d'un assemblage de yRad52 et yRPA contribuera ensuite à la stabilisation du brin déplacé de la D-loop lors de l'invasion du brin homologue (Gibb et al., 2014b)(**Figure 17C**). Ce modèle suppose que les complexes RPA chargés sur l'ADNsb de la D-loop pour le stabiliser et ainsi favoriser l'invasion du brin d'ADN homologue sont apportés par le filament pré-synaptique et ne proviennent pas de complexes RPA en solution.

Ce modèle est séduisant car il pourrait expliquer pourquoi yRad52 stabilise l'interaction entre yRPA et l'ADNsb tout en permettant à yRad51 d'envahir un brin homologue. Cependant, ce modèle n'explique pas pourquoi yRad52 est nécessaire à la formation normale de foyers yRad51 après irradiations chez *S.cerevisiae* (Gasior et al., 2001). yRad52 pourrait permettre à la fois (1) le déplacement de yRPA pour favoriser le chargement de yRad51 sur l'ADNsb et (2) la stabilisation de RPA sur des portions du filament pré-synaptique pour faciliter plus tard l'invasion du brin homologue. Cependant, le facteur ou les conditions qui permettent à yRad52 de passer d'un mode à l'autre restent encore à être élucidés.

### III.3.6 Le complexe méiotique Mei5-Sae3 chez *Saccharomyces cerevisiae* promeut la polymérisation de DMC1 sur le filament RPA-ADNsb

Suite à la résection de la CDB méiotique, DMC1 se charge sur l'ADNsb formé pour catalyser l'invasion d'une séquence nucléotidique sur le chromosome homologue. Le chargement de la recombinase DMC1 sur de l'ADNsb nécessite l'action de facteurs médiateurs, comme RAD51 en mitose. Le dimère

yMei5-Sae3 interagit avec yDmc1 et promeut la polymérisation de yDmc1 sur le filament yRPA-ADNsb (Ferrari et al., 2009) (voir II.3.3 La recherche et l'invasion d'un brin homologue sur le chromosome homologue). Ce dimère a la capacité d'interagir avec l'ADNsb et yRPA (Ferrari et al., 2009). Ces résultats suggèrent que yMei5-Sae3 pourrait être recruté sur l'ADNsb et pourrait interagir avec yRPA pour le déplacer. Ainsi, le chargement de yDmc1 peut être favorisé sur un filament d'ADNsb saturé par yRPA. Cependant, nous ne savons pas (1) quelle sous-unité de RPA interagit avec yMei5-Sae3, (2) ni si cette interaction permet le déplacement de RPA en faveur de DMC1 et enfin (3) nous ne savons pas comment cette interaction pourrait déplacer RPA.



**Figure 17: L'activité de RPA est régulée par ses partenaires au cours de la recombinaison homologue**

(A) Schéma récapitulatif des interactions entre RPA et ses partenaires au cours de la recombinaison homologue. P53 interagit avec l'OBN de RPA1 et entre en compétition avec l'ADNsb pour cette interaction. DSS1 entre aussi en compétition avec l'ADNsb en interagissant avec les OBN, A et B de RPA1. De même, RAD51 entre en compétition directe avec l'ADNsb pour la liaison avec l'OBA de RPA1. La phosphorylation du domaine N-terminal de RPA2 permet à ce dernier d'interagir avec l'OBN de RPA1. RAD52, chez l'Homme, interagit avec RPA1 et le domaine C-terminal de RPA2 (Mer et al., 2000; Park et al., 1996). Et l'interaction entre yRad52 et yRPA stabilise l'association de RPA avec l'ADNsb. (B) Modèle du déplacement de RPA par le complexe BRCA2-DSS1. BRCA2 est recruté à l'ADNsb grâce à sa capacité de lier l'ADNsb (Jensen et al., 2010). Ensuite, DSS1 interagit avec RPA en mimant

Suite de la légende dans la page suivante

l'ADNsb. Cette interaction favorise la dissociation de RPA de l'ADNsb et BRCA2 permet le chargement de RAD51 (schéma adapté de (Zhao et al., 2015)). (C) Modèle de la dynamique de yRPA et yRad52 au cours des étapes pré-synaptiques et lors de l'invasion du brin homologue. yRPA est stabilisé par yRad52 sur certaines portions de l'ADNsb couvert par yRPA. Puis yRad51 se charge et déplace yRPA en profitant du fait que sa liaison à l'ADNsb soit dynamique sur des portions de l'ADNsb. Les îlots de yRPA-RAD52 permettent le recrutement de nouvelles protéines yRad52 et yRPA. Un complexe yRad52-RPA se met en place sur le filament yRad51. Ce complexe va stabiliser le brin déplacé lors de la formation de la D-loop, ce qui favorise l'invasion du brin homologue par yRad51 (schéma adapté de (Gibb et al., 2014b)).

En résumé, nous avons traité de protéines capables d'interagir avec RPA et de réguler ses fonctions au cours de la recombinaison homologue. La plupart de ces protéines interagissent avec RPA pour favoriser sa dissociation, parfois au profit des protéines recombinases. Le mode d'interaction avec RPA est même extensivement décrit pour certaines protéines et semblerait passer par le mimétisme de l'ADNsb. Parmi les protéines qui interagissent avec RPA, certaines sont spécifiques de la méiose ce qui suggère que RPA est régulé au cours de la recombinaison méiotique. De manière intéressante, il a été récemment décrit que MEIOB, protéine homologue de RPA1 spécifique de la méiose, peut aussi interagir avec RPA2 (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). L'existence de MEIOB suggère que des protéines similaires aux sous-unités de RPA se sont spécialisées pour assurer des mécanismes du métabolisme de l'ADN. MEIOB pourrait alors réguler spécifiquement la recombinaison méiotique en interagissant avec RPA. Dans le dernier chapitre de cette introduction, nous passerons en revue l'ensemble des données actuelles qui caractérisent MEIOB et son partenaire SPATA22 qui sont au centre des travaux présentés dans cette thèse.

#### IV. MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la recombinaison méiotique

MEIOB est un paralogue de RPA1 essentiel à la recombinaison méiotique et capable d'interagir avec RPA2 et SPATA22 (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Dans ce dernier chapitre, nous traiterons de la découverte de MEIOB et SPATA22, de leur implication au cours de la recombinaison méiotique, de leur propriétés biochimiques et de leur possible relation avec RPA. Nous finirons par discuter de la conservation de ces protéines et du rôle possible de MEIOB au cours de la tumorigénèse.

##### IV.1 La découverte de MEIOB et SPATA22 chez la souris

MEIOB et SPATA22 ont été découvertes par trois méthodologies indépendantes chez la souris. Le gène codant la protéine SPATA22 a été découvert suite à un crible génétique chez la souris visant à déterminer de nouveaux gènes importants pour la fertilité murine. Ce crible consistait en une mutagenèse des gamètes murins après exposition à la N-nitroso-N-éthylurée (ENU) suivie d'une étude de la fertilité des souris mutantes. Ainsi, la mutation repro42 a pu être isolée (La Salle et al., 2012). Cette mutation a été positionnée dans le génome murin. Cette mutation est une mutation non-sens, conduisant à la formation d'un codon stop précoce, localisée sur le gène *Spata22*.

MEIOB a été découverte par deux approches différentes. D'une part, *Meiob* a été découvert au Laboratoire de Développement des Gonades grâce à une approche transcriptomique (Souquet et al., 2013). Cette approche consistait à identifier de nouveaux gènes exprimés préférentiellement au cours de la méiose. A 13,5 jours post-conception, les cellules germinales femelles murines entrent en méiose alors que les cellules germinales mâles restent en mitose (Spiller et al., 2012). La comparaison de transcriptomes de cellules germinales murines mâles et femelles isolées à cet âge a permis d'identifier des gènes régulant l'entrée en méiose ou importants pour la progression méiotique (Abby et al., 2016; Le Bouffant et al., 2011; Poulain et al., 2015; Souquet et al., 2012, 2013). *Meiob* faisait parti des gènes les plus exprimés dans les cellules germinales femelles en comparaison aux cellules germinales mâles ce qui suggérait que *Meiob* est un gène spécifiquement exprimé en méiose. La seconde approche qui a permis de découvrir indépendamment MEIOB est une approche protéomique. Cette approche menée par l'équipe du Dr. Jeremy P. Wang consistait à identifier des protéines spécifiquement associées au chromosomes méiotiques (Luo et al., 2013). Cette équipe a donc purifié des protéines associées à la chromatine à partir de testicules murins de 18 jours post-partum qui ont la particularité d'être enrichis en cellules méiotiques précoces et exempts de cellules post-méiotiques. Ces protéines ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse. Ainsi, la protéine MEIOB faisait partie des protéines associées à la chromatine et spécifiques de la méiose identifiées par cette approche.

##### IV.2 MEIOB et SPATA22 sont recrutées sur les intermédiaires de la recombinaison homologue méiotique

Les cribles transcriptomiques et protéomiques qui ont permis d'identifier MEIOB suggéraient que MEIOB pouvait être une protéine spécifique des étapes précoces de la méiose. Cette hypothèse a été confirmée expérimentalement *in vivo*. En effet, MEIOB et SPATA22 sont toutes les deux exprimées spécifiquement dans les spermatocytes murins, les cellules germinales mâles en méiose (Luo et al., 2013; La

Salle et al., 2012; Souquet et al., 2013). Les deux protéines sont localisées sur les chromosomes méiotiques en foyers visibles du leptotène au pachytène (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). MEIOB forme 150 à 200 foyers dès le leptotène et ce nombre augmente légèrement en zygotène puis diminue au cours du pachytène jusqu'à environ 25 foyers par cellule (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013)(Moens et al., 2002). Cette dynamique rappelle celle décrite précédemment pour des acteurs de la recombinaison homologue en méiose comme RPA, RAD51 et DMC1 (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). De plus, MEIOB et SPATA22 co-localisent avec RPA et co-localisent partiellement avec RAD51, DMC1 (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la présence de MEIOB et SPATA22 sur les chromosomes méiotiques suit la cinétique de réparation des CDBs méiotiques. L'absence de MEIOB sur les chromosomes méiotiques de souris *Spo11<sup>-/-</sup>* confirme que MEIOB est recrutée sur les intermédiaires de la recombinaison (Souquet et al., 2013). De plus, la présence de MEIOB sur les chromosomes méiotiques en absence de DMC1 suggère que MEIOB pourrait être recrutée sur le filament présynaptique (Souquet et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggère que MEIOB et SPATA22 sont des acteurs de la recombinaison homologue méiotique et qu'ils pourraient agir à la fois à des étapes précoces et tardives de la recombinaison homologue, à l'image de RPA.

#### IV.3 MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la recombinaison homologue méiotique

Dans le but d'étudier le rôle de MEIOB et SPATA22 au cours de la progression méiotique, les gènes codant ces protéines ont été invalidés chez la souris (Hays et al., 2017; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Un allèle de *Spata22* existe en plus chez la souris, *repro42* (La Salle et al., 2012). Cet allèle présente un codon stop précoce qui altère la stabilité de la protéine SPATA22 et aucune protéine n'est détectable dans les testicules murins. De plus, il existe un modèle d'étude pour SPATA22 chez le rat, le modèle *tremor* (Ishishita et al., 2013, 2014). Les rats *tremor* présentent une délétion d'une partie du chromosome 10. Cette région contient 13 gènes dont le gène *Spata22*. L'absence de MEIOB ou SPATA22 conduit à la stérilité des souris et l'absence de SPATA22 induit la stérilité chez le rat (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2013; Luo et al., 2013; La Salle et al., 2012; Souquet et al., 2013). Cette stérilité est due à un arrêt de la progression méiotique à un stade similaire au zygotène ou au pachytène et à une apoptose des cellules germinales. Ce phénotype montre que MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la progression de la prophase I de méiose.

La prophase I de méiose a été suivie chez ces mutants pour déterminer un rôle de MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique car les approches cytologiques et l'arrêt des cellules méiotiques en zygotène/pachytène chez les mutants *Meiob<sup>-/-</sup>* et *Spata22<sup>-/-</sup>* suggéraient un rôle de MEIOB et SPATA22 au cours de cette dernière. Le suivi de la prophase I chez ces mutants a montré que l'invalidation de MEIOB et SPATA22 conduit à des problèmes de synapse des chromosomes (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; La Salle et al., 2012; Souquet et al., 2013). Ces mutants présentent une accumulation du marqueur  $\gamma$ H2AX sur les chromosomes méiotiques. De plus, chez les souris *Meiob<sup>-/-</sup>* et le rat *tremor*, il a été rapporté que le nombre de foyers RPA est normal du leptotène au zygotène puis il persiste élevé au-delà du zygotène (Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Ces résultats indiquent que MEIOB et SPATA22 sont nécessaires à la réparation des CDBs méiotiques par recombinaison homologue et suggèrent que MEIOB et SPATA22 ne sont pas nécessaires à la résection.

Le chargement des recombinases permet la recherche d'homologie et l'invasion d'une séquence nucléotidique sur le chromosome homologue. Le chargement des recombinases a été testé pour savoir si

MEIOB et SPATA22 sont impliquées dans le chargement de ces dernières. De manière intéressante, il a été observé qu'en absence de MEIOB chez la souris et SPATA22 chez le rat, le nombre de foyers RAD51 et DMC1 est initialement normal. Cependant, ce nombre décline au cours du stade zygotène (Ishishita et al., 2013; Souquet et al., 2013). Ce résultat suggère que MEIOB et SPATA22 ne sont pas nécessaires au chargement des recombinaisons. La dissociation des recombinaisons des intermédiaires de recombinaison méiotique en absence de MEIOB ou SPATA22 peut être expliquée par deux hypothèses : (1) MEIOB et SPATA22 seraient impliquées dans la stabilité des recombinaisons au cours de la recombinaison homologue méiotique ou (2) les recombinaisons seraient enlevées suite à la formation de la D-loop mais la recombinaison s'arrêterait à un intermédiaire plus tardif (**Figure 18**). Le défaut de réparation caractéristique des mutants *Meiob*<sup>-/-</sup> et *Spata22*<sup>-/-</sup> se traduit plus tard par un défaut de formation des COs observé par une absence complète du marqueur MLH1 dans les spermatocytes de souris *Meiob*<sup>-/-</sup>, *Spata22*<sup>-/-</sup> et rats *tremor* (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013).

#### IV.4 La stabilité et la localisation de MEIOB et SPATA22 sont interdépendantes

Des approches protéomiques ont été menées dans le but d'identifier des partenaires de MEIOB afin d'en savoir plus sur le mécanisme d'action de MEIOB au cours de la recombinaison méiotique. Ainsi, il a été montré que MEIOB est capable d'interagir physiquement avec la protéine SPATA22 dans les cellules germinales (Luo et al., 2013). Cette interaction est assurée par les parties C-terminales de MEIOB et SPATA22 (Xu et al., 2017). De plus, les deux protéines ont une stabilité inter-dépendante ce qui suggère que l'interaction entre les deux protéines garantit leur stabilité (Hays et al., 2017; Luo et al., 2013). Enfin, MEIOB et SPATA22 co-localisent sur les chromosomes méiotiques et le recrutement des deux protéines à une CDB induite dans une cellule mitotique est interdépendant (Xu et al., 2017). Ces résultats suggèrent que MEIOB et SPATA22 collaborent pour garantir leur stabilité et leur recrutement à une CDB de l'ADN (Luo et al., 2013; Xu et al., 2017).

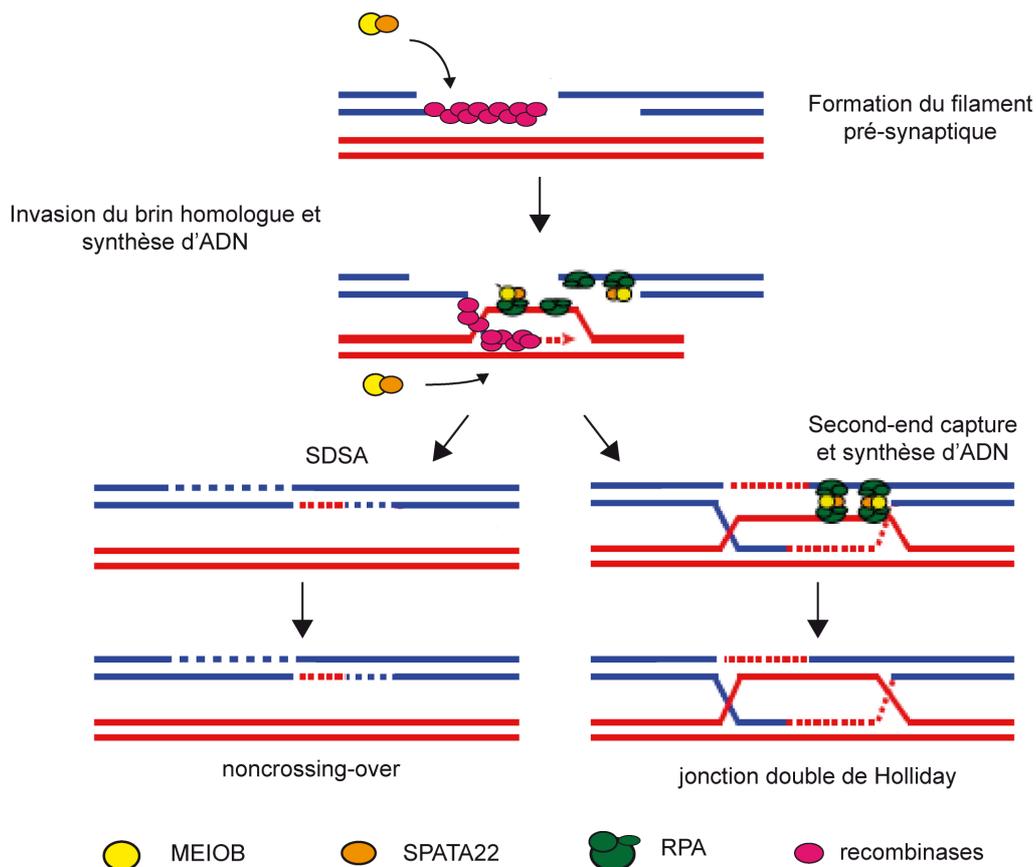
#### IV.5 MEIOB est une protéine capable de lier l'ADNsb avec une activité exonucléase putative

MEIOB est un homologue de RPA1 spécifique de la méiose (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). MEIOB possède trois domaines OB-folds similaires aux domaines OB-folds A, B et C de RPA1 mais le domaine OBN est absent dans la protéine MEIOB. Etant donnée cette similitude avec RPA1, MEIOB pourrait lier l'ADNsb. Ainsi, il a été montré que la protéine MEIOB peut lier spécifiquement l'ADNsb et que son domaine OB-fold central (équivalent à l'OB-B de RPA1) possède aussi cette activité (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Ces données suggèrent que MEIOB est une protéine capable de lier l'ADNsb et que cette activité pourrait contribuer à son recrutement aux intermédiaires de la recombinaison homologue méiotique (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Aujourd'hui, il n'a pas été montré expérimentalement que les deux domaines OB-folds n°1 et 3 de MEIOB peuvent lier l'ADNsb. Les domaines homologues chez RPA1 peuvent lier l'ADNsb (Fan and Pavletich, 2012). Il est alors probable que ces domaines chez MEIOB puissent lier l'ADNsb.

Très récemment, il a été montré qu'une mutation ponctuelle de MEIOB, localisée dans son premier domaine OB-fold, est associée à des cas d'azoospermies non obstructives chez l'Homme (Gershoni et al.,

2017). Les patients possédant cette mutation présentent un arrêt de la spermatogénèse lors de la prophase I de méiose. Ce phénotype est similaire au phénotype des souris *Meiob*<sup>-/-</sup> (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). A condition que cette mutation altère la liaison à l'ADNsb de MEIOB et n'affecte pas la stabilité de la protéine, ce résultat pourrait suggérer que l'activité de liaison à l'ADNsb de MEIOB est nécessaire à la recombinaison homologue méiotique chez l'Homme.

L'équipe du Dr. J.P. Wang a rapporté que le domaine OB-fold central de MEIOB purifié possède une activité 3'>5' exonucléase *in vitro* (Luo et al., 2013). Cette activité est spécifique de l'ADNsb. Une telle activité est surprenante de la part d'un homologue de la grande sous-unité de RPA car RPA protège l'ADNsb de la dégradation. Des faits que MEIOB (1) n'est pas nécessaire à la formation des CDBs méiotiques, (2) ni à la résection et que (3) MEIOB reste sur les nodules de recombinaison jusqu'à tard en pachytène, les auteurs ont proposé que cette activité nucléase pourrait être impliquée dans la résection de tracts d'ADN excédentaires produits lors de la synthèse d'ADN qui précède la formation de la jonction double de Holliday ou lors de la formation d'un NCO par le SDSA (Luo et al., 2013). Cependant, les auteurs de cette étude restent prudents quant à la signification de cette activité nucléase et n'excluent pas la possibilité que cette activité observée *in vitro* ne reflète peut-être pas l'activité de la protéine entière *in vivo*, avec ses partenaires protéiques (Luo et al., 2013). De plus, nos confrères nous ont communiqué que cette activité ne semble pas être reproductible *in vitro* et que par conséquent, cette activité pourrait provenir d'une contamination par une nucléase qui proviendrait de l'hôte qui a servi à produire le domaine OB-fold central de MEIOB (communication personnelle du Dr. J.P. Wang).



**Figure 18 : Modèle des rôles potentiels de MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique**

Les recombinaisons RAD51 et DMC1 se chargent sur l'ADNsb suite à la résection. Dès lors, le dimère MEIOB-SPATA22 peut assister, directement ou non, les recombinaisons aux étapes pré-synaptiques. MEIOB-SPATA22 pourrait également

assister les étapes post-synaptiques de la recombinaison méiotique en liant RPA sur l'ADNsb de la D-loop. Une synthèse d'ADN démarre ensuite dans la D-loop. Puis MEIOB-SPATA22 permet la capture de la seconde extrémité de la cassure (second-end capture) en interagissant avec RPA qui couvre cette extrémité. Une nouvelle étape de synthèse d'ADN démarre ensuite pour former plus tard la jonction double de Holliday. Si la D-loop étendue est dissociée avant la second-end capture, l'intermédiaire de la recombinaison homologue part dans la voie du SDSA (schéma adapté de (Luo et al., 2013)).

#### IV.6 MEIOB et SPATA22 interagissent avec RPA2

L'approche protéomique qui a permis d'identifier une interaction entre MEIOB et SPATA22 a aussi démontré que MEIOB est capable d'interagir avec RPA2 dans les testicules murins (Luo et al., 2013). Ce résultat est en accord avec la co-localisation de MEIOB, SPATA22 et RPA sur les chromosomes méiotiques (Luo et al., 2013) et suggère que MEIOB et SPATA22 peuvent collaborer avec RPA au cours de la recombinaison homologue méiotique (Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Très récemment, il a été montré que MEIOB et SPATA22 sont capables d'interagir indépendamment avec RPA1 lorsque les protéines murines sont surexprimées dans les cellules humaines (Xu et al., 2017). Les auteurs de cette étude ont aussi montré que SPATA22 peut interagir avec RPA2 et que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec RPA3. Le nombre de ces interactions suggère que MEIOB et SPATA22 pourraient travailler en étroite collaboration avec le complexe RPA au cours de la recombinaison homologue méiotique. Cependant, une interaction entre MEIOB, SPATA22 et l'intégralité du complexe RPA n'a jamais été montrée à ce jour. Nous ne savons donc pas si MEIOB et SPATA22 interagissent avec tout le complexe RPA ou avec des sous-unités isolées de RPA. De plus, le rôle de ces interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA2 reste encore inconnu à ce jour.

Aujourd'hui, nous savons que (1) RAD52, la protéine catalysant la second-end capture avec RPA *in vitro*, est dispensable pour la recombinaison homologue méiotique chez la souris (Rijkers et al., 1998) (2) MEIOB et SPATA22 persistent sur les nodules de recombinaison jusqu'au pachytène tardif (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013), (3) MEIOB et SPATA22 sont indispensables à la réparation des CDBs méiotiques et à la formation des COs (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013) et (4) MEIOB interagit avec SPATA22 et RPA (Luo et al., 2013). L'ensemble de ces résultats a permis à l'équipe du Dr. J.P. Wang de proposer que MEIOB et SPATA22 interagissent avec RPA pour catalyser la second-end capture au cours de la recombinaison méiotique (Luo et al., 2013)(**Figure 18**). Cependant, cette hypothèse n'a pas encore été testée *in vitro*. De plus, cette hypothèse pourrait être invalidée si MEIOB interagit uniquement avec RPA2 et pas avec le complexe RPA entier.

#### IV.7 MEIOB et SPATA22 sont des gènes conservés

MEIOB est un paralogue de RPA1 spécifique de la méiose (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Au cours de l'évolution des eucaryotes, les gènes codant les sous-unités de RPA ont subi plusieurs duplications ce qui suggère que MEIOB n'est pas un cas isolé. En revanche, MEIOB est un paralogue de RPA1 spécifique de la méiose, ce qui fait son originalité. A l'image de DMC1 qui a divergé de RAD51 pour assurer des rôles spécifiques de la recombinaison méiotique, MEIOB pourrait avoir divergé de RPA1 pour acquérir des rôles différents de RPA1 et spécifiques de la recombinaison méiotique. Cette hypothèse est

supportée par le fait que RPA ne peut pas compenser l'absence de MEIOB au cours de la prophase I de méiose chez la souris (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013).

L'étude de la conservation de *MEIOB* a suggéré que *MEIOB* est un gène ancestral car il est conservé chez les métazoaires et même chez un protozoaire, *Capsaspora owczarzaki* (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). La conservation de *MEIOB* a cependant été récemment revisitée (Ribeiro et al., 2016). Cette révision a permis d'identifier des homologues de MEIOB chez les champignons et de suggérer que la duplication du gène *RPA1* à l'origine de *MEIOB* est plus ancestrale que l'émergence des premiers métazoaires et protozoaires. Cette révision de la conservation de *MEIOB* est discutée dans une revue que nous avons écrit au cours de ces travaux de thèse et qui est présente dans ce manuscrit.

La première description du rôle de SPATA22 chez la souris avait proposé que le gène *SPATA22* est un gène conservé chez les vertébrés (La Salle et al., 2012). Cependant, la conservation de *SPATA22* pourrait aussi être revisitée à l'avenir, notamment grâce aux génomes nouvellement annotés depuis la première description de *SPATA22*, afin de savoir si ce gène a co-évolué ou non avec *MEIOB* au cours de l'évolution des eucaryotes. Enfin, les données actuelles de la littérature ne nous permettent pas de savoir si *SPATA22* pourrait être un homologue d'une sous-unité de RPA, comme MEIOB. La possible ressemblance entre *SPATA22* est une sous-unité de RPA sera traitée dans les travaux de cette thèse.

#### IV.8 La drosophile possède un homologue de MEIOB : Hold'em (HDM)

La protéine MEIOB est conservée chez les métazoaires (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Historiquement, Hold'em (HDM) a été le premier homologue de MEIOB découvert chez les métazoaires (Joyce et al., 2009). HDM a été découverte chez la drosophile *Drosophila melanogaster* suite à un crible visant à identifier des mutations impliquées dans la mauvaise ségrégation chromosomique en méiose. HDM n'est pas nécessaire à la formation des CDBs méiotiques ni à leur réparation. Cependant, l'inactivation de HDM induit une réduction de la fréquence de formation des COs chez la drosophile. De plus, HDM interagit avec ERCC1-MEI9, un complexe endonucléase responsable de la résolution, à l'image des endonucléases comme MUS81-EME1. Ces résultats suggèrent que HDM pourrait faire partie, avec MEI9 et ERCC1, d'un complexe protéique responsable de la résolution des jonctions double de Holliday en COs chez la drosophile. Enfin, contrairement à MEIOB, HDM est impliquée aussi dans la réparation des dommages à l'ADN en mitose. Le rôle de HDM dans la résolution et dans la réparation mitotique suggère que les rôles de HDM et MEIOB pourraient avoir divergé au cours de l'évolution.

#### IV.9 MEIOB et SPATA22 sont des antigènes du cancer

Les antigènes cancer/testicule (ou *cancer/testis antigen*, CTA) sont des protéines exprimées par les cellules cancéreuses mais pas par les cellules normales sauf les cellules germinales (Whitehurst, 2014). Ces protéines sont aujourd'hui des cibles privilégiées des thérapies anti-cancer car elles permettent de cibler les cellules tumorales tout en touchant le moins de cellules saines possible. Deux études transcriptomiques indépendantes ont révélé que MEIOB et SPATA22 sont des CTAs notamment dans les adénocarcinomes pulmonaires (Shiohama et al., 2014; Wang et al., 2016a). Il a aussi été montré que l'expression de MEIOB favoriserait la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses. Ces phénotypes sont souvent associés à la

malignité des cellules cancéreuses (Krakhmal et al., 2015). L'ensemble de ces résultats suggèrent que MEIOB est exprimé dans certaines cellules cancéreuses et qu'il pourrait participer au processus de tumorigenèse (Wang et al., 2016a). Cependant, cette même étude a révélé que l'expression de MEIOB et SPATA22 était exclusive dans certaines cellules d'adénocarcinomes pulmonaires (Wang et al., 2016a). Ce résultat suggère que MEIOB et SPATA22 pourraient avoir des rôles indépendants au cours de la tumorigenèse ou que l'expression simultanée des deux protéines pourrait être délétère dans certaines cellules cancéreuses (Wang et al., 2016a).

Nous avons vu au travers de cette introduction que la recombinaison méiotique est essentielle à la progression de la méiose car elle est à l'origine des COs essentiels à la bonne ségrégation des chromosomes homologues. Des facteurs intervenant au cours de la recombinaison mitotique sont également impliqués en méiose mais en plus, des acteurs spécifiques de la recombinaison méiotique viennent ajouter des spécificités à cette dernière. Le complexe RPA illustre bien ces facteurs impliqués à la fois en mitose et en méiose. Nous avons pu voir que RPA1 a un paralogue spécifique de la méiose, MEIOB. MEIOB et son partenaire SPATA22 sont essentiels à la recombinaison méiotique ce qui suggère que ces facteurs pourraient contribuer aux spécificités de la recombinaison méiotique. Cependant, nous ne savons pas comment ces protéines interviennent au cours de la recombinaison méiotique pour permettre la progression de cette dernière. Les travaux de cette thèse se sont alors concentrés sur la caractérisation de MEIOB et SPATA22 et leurs rôles au cours de la recombinaison homologue méiotique. Dans la partie qui va suivre, nous passerons en revue les résultats produits au cours de ces travaux.



# Résultats



# Résultats

## I. Préambule

La découverte récente de nouveaux facteurs, comme MEIOB et SPATA22, essentiels pour la recombinaison méiotique constitue une nouvelle opportunité d'améliorer notre compréhension de ce processus. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes intervenant au cours de la recombinaison méiotique chez les mammifères, nous avons alors cherché à préciser les rôles de MEIOB et SPATA22. Nous avons vu que MEIOB, un homologue de RPA1, est nécessaire à la recombinaison méiotique. Pourquoi la recombinaison méiotique chez les métazoaires nécessiterait la présence d'un homologue de RPA1 supplémentaire et de son partenaire, SPATA22, alors que RPA est présent pour lier l'ADNsb afin de le protéger et de servir de plateforme pour d'autres protéines ? MEIOB et SPATA22 assurent-elles des fonctions complémentaires à RPA pour gérer l'ADNsb au cours de la recombinaison méiotique ? De plus, l'interaction entre MEIOB, SPATA22 et RPA2 permet-elle d'apporter de nouvelles fonctions ou régulations au complexe RPA ? Les travaux de cette thèse avaient pour buts principaux d'apporter des éléments de réponse à ces questions en caractérisant plus en avant le rôle de MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique et en décrivant une potentielle relation fonctionnelle qu'auraient ces deux protéines avec RPA au cours de ce mécanisme.

Les travaux de cette thèse ont fait l'objet d'une revue et d'un article de recherche. Les résultats de ces travaux ainsi que la méthodologie employée pour obtenir ces résultats sont compilés dans ces deux manuscrits présentés dans cette thèse. Une méthodologie complémentaire est aussi présente pour des résultats qui ne sont pas intégrés dans ces manuscrits.

Le premier article présenté dans cette thèse est une revue publiée dans le journal *Chromosoma*. Cette revue était centrée sur les rôles des homologues RPA au cours de la recombinaison méiotique. A la lumière des données bibliographiques disponibles à ce moment, nous avons suggéré différents rôles de MEIOB au cours de la recombinaison méiotique. Enfin, nous avons présenté une révision de la conservation de MEIOB chez les eucaryotes (Ribeiro et al., 2016). Cette conservation de MEIOB sera présentée dans une partie dédiée à la revue que nous avons écrite.

Le second article présenté dans cette thèse est un article de recherche qui avait pour buts (1) d'améliorer notre compréhension des interactions moléculaires entre SPATA22, MEIOB et RPA, (2) d'étudier les fonctions de ces interactions et (3) de proposer un rôle *in vivo* de MEIOB et SPATA22 et de leur interaction avec RPA au cours de la recombinaison méiotique. Pour cela, des approches bio-informatiques, biochimiques et moléculaires ont été menées pour étudier les modalités d'interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA. Enfin, une approche génétique et cytologique a été menée pour étudier le rôle de MEIOB au cours de la recombinaison méiotique. L'ensemble des résultats obtenus lors de ces travaux nous ont permis de proposer une structure du complexe MEIOB-SPATA22 et un rôle de ce complexe au cours de la recombinaison méiotique.

Enfin, mes compétences en structure protéique et dans l'étude des interactions protéine-protéine acquises au cours de mon doctorat ont également été mises à contribution pour l'étude de l'interaction entre un facteur identifié au laboratoire, MEIOC (*Meiosis Specific With Coiled-Coil Domain*) et son partenaire YTHDC2 (*YTH Domain Containing 2*). Cette contribution technique a été intégrée dans une étude du rôle du

facteur MEIOC au cours de la progression méiotique publiée dans le journal *Nature Communications* en 2016 mais ne sera pas traitée dans cette thèse (Abby et al., 2016).

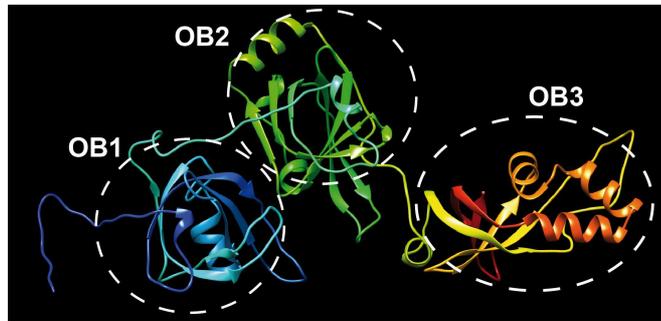
## II. Article 1 : revue sur la gestion de l'ADNsb par des protéines homologues de RPA au cours de la recombinaison homologue méiotique

Au cours de l'évolution des eucaryotes, les différentes sous-unités de RPA ont été dupliquées. La diversité de ces sous-unités de RPA suggère que des complexes RPA se sont spécialisés pour assurer des rôles précis au cours du métabolisme de l'ADN. Afin d'améliorer notre compréhension des rôles que pourrait avoir MEIOB au cours de la recombinaison méiotique, nous avons cherché à mieux comprendre les différents rôles que pouvaient accomplir les homologues de sous-unités de RPA chez différents organismes. Pour cela, nous avons récapitulé, à partir des données de la littérature, les rôles des différents homologues de sous-unités de RPA. Nous avons mis à profit ces recherches bibliographiques et évolutives pour l'écriture d'une revue publiée dans *Chromosoma* (Ribeiro et al., 2016).

- *MEIOB* est un gène conservé chez les Opisthochontes

Etant donné le fait que les duplications de sous-unités de RPA semblent être des événements relativement récurrents au cours de l'évolution des eucaryotes, nous avons cherché à re-définir la conservation de la protéine MEIOB chez les eucaryotes. Le séquençage et l'annotation de nouveaux génomes de champignons nous ont permis d'identifier un homologue de MEIOB chez le champignon *Mortierella verticillata* (Ribeiro et al., 2016). Cet homologue de MEIOB est relativement proche de la protéine humaine (22,3 % d'identité entre les deux protéines) et nous a permis de trouver des homologues de MEIOB chez d'autres espèces fongiques comme *Neurospora crassa* (Ribeiro et al., 2016). Nous avons ainsi mis en évidence l'existence d'homologues de MEIOB chez les champignons. Ce résultat suggère que *MEIOB* est un gène ancestral et pourrait avoir émergé d'une duplication d'un ancien gène *RPA1* au cours de l'évolution des Opisthochontes.

Nous n'étions pas parvenu à identifier un éventuel homologue de MEIOB chez les levures *S.cerevisiae* et *S.pombe*. Cependant, depuis l'écriture de cette revue, nous avons identifié un potentiel homologue de MEIOB chez *S.pombe*. Cet homologue, Meu32 (*Meiotic Expression Upregulated 32*) partage 21% d'identité avec la protéine MEIOB humaine et possède trois domaines OB-folds putatifs comme MEIOB (**Figure complémentaire 1**). L'expression de l'ARN messager de Meu32 augmente deux heures après induction de la méiose chez *S.pombe* (<http://bahlerweb.cs.ucl.ac.uk/>). Ce résultat suggère que Meu32 pourrait avoir un rôle au cours de la progression méiotique chez *S.pombe*. Cependant, nous ne savons pas si cet homologue est impliqué au cours de la recombinaison méiotique chez *S.pombe*. Enfin, nous n'avons toujours pas trouvé un potentiel homologue de MEIOB chez *S.cerevisiae* à ce jour.



**Figure complémentaire 1 : Prédiction de la structure de Meu32 de *S.pombe***

Représentation en rubans de Meu32 de *S.pombe*. Meu32 possède 3 domaines OB-folds putatifs comme MEIOB. (Modèle de la structure de Meu32 obtenu grâce au serveur RaptorX (Källberg et al., 2012), visualisation de la structure grâce au logiciel UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004)).

# RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination

Jonathan Ribeiro<sup>1,2,3,4</sup> · Emilie Abby<sup>1,2,3,4</sup> · Gabriel Livera<sup>1,2,3,4</sup> ·  
Emmanuelle Martini<sup>1,2,3,4</sup>

Received: 10 April 2015 / Revised: 12 September 2015 / Accepted: 14 October 2015 / Published online: 31 October 2015  
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Meiotic homologous recombination is a specialized process that involves homologous chromosome pairing and strand exchange to guarantee proper chromosome segregation and genetic diversity. The formation and repair of DNA double-strand breaks (DSBs) during meiotic recombination differs from those during mitotic recombination in that the homologous chromosome rather than the sister chromatid is the preferred repair template. The processing of single-stranded DNA (ssDNA) formed on intermediate recombination structures is central to driving the specific outcomes of DSB repair during meiosis. Replication protein A (RPA) is the main ssDNA-binding protein complex involved in DNA metabolism. However, the existence of RPA orthologs in plants and the recent discovery of meiosis specific with OB domains (MEIOB), a widely conserved meiosis-specific RPA1 paralog, strongly suggest that multiple RPA complexes evolved and

specialized to subdivide their roles during DNA metabolism. Here we review ssDNA formation and maturation during mitotic and meiotic recombination underlying the meiotic specific features. We describe and discuss the existence and properties of MEIOB and multiple RPA subunits in plants and highlight how they can provide meiosis-specific fates to ssDNA processing during homologous recombination. Understanding the functions of these RPA homologs and how they interact with the canonical RPA subunits is of major interest in the fields of meiosis and DNA repair.

**Keywords** Meiosis · Recombination · ssDNA · RPA · MEIOB · SPATA22

Meiosis is the central process of sexual reproduction. During this specialized cell division program, the genome of diploid germ cells is halved to produce haploid gametes. This process requires the pairing and formation of a physical link (chiasma) between homologous chromosomes (homologs). These events are established during meiotic prophase I, which is subdivided into four stages (for review see Page and Hawley 2003). Prophase begins with the formation of programmed DNA double-strand breaks (DSBs) during the leptotene stage. During the zygotene and pachytene stages, these DSBs are progressively repaired by homologous recombination (HR), a process that promotes and completes homolog pairing (Weiner and Kleckner 1994; Kauppi et al. 2013). Chiasmata are the product of crossovers (COs) formed during the pachytene stage. Only a subset of DSBs are repaired with a reciprocal exchange of chromosome arms to form a CO, whereas the remaining DSBs are repaired without reciprocal exchange to form noncrossovers (NCOs). COs are tightly regulated as shown by their controlled number and non-random distribution along chromosomes (Anderson et al. 1999; Martini et al.

---

This article is part of a Special Issue on "*Recent advances in meiotic chromosome structure, recombination and segregation*" edited by Marco Barchi, Paula Cohen and Scott Keeney

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00412-015-0552-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

✉ Emmanuelle Martini  
emmanuelle.martini@cea.fr

<sup>1</sup> Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Stem Cells and Radiation, University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup> CEA, DSV, IRCM, SCSR, LDG, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>3</sup> INSERM, Unité 967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

<sup>4</sup> Université Paris-Saclay, UMR-967, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France

2006; Cole et al. 2012). It is now evident that numerous factors are necessary to control the proper progression of meiotic HR and drive the maturation of intermediates to specific outcomes (for review see Youds and Boulton 2011). First, meiotic DSBs are programmed and formed through the action of several factors including the conserved topoisomerase-like transesterase SPO11, which bears the catalytic activity. DSB initiation was recently shown to be under feedback control by Tel1/ATM kinase (Carballo et al. 2013; Lange et al. 2011; Garcia et al. 2015). During a later step, the conversion of pre-crossover intermediates into COs has been demonstrated to depend on the coordination of a number of proteins (De Muyt et al. 2014; Holloway et al. 2014; Qiao et al. 2014).

Single-stranded DNA (ssDNA) is generated at multiple steps during HR (see Fig. 1) and requires specific factors for its formation, signal transduction, protection, and disappearance. Among these factors, Replication Protein A (RPA) is the principal ssDNA-binding complex and is essential for mitotic growth and meiotic progression (Soustelle et al. 2002). However, recent studies have highlighted the involvement of additional RPA homologs specifically during meiosis, notably meiosis specific with OB domains (MEIOB) a new meiosis-specific paralog of the largest subunit of RPA (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). In this review we discuss the potential specific roles of RPA and its homologs to better understand the regulation of ssDNA-containing meiotic recombination intermediates.

## Roles of ssDNA during homologous recombination

### During the mitotic cell cycle

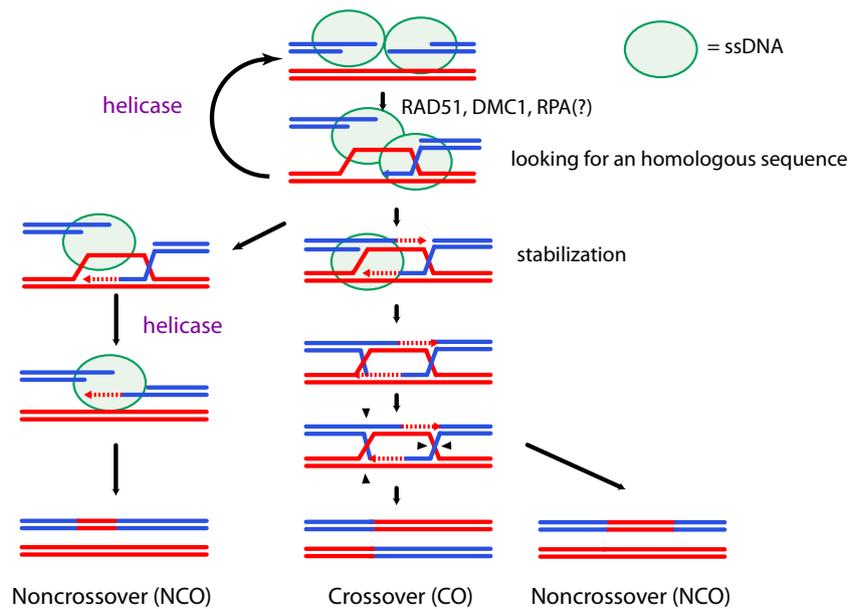
ssDNA formation is a common feature of DNA metabolism. It is generated during DNA replication, repair, and recombination (Mehta and Haber 2014). During HR, ssDNA is formed on different intermediates and bound by dedicated proteins that ensure its protection and signaling and the subsequent steps of DNA processing. HR begins with the production of 3'-ssDNA tails to invade duplex DNA during the homology search. Subsequently, D-loop formation and migration generate additional ssDNA. Shortly after formation, DSBs are recognized by the MRN complex (MRE11, RAD50, and NBS1) to initiate 5'->3'-resection (Ivanov et al. 1994; Tsubouchi and Ogawa 1998). To protect ssDNA from degradation and remove secondary structures that would prevent the loading of recombinase proteins, the RPA complex binds the resected DNA (Alani et al. 1992; Sugiyama et al. 1997; Wang and Haber 2004). RPA is subsequently replaced by the RAD51 recombinase to form a presynaptic nucleofilament in a BRCA2- and Rad52-dependent manner in mammals and yeast, respectively, with the help of RAD51 paralogs (Sung 1997; Gasior et al. 2001; Jensen et al. 2010; Suwaki et al. 2011; Gaines et al. 2015). In eukaryotic cells, it is assumed

that RPA loading precedes RAD51 loading. However, RAD51 can be loaded on ssDNA in the absence of RPA if the ssDNA is free of secondary structures (Heyer and Kolodner 1989; Sung 1994; Sugiyama et al. 1997; Gaines et al. 2015). The large subunit of RPA interacts with RAD51 through its N-terminal region and co-localizes to sites of DNA damage; however, it remains unclear whether RPA and RAD51 coexist in the nucleofilament (Golub et al. 1998; Tarsounas et al. 2003; Haber 2014).

Owing to its DNA strand-pairing activity, the nucleofilament invades a homologous DNA duplex to initiate DNA synthesis from the invading 3'-OH end using the donor sequence as the template. Genetic evidences have revealed that the mismatch repair machinery (MMR) inhibits recombination between moderately divergent regions (Evans and Alani 2000). Studies with mismatches containing substrates incubated in human cell extracts have shown that RPA is recruited at mismatch sites prior to MMR-specific members (Guo et al. 2006). Moreover, the in vitro reconstitution of MMR reaction with purified hMMR proteins has provided evidence that RPA forms part of the complex that initiates mismatch-provoked excision, suggesting that RPA plays a role in the early steps of the MMR. It remains unclear whether RPA collaborates with the MMR machinery in mismatch tolerance during the search for homologous sequences that occurs during HR. Furthermore, whether RPA ensures this role on the nucleofilament or after loading onto the D-loop formed during strand exchange is an open question. Evidence for the presence of RPA on the D-loop has been provided by several observations (Wang and Haber 2004). Biochemical assays showed that RPA strongly enhances strand exchange by stabilizing RAD51-dependent pairing after strand invasion and stimulates DNA synthesis through its interaction with DNA polymerases alpha and delta after invasion (Egglar et al. 2002; Sneed et al. 2013). RPA-dependent strand invasion stabilization is achieved by preventing reversal of the strand exchange reaction. Chromatin immunoprecipitation of RPA performed in *Saccharomyces cerevisiae* revealed that RPA is retrieved on both the donor and the recipient sequences with time differences confirming the presence of RPA first on the broken strand and then on the D-loop in vivo (Wang and Haber 2004). Moreover, in vitro studies have indicated that RPA favors strand annealing directed by yeast or human RAD52 (Sugiyama et al. 1998; Jensen et al. 2010). Finally, the importance of RPA during second-end capture has been demonstrated by biochemical assays performed with the *S. cerevisiae rfa1-t11* mutant. This mutant supports the RAD52-dependent loading of RAD51 and strand invasion but exhibited failure in second-end capture (Sugiyama et al. 2006).

### During prophase I of meiosis

Even though meiotic and mitotic HR share common features and factors, several facets of HR differ. DSBs are programmed



**Fig. 1** Meiotic recombination and ssDNA. Meiotic double strand breaks are repaired as crossovers (CO) or non-crossovers (NCOs) through different intermediates. After DSBs formation, resection is initiated to form 3'-ssDNA tails. The 3'-tail is then coated by the recombinases to invade the homologous sequence on the homolog. A ssDNA-binding protein such as RPA must help to stabilize and protect ssDNA before

the formation of the presynaptic filament. Proper strand invasion is stabilized to initiate DNA synthesis and then either further stabilized or destabilized to be repaired by synthesis-dependent strand annealing (SDSA). The stabilized intermediates (double Holliday junctions) can either form a NCO outcome or be resolved by nuclease activity to form a CO or a NCO outcome. *Green circles* show ssDNA

during meiosis and involve the presence of specific factors at DSB sites, including before DSB formation. Our knowledge regarding the proteins required for meiotic DSB formation comes mostly from studies performed in *S. cerevisiae*, which has at least nine proteins that are essential to this process, whereas only three have so far been identified in mice. In *S. cerevisiae*, Mer2 is loaded onto chromatin to coordinate DNA replication and DSB formation in a phosphorylation-dependent manner (Henderson et al. 2006; Murakami and Keeney 2014). The remaining proteins are subsequently loaded to induce DSB formation through the catalytic activity of Spo11. Interestingly, the MRX complex (Mre11, Rad50, and Xrs2) which is involved in ssDNA formation to produce an ssDNA 3' end during mitotic HR, is essential for DSB formation in *S. cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* (Borde 2007). This observation indicates that a complex loaded on broken ends during mitotic HR to initiate ssDNA processing is present before DSB formation during meiotic HR. Consequently, the chromatin context in which ssDNA processing occurs differs between both types of HR. Interestingly, although RPA foci are detected on unsynapsed chromosomes suggesting the presence of RPA on ssDNA before strand invasion, the precocious formation of numerous and bright RAD51 foci at the time the first RPA foci are detected may bring into question whether RPA binding on ssDNA precedes the loading of recombinases during meiotic HR in mammals as observed during mitotic HR (Plug et al. 1998; Moens et al. 2002; Oliver-Bonet et al. 2007 and personal observation E.A.,

EM). Of note, RPA foci have been observed on chromosome spreads performed in a *rad50S* mutant of *S. cerevisiae*. This mutant is unable to process DNA after DSB formation and is not expected to produce ssDNA suggesting that normal resection is not required to recruit RPA to DSB sites (Gasior et al. 1998). This finding could be explained through the direct interaction described between MRE11 and RPA or by nonspecific DNA degradation (Gasior et al. 1998).

Unlike mitotic recombination, meiotic recombination exhibits preference to use as the repair template a DNA sequence present on the homologous chromosome rather than a DNA sequence on the sister chromatid and favors the formation of COs (Schwacha and Kleckner 1994; Cole et al. 2014). In addition to RAD51, most organisms possess the meiosis-specific DMC1 recombinase, which is essential together with RAD51 for proper strand invasion (Bishop et al. 1992; Yoshida et al. 1998). Studies performed in *S. cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* suggest that during meiotic HR, RAD51 would preferentially play an accessory role to allow DMC1 recombinase activity (Cloud et al. 2012; Da Ines et al. 2013). These observations suggest that RAD51 and DMC1 can load together on both broken ends after DSB formation. However, the distances observed between RAD51 and DMC1 foci by immunolocalization in *A. thaliana* support the hypothesis that distinct filaments would be formed on each end (Kurzbaue et al. 2012). Although a strong effort has been made to decipher the formation, maintenance, and dynamics of the RAD51/DMC1 nucleofilament, further investigations remain

necessary (Brown and Bishop 2014). Studies performed in plants and mammals indicate that BRCA2 interacts with DMC1 and RAD51, suggesting that BRCA2 promotes the formation of the meiotic nucleofilament containing RAD51 and DMC1 (Siaud et al. 2004; Thorslund and West 2007; Seeliger et al. 2012). Genetic evidence has confirmed the importance of BRCA2 to mediate the proper formation of the meiotic presynaptic nucleofilament (Sharan et al. 2004). In addition to stimulating nucleofilament formation, yeast RAD52 (yRad52) is required for the post-invasion steps of meiotic HR (Lao et al. 2008). Indeed, the annealing of the second broken end during synthesis-dependent strand annealing (SDSA) and second-end capture to complete the formation of double Holliday junctions (dHJs) are dependent on yRad52 in *S. cerevisiae* and BRCA-2 in *C. elegans* (Sugiyama et al. 2006; Petalcorin et al. 2006). However, in vitro assays have demonstrated that hBRCA2 does not anneal RPA-coated ssDNA, whereas hRAD52 does, suggesting that two proteins are needed in mammals compared with one in yeast and *C. elegans* (Jensen et al. 2010; Petalcorin et al. 2006). Nonetheless, in contrast to what has been described in yeast, knock-outs of the *Rad52* gene in mammals show few phenotypes with no obvious defect in response to DNA damaging agents and no meiotic defects (Rijkers et al. 1998).

The presence of recombinases on the presynaptic filament is essential for the displacement and invasion of the homologous sequence. However, the nature, organization, and dynamics of the nucleofilament formed on the second broken end remain to be determined in vivo. Given the specific outcomes of this end (i.e., strand annealing or second-end capture) it is unclear whether the recombinases and/or RPA are loaded on that end. Immunostaining of RPA performed on chromosome spreads in numerous species (mammals and plants) have shown that RPA foci are detected up to the pachytene stage, specifically until the formation of MLH1 CO-associated foci (Plug et al. 1998). This finding suggests that RPA is present on joint molecules after their stabilization with the MutS homologs, MSH4-MSH5. Interestingly, the phosphoregulation of RPA appears to play a role in the control of CO formation. In *S. cerevisiae*, the phosphorylation of the RPA2 subunit is controlled by the yeast ATR ortholog, Mec1. A phosphomimetic form of RPA2 induces changes in genetic distances and CO interference, suggesting a role for RPA2 phosphorylation in CO regulation (Bartrand et al. 2006).

For decades, RPA has been considered a strong unalterable complex that is well conserved among species. However, the identification in plants of variants of the three subunits of RPA that can form different complexes with specific activities strongly underlines the potential regulatory role that such complexes can play (Shultz et al. 2007). The existence of alternative RPA complexes in mammalian cells has been suggested by the discovery of RPA4, which bears 50 % identity with RPA2, in a cDNA library derived from HeLa cells

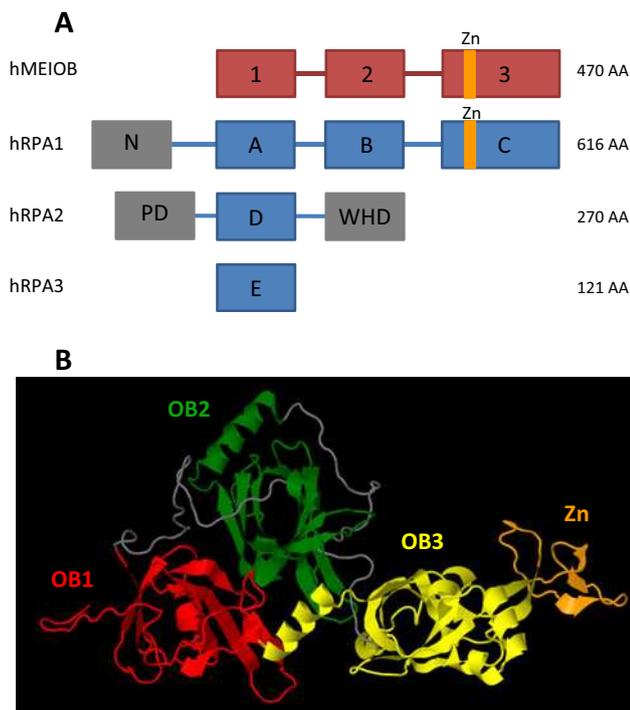
(Keshav et al. 1995). More recently, it has been proposed that RPA4 is more likely to be involved in the maintenance of genomic integrity than in its replication (Haring et al. 2010). Moreover, recent studies identified a new meiosis-specific gene in metazoans, MEIOB, a paralog of RPA1 that interacts with RPA2 (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). MEIOB is essential for proper meiotic recombination in mice and interacts with ssDNA. In-depth characterization of these multiple complexes should allow a better understanding of the mechanisms regulating meiotic recombination and the maintenance of genome integrity.

## RPA the major ssDNA-binding protein

### Canonical RPA complex

The ssDNA-binding replication protein A (RPA) is an evolutionarily conserved heterotrimeric complex involved in DNA replication, repair, and recombination which is essential for cell survival (for a review see Wold 1997). RPA was originally identified through its essential role for SV40 DNA replication in vitro (Wold and Kelly 1988).

The RPA complex is composed of three subunits: RPA1, RPA2, and RPA3. X-ray diffraction studies of the crystallized human complex revealed that the three subunits form together a trimer that is stabilized through the trimerization core produced by the interaction of helices from each subunit (Bochkareva et al. 2002). Among the three subunits, RPA1 possesses the highest affinity for ssDNA through its three oligonucleotide/oligosaccharide-binding folds (OB-fold), denoted DBD-A, DBD-B and DBD-C (Wold 1997). RPA2 and RPA3 also possess OB-fold domains, named DBD-D and DBD-E, which are capable of interacting with ssDNA (Philipova et al. 1996; Salas et al. 2009) (see Fig. 2). RPA binds to ssDNA in two conformational states that differ in the length and affinity of the bound DNA. A study of the structure of a crystallized RPA-ssDNA complex from the fungus *Ustilago maydis* demonstrated that the two conformational states of RPA-ssDNA binding provides opposing affinities for DNA and proteins (Fan and Pavletich 2012). The DBD-C of RPA1 is longer than the two other OB-folds and possesses an insertion of approximately 30 amino acids with a conserved zinc ion-binding domain of type C-4X-C-13X-C-2X-C (Heyer et al. 1990; Erdile et al. 1991). This domain is dispensable for RPA1 ssDNA-binding activity but influences the overall ssDNA-binding affinity of the RPA complex (Kim et al. 1996; Dong et al. 1999; Walther et al. 1999). However, the functional role of this domain remains poorly understood. Kim et al. and Walther et al. reported that mutating this domain strongly impaired SV40-dependent DNA replication, whereas Dong et al. observed only a slight delay.



**Fig. 2** Domain structures of RPA subunits and MEIOB. **a** Schematic representation of MEIOB and RPA subunits protein domains. The folded domains and unfolded linkers are presented as *boxes* and *lines* respectively. The *red* and *blue* boxes represent MEIOB and RPA subunit OB- folds, respectively. The *orange* domains illustrate zinc ion-binding domains. The *grey* boxes represent domains that are not involved in ssDNA-binding activity, such as the N-terminal domain of RPA1 and the phosphorylation domain (PD) and the winged-helix domain (WHD) of RPA2. **b** Stereo ribbon presentation of predicted MEIOB structure model obtained from the RaptorX server (Kallberg et al. 2012) and visualized with Jmol ([www.jmol.org](http://www.jmol.org)). OB-folds 1, 2, and 3 and zinc ion-binding domain are represented in *red*, *green*, *yellow*, and *orange*, respectively. Unfolded linkers are represented in *grey*

### Existence and properties of multiple RPA complexes

Genome duplications occurred periodically during eukaryotic evolution such that some organisms possess several homologs of RPA subunits that may have meiosis-specific functions. Such multiple RPAs have been described in the plants *A. thaliana* and *Oryza sativa* and in the protists *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, and *Cryptosporidium parvum* (Rider et al. 2005; Gopalakrishnan and Kumar 2013).

The flowering plant *A. thaliana* contains five homologs of RPA1, two homologs of RPA2, and two homologs of RPA3. The rice *O. sativa* possesses three homologs of RPA1 and RPA2 and only one homolog of RPA3. Interestingly, despite the multiple possible combinations, only three complexes have been identified in rice and four in *A. thaliana*, respectively (Ishibashi et al. 2006; Eschbach and Kobbe 2014). These observations suggest the existence of specific interactions between subunits and/or specialized expression that restricts the possibilities of interactions.

Genetic studies performed with mutants of AtRPA1 homologs led to the classification of these homologs into two groups. AtRPA1a, AtRPA1c, and AtRPA1e are hypothesized to be involved in the response to DNA-damaging agents and consequently in DNA repair, whereas AtRPA1b and AtRPA1d are proposed to be necessary for normal DNA replication during developmental growth (Aklilu et al. 2014). No meiotic defect could be observed in *Atrpa1b,c,d,e* mutants (Aklilu et al. 2014). A careful genetic study of *Atrpa1a* during meiosis revealed its role in meiotic HR. Although the absence of fragmented DNA suggests that DSBs are repaired in this mutant, immunostaining performed on meiotic chromosome spreads showed a reduction in the MLH1 foci number, strongly suggesting a diminution of interfering COs (class I). Metaphase I analysis confirmed a reduction in the chiasma number. The observed phenotype suggested that meiosis progressed normally until class I CO formation. Therefore, the authors proposed that AtRPA1a could be involved in the second-end capture of the broken end at the recombination intermediates designated to form class I COs controlled by MLH1/MLH3 (Osman et al. 2009). Furthermore, mutation of both *Atrpa1c* and *Atrpa1a* was found to induce complete sterility and marked chromosome fragmentation during meiosis. The findings that the *Atrpa1a/Atrpa1c* double mutant is sterile and that the *Atrpa1c* mutant does not show fertility problems suggest that AtRPA1c could play an early role during meiotic recombination that could be overcome by AtRPA1a in the absence of AtRPA1c.

Less genetic data are available regarding the functions of RPA1 homologs in rice. To date, only the function of OsRPA1a has been studied. The *osrpa1a* mutant showed normal vegetative growth but an increased sensitivity to DNA damage induced by genotoxic agents, including UV irradiation. *osrpa1a* mutants are sterile and show chromosomal fragmentation despite normal chromosome pairing and synapsis during meiosis (Chang et al. 2009). These data suggest that OsRPA1a is dispensable for replication but required for somatic and meiotic DNA repair.

Not much is known about the biochemical properties of the RPA complexes in rice, however, the DNA binding properties of AtRPA complexes were recently published (Eschbach and Kobbe 2014). The authors concluded that complexes containing AtRPA1a show higher affinity for unmodified ssDNA than ssDNA with modifications, such as abasic sites, and stronger dsDNA-destabilizing activity than AtRPA1b-containing complexes. These results were unexpected in light of genetic data suggesting that AtRPA1b is specifically involved in DNA replication because the *Atrpa1a* mutant did not show growth defects in the absence of DNA-damaging agents. Such results may be explained by the absence of RPA-interacting partners or post-translational modifications in the in vitro assay. In addition, the study revealed that the identity of the RPA3 homolog may significantly influence the

DNA-binding properties of the complexes. This result was unexpected given the weak DNA-binding affinity of RPA3, a subunit that was proposed to mediate protein-protein interaction (Bochkarev et al. 1999).

Collectively, these genetic and biochemical studies suggest that multiple RPA complexes have evolved and become specialized to subdivide their roles during the various stages of DNA metabolism.

## MEIOB: a meiosis-specific RPA1 homolog

### MEIOB and evolution

For several decades, RPA4, which belongs to the RPA2 family, was the only RPA paralog to have been found in mammals. However, recent works identified *Meiob* as a new meiosis-specific paralog of *Rpa1* in metazoans (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). *Meiob* orthologs have been retrieved in the genomes of almost all metazoans, with the exception of *Nematoda* and a non-meiotic specific ortholog of MEIOB, named Hold'em (HDM), has been described in *Drosophila* (Joyce et al. 2009). Interestingly, an ortholog has also been found in the single-celled organism *Capsaspora owczarzaki* (Souquet et al. 2013). This finding strongly suggests that a duplication event that occurred before the emergence of metazoans and multicellularity enabled *Meiob* to evolve from an ancestral *Rpa1* gene (approximately 600 million years ago). However, we recently identified sequences similar to metazoan *Meiob* in several fungal genomes such as the zygomycotan fungi *Mortierella verticillata*, and in genomes of ascomycetes, such as *Neurospora crassa*, suggesting that the evolution of *Meiob* may be earlier than first thought (22.3 % identity between human MEIOB and MEIOB-like of *M. verticillata*, see Fig. 3, unpublished data). Deciphering the function of these *Meiob*-like proteins will help us to better understand the role of MEIOB. To date, we have not identified a *Meiob* ortholog in amoebozoan genomes. The fact that MEIOB has been retrieved from metazoans, fungi, and *Capsasporidae* (*C. owczarzaki*) suggests that the appearance of MEIOB occurred during the evolution of the *Opisthokonta* monophyletic group. Surprisingly, putative *Meiob* orthologs have not been identified in the *S. cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe* genomes. This could be explained by the loss of an ancestral *Meiob* gene during the evolution of these species—a situation that has frequently been observed with other meiotic genes. For example, the meiotic recombinase DMC1 conserved from yeasts to humans is absent from the *C. elegans*, *Drosophila melanogaster*, and *Sordaria macrospora* genomes.

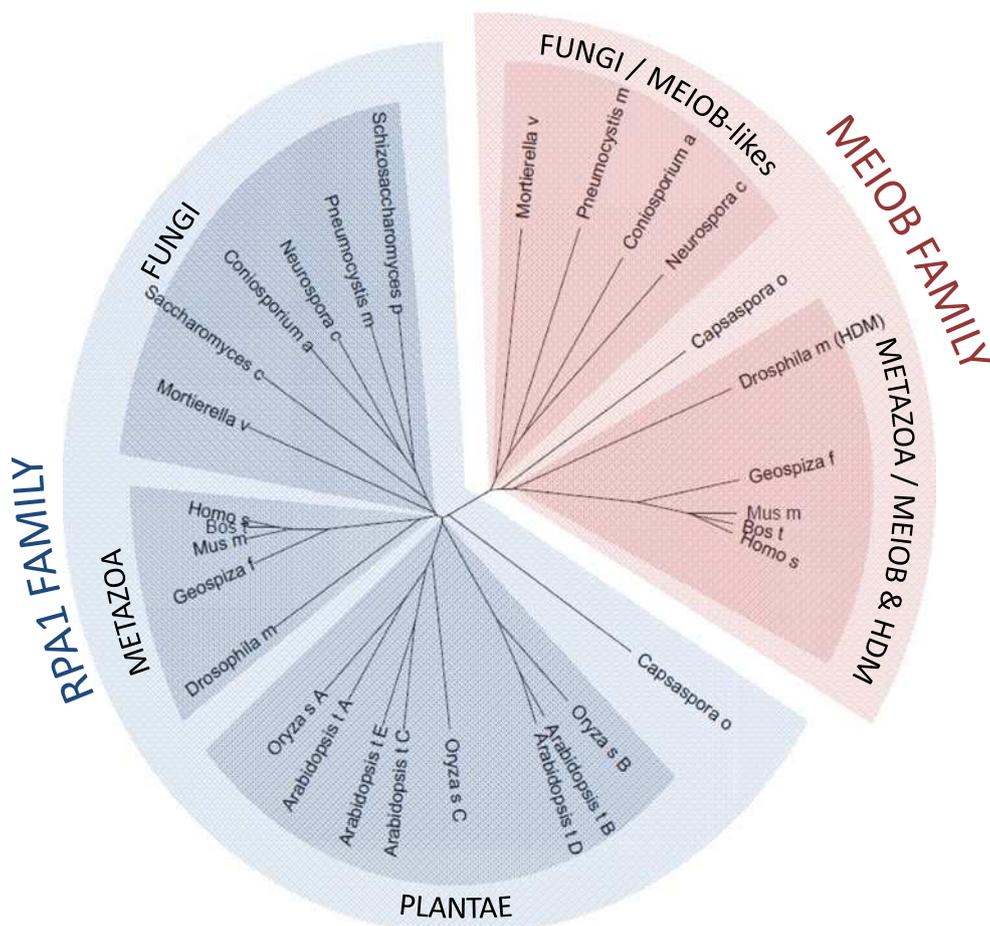
### Structure of MEIOB

MEIOB possesses three OB-folds homologous to those of RPA1 (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). Similar to RPA1, MEIOB possesses two OB-folds and a long C-terminal OB-fold with a 30-amino acid insertion containing a putative zinc ion-binding domain (see Fig. 2). We identified this motif in the human MEIOB sequence using the Sequence Similarity DataBase of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG SSDB, <http://www.kegg.jp/kegg/ssdb>). This C-2X-C-10X-C-2X-C motif resembles that of a double zinc ribbon (DZR, unpublished data) and differs from that present in RPA1 only in the number of residues between the cysteines. We identified this motif in all metazoan MEIOB as well as in the MEIOB-like protein of the *M. verticillata*. The existence of this motif reinforces the hypothesis of a common origin between MEIOB and RPA1 even though MEIOBs and MEIOB-likes form a monophyletic group distinct from RPA1. The role of the putative zinc ion-binding domain of MEIOB should be the subject of future work to specify MEIOB functions during meiotic HR.

Compared with the very similar OB-fold domains, RPA1 and MEIOB significantly differ in the N-terminal parts of the proteins. The well-conserved N-terminal domain of RPA1 is absent in MEIOB. This domain ensures specific interactions between RPA1 and numerous partners such as DNA polymerase alpha and checkpoint proteins including ATRIP, RAD9 (53BP1), the MRE11/RAD50/NBS1 complex, and the tumor suppressor p53 (Kim et al. 1996; Bochkareva et al. 2002; Xu et al. 2003). This absence of such an N-terminal domain suggests that MEIOB developed its own specific interactions with a limited set of partners. This difference may support the existence of a distinct role for MEIOB and partially explain why RPA1 cannot compensate for the absence of MEIOB during meiosis in *Meiob*<sup>-/-</sup> mice (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). The immunoprecipitation of MEIOB from testis extracts revealed an interaction between MEIOB and RPA2, a subunit of the RPA complex, and SPATA22, a meiosis-specific factor essential to prophase I progression (Luo et al. 2013; La Salle et al. 2012). However, the role and the nature of these interactions remain to be determined.

### Putative roles of MEIOB

We identified *Meiob* as a meiosis-specific gene based on its differential expression between male and female embryonic germ cells at the time when only female germ cells have entered meiosis (Souquet et al. 2013). Luo et al. identified MEIOB through a systematic proteomic screen of meiosis-specific chromatin-associated proteins performed on mouse testes (Luo et al. 2013). The sterility of male and female *Meiob*<sup>-/-</sup> mice is due to zygotene/pachytene arrest in prophase I of meiosis. MEIOB is essential to the repair of meiotic DSBs



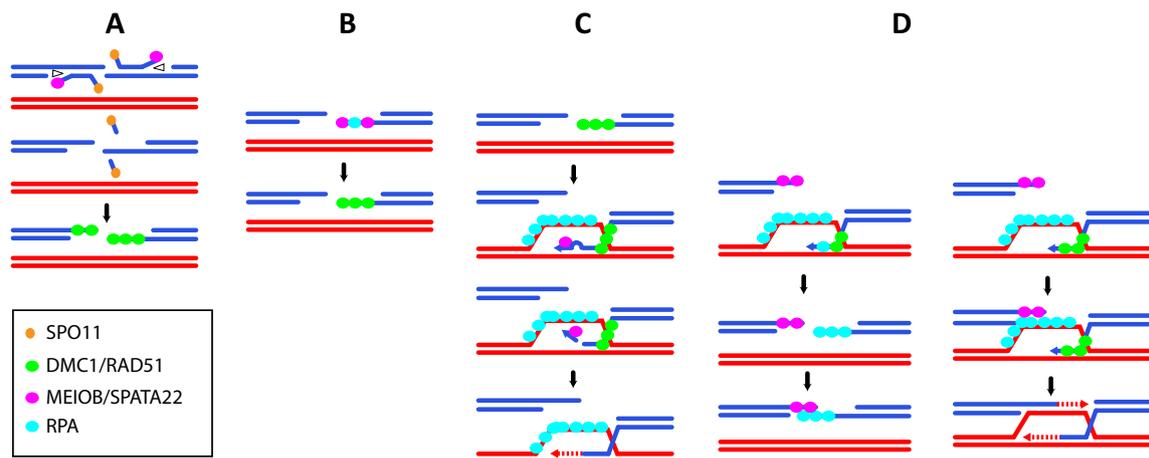
**Fig. 3** Phylogenetic relationship between RPA and MEIOB homologs. Multiple alignments of full-length MEIOB and RPA1 protein were processed with Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The phylogenetic tree obtained with Clustal Omega was visualized with Archaeopteryx Version 0.9901 beta (Han and Zmasek 2009). MEIOB and RPA1 proteins form distinct families. Represented species: *H. sapiens*, *Homo sapiens*; *B. taurus*, *Bos taurus*; *M. musculus*, *Mus musculus*; *G. fortis*, *Geospiza fortis*; *D. melanogaster*, *Drosophila*

*melanogaster*; *C. owczarzaki*, *Capsaspora owczarzaki*; *N. crassa*, *Neurospora crassa*; *C. apollinis*, *Coniosporium apollinis*; *P. murina*, *Pneumocystis murina*; *M. verticillata*, *Mortierella verticillata*; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe*; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *O. sativa*, *Oryza sativa*; *A. thaliana*, *Arabidopsis thaliana*. The amino acid sequences and accession numbers are available in supplementary material (Sup. 1)

and to proceed through meiosis. MEIOB is located on chromosome axes from leptotene to pachytene (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). The fact that MEIOB is recruited to meiotic chromosomes in a *Dmc1*<sup>-/-</sup> mutant which is unable to undergo strand invasion of the homologous sequence suggests that MEIOB could play an early role on the ssDNA formed during DNA resection after DSB formation (Souquet et al. 2013). However, given that MEIOB persists until the pachytene stage, a later role in the processing of joint molecules formed during strand invasion is also possible (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). Interestingly, we reported that in the absence of MEIOB, the recombinases DMC1 and RAD51 are loaded but not maintained on chromosome axes while RPA foci persist, suggesting that DSBs are not repaired (Souquet et al. 2013). This observation is reinforced by similar observations described in a rat mutant lacking functional SPATA22, a MEIOB partner (Ishishita et al. 2014). These

results may suggest that the stabilization of the meiotic recombinases requires MEIOB and SPATA22. However, an alternative explanation would be that in absence of efficient DNA repair, the recombinases would be removed from recombination intermediates by helicase activity. The fact that RAD51 is loaded and not removed in a *Dmc1*<sup>-/-</sup> mutant that is blocked prior to strand invasion, may suggest that recombination intermediates are not arrested at the same step in *Meiob*<sup>-/-</sup> and *Dmc1*<sup>-/-</sup> mutants (Pittman et al. 1998).

We found that only a fraction of MEIOB co-localizes with RPA2, particularly at early prophase I and, similarly to RPA, MEIOB is present on unsynapsed DNA (Souquet et al. 2013). These observations question whether MEIOB and RPA are loaded together on ssDNA formed on both sides of a DSB or individually loaded on each side of the DSB to provide different identities. We can also consider that similarly to AtRPA1c and AtRPA1a in *A. thaliana*, RPA1 and MEIOB



**Fig. 4** Putative roles for MEIOB during meiotic recombination. **a** MEIOB is loaded during the early steps of resection to release Spo11-oligo through its 3'-exonuclease activity with the help of a helicase (*opened triangle*). **b** MEIOB is loaded with or without RPA on the 3'-ssDNA tail. **c** MEIOB 3'-exonuclease activity removes the 3' end of the

invading strand in the presence of mismatches formed between the donor and invading strand to allow initiation of DNA synthesis. **d** MEIOB is loaded on one side of the broken end to allow strand annealing or second-end capture

could be involved in different steps of the meiotic recombination process. Interestingly, AtRPA1a is located on the chromosome axis from the leptotene to pachytene stage, similarly to MEIOB and RPA1 but is essential only after stabilization of the joint molecules, as suggested by the indistinguishable dynamics of MSH4 foci between wild-type and mutant. However, AtRPA1c is essential for meiotic recombination only in the absence of AtRPA1a, suggesting that AtRPA1a could overcome AtRPA1c early role during DSB repair. In contrast, RPA1 cannot overcome the absence of MEIOB, suggesting that MEIOB could possess activities similar to those of both AtRPA1c and AtRPA1a.

In vitro assays have indicated that the full-length protein, as well as a truncated form containing the second OB-fold, binds with higher affinity to ssDNA than to dsDNA (Souquet et al. 2013; Luo et al. 2013). These results confirm that MEIOB possesses ssDNA-binding activity, as predicted by the presence of the OB-fold. Strikingly, Luo et al. also observed  $Mg^{2+}$ -dependent 3'-exonuclease activity specific to ssDNA when they expressed and purified the truncated form of MEIOB from *E. coli* (Luo et al. 2013). Such activity was unexpected for a paralog of RPA1, which is hypothesized to protect ssDNA from nucleases activities. Notably, no nuclease activity has been described for any RPA complex. To test the specificity of this activity, Luo et al. designed a mutation, S251A, which partially affected the exonuclease activity of the truncated MEIOB. However, the ssDNA-binding activity of the protein was also impaired by this mutation. Mutating acidic amino acids usually found in the catalytic site of nucleases should be of special interest because acidic amino acids are not thought to mediate interactions with nucleotides, unlike the hydroxyl function lost by mutation in a serine residue.

Nonetheless, 3'-ssDNA tails need to be processed during meiotic homologous recombination. Luo et al. proposed that the putative exonuclease activity of MEIOB could process 3' flaps formed after DNA synthesis during synthesis-dependent strand annealing (SDSA) or during dHJ formation. This activity may also be used after invasion of the homologous chromosomes, when sequence divergences between the invading strand and the donor induce the formation of DNA mismatches. Consequently the presence of these mismatches can induce the formation of a 3' flap. In *S. cerevisiae*, it has been shown that during mitotic HR these 3' flaps are processed by the endonuclease activity of the Rad1-Rad10 heterodimer to allow DNA synthesis to proceed and progress via recombination (Ivanov and Haber 1995). Through its nuclease activity, MEIOB may be involved in processing the 3' flaps formed during strand invasion in meiosis (Fig. 4). Moreover, the MRE11 3'-exonuclease activity has been shown to be involved in the release of SPO11-oligonucleotides during meiotic DSB processing (Garcia et al. 2011). In a similar manner, MEIOB 3'-exonuclease activity with the help of a helicase could participate in early DSB processing (Fig. 4). Independently of its putative nuclease activity, Luo et al. proposed that due to its interaction with RPA2, MEIOB could provide a physical connection between an RPA-coated D-loop and the second broken end (Luo et al. 2013). An alternative possibility is that, similar to what has been proposed for AtRPA1a, MEIOB could be loaded on the second end and interact specifically with a RAD52-like factor and/or could possess an activity to anneal the second DSB end (Fig. 4). In addition, little is known about SPATA22. Similarly to MEIOB, SPATA22 is essential for meiotic HR and its invalidation induces a phenotype similar to that of MEIOB (La Salle et al. 2012; Ishishita et al. 2014). Moreover, the stabilities of

MEIOB and SPATA22 are dependent on each other strongly suggesting that SPATA22 and MEIOB form a complex (Luo et al. 2013 and personal observations). MEIOB and SPATA22 show only a partial co-localization with RPA and are essential to meiotic HR. This observation suggests that MEIOB/SPATA22 and the RPA complex can act both independently and together on DNA. Deciphering the role of SPATA22 during meiosis will be essential to better understand the function of the MEIOB/SPATA22 complex during meiotic homologous recombination.

## Conclusion

In this review, we describe RPA-like proteins from different species. Studies in plants support the hypothesis that multiplying RPA family members may provide more specificity to the regulation of DNA metabolism and yield a larger panel of interacting factors. The existence of RPA4 in mammalian cells and MEIOB in metazoans and many fungi strongly suggests that this multiplicity is not restricted to plants. Because meiotic recombination is a conserved mechanism among species, we can investigate whether the role of MEIOB in species devoid of MEIOB could be supported by RPA. Conversely, MEIOB could also provide species-specific features to meiotic recombination. As an example, *S. cerevisiae* does not possess MEIOB. Interestingly, among the large panel of generated scRPA mutants and that affect specific functions, no meiosis-specific mutant has been identified (Soustelle et al. 2002). Based on the existence of homologies between scRPA and MEIOB which are absent in mammalian RPA, we also sought to identify specific meiotic domains in scRPA. Unfortunately, to date, the mutations of the putative domain tested did not allow us to identify any residues with a specific meiotic function in scRPA. These data would support the hypothesis that the presence of MEIOB provides species-specific features to the meiotic process, a hypothesis that will require further investigations. To better understand the role of MEIOB, it would be informative to know whether its recruitment is restricted to meiotic DSBs. Studying MEIOB localization during the repair of different types of DNA damage induced in mammalian mitotic cells after introducing *MEIOB* by transfection or in meiotic cells lacking meiotic DSBs (i.e., *Spo11*<sup>-/-</sup> mice) should shed light on the minimal requirements for *in vivo* MEIOB recruitment. Numerous uncertainties persist regarding the existence and putative purposes of different ssDNA-binding factors between mitotic and meiotic HR. Although RPA and MEIOB can partly co-localize on the meiotic chromosome axis, details of the dynamics of the various factors involved in ssDNA metabolism during meiosis are unclear. In this regard, deciphering whether MEIOB or RPA1 arrives and binds ssDNA first would be highly informative.

Understanding the nature and the role of specific ssDNA-interacting factors will provide essential key elements to

improve our knowledge of the dynamics and regulation of meiotic recombination. This will also afford an original approach for deepening our understanding of the specific roles of canonical RPAs.

**Acknowledgments** We thank Matt Neale for providing critical comments regarding the manuscript. We thank members of Livera's lab for the technical support provided and acknowledge the funding provided by la Ligue Regionale Contre le Cancer. J.R. and E.A. are funded by the IRTELIS fellowships (CEA), and E.A. is funded by Fondation ARC.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no competing interests.

**Ethics approval and consent to participate** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Aklilu BB, Soderquist RS, Culligan KM (2014) Genetic analysis of the replication protein A large subunit family in Arabidopsis reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Res* 42:3104–3118
- Alani E, Thresher R, Griffith JD, Kolodner RD (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of  $\gamma$ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* 227: 54–71
- Anderson LK, Reeves A, Webb LM, Ashley T (1999) Distribution of crossing over on mouse synaptonemal complexes using immunofluorescent localization of MLH1 protein. *Genetics* 151:1569–1579
- Bartrand AJ, Iyasu D, Marincio SM, Brush GS (2006) Evidence of meiotic crossover control in *Saccharomyces cerevisiae* through Mec1-mediated phosphorylation of replication protein A. *Genetics* 172: 27–39
- Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69:439–456
- Bochkarev A, Bochkareva E, Frappier L, Edwards AM (1999) The crystal structure of the complex of replication protein A subunits RPA32 and RPA14 reveals a mechanism for single-stranded DNA binding. *EMBO J* 18:4498–4504
- Bochkareva E, Korolev S, Lees-Miller SP, Bochkarev A (2002) Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J* 21:1855–1863
- Borde V (2007) The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosome Res* 15:551–563

- Brown MS, Bishop DK (2014) DNA strand exchange and recombination homologs in meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016659. doi:10.1101/cshperspect.a016659
- Carballo JA, Panizza S, Serrentino ME, Johnson AL, Geymonat M, Borde V, Klein F, Cha RS (2013) Budding yeast ATM/ATR control meiotic double-strand break (DSB) levels by down-regulating Rec114, an essential component of the DSB-machinery. *PLoS Genet* 9:e1003545
- Chang Y, Gong L, Yuan W, Li X, Chen G, Li X, Zhang Q, Wu C (2009) Replication protein A (RPA1a) is required for meiotic and somatic DNA repair but is dispensable for DNA replication and homologous recombination in rice. *Plant Physiol* 151:2162–2173
- Cloud V, Chan YL, Grubb J, Budke B, Bishop DK (2012) Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science* 337:1222–1225
- Cole F, Baudat F, Grey C, Keeney S, de Massy B, Jasin M (2014) Mouse tetrad analysis provides insights into recombination mechanisms and hotspot evolutionary dynamics. *Nat Genet* 46:1072–1080
- Cole F, Kauppi L, Lange J, Roig I, Wang R, Keeney S, Jasin M (2012) Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat Cell Biol* 14:424–430
- Da Ines O, Degroote F, Goubely C, Amiard S, Gallego ME, White CI (2013) Meiotic recombination in arabidopsis is catalysed by DMC1, with RAD51 playing a supporting role. *PLoS Genet* 9:e1003787
- De Muyt A, Zhang L, Piolot T, Kleckner N, Espagne E, Zickler D (2014) E3 ligase Hei10: a multifaceted structure-based signaling molecule with roles within and beyond meiosis. *Genes Dev* 28:1111–1123
- Dong J, Park JS, Lee SH (1999) In vitro analysis of the zinc-finger motif in human replication protein A. *Biochem J* 337:311–317
- Eggler AL, Inman RB, Cox MM (2002) The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J Biol Chem* 277:39280–39288
- Erdile LF, Heyer WD, Kolodner R, Kelly TJ (1991) Characterization of a cDNA encoding the 70-kDa single-stranded DNA-binding subunit of human replication protein A and the role of the protein in DNA replication. *J Biol Chem* 266:12090–12098
- Eschbach V, Kobbe D (2014) Different replication protein A complexes of Arabidopsis thaliana have different DNA-binding properties as a function of heterotrimer composition. *Plant Cell Physiol* 55:1460–1472
- Evans E, Alani E (2000) Roles for mismatch repair factors in regulating genetic recombination. *Mol Cell Biol* 20:7839–7844
- Fan J, Pavletich NP (2012) Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. *Genes Dev* 26:2337–2347
- Gaines WA, Godin SK, Kabbinavar FF, Rao T, VanDemark AP, Sung P, Bernstein KA (2015) Promotion of presynaptic filament assembly by the ensemble of *S. cerevisiae* Rad51 paralogs with Rad52. *Nat Commun* 6:7834. doi:10.1038/ncomms8834
- Garcia V, Gray S, Allison RM, Cooper TJ, Neale MJ (2015) Tel1-mediated interference suppresses clustered meiotic double-strand-break formation. *Nature* 520:114–118. doi:10.1038/nature13993
- Garcia V, Phelps SE, Gray S, Neale MJ (2011) Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479:241–244. doi:10.1038/nature10515
- Gasior SL, Olivares H, Ear U, Hari DM, Weichselbaum R, Bishop DK (2001) Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8411–8418
- Gasior SL, Wong AK, Kora Y, Shinohara A, Bishop DK (1998) Rad52 associates with RPA and functions with rad55 and rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev* 12:2208–2221
- Golub EI, Gupta RC, Haaf T, Wold MS, Radding CM (1998) Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* 26:5388–5393
- Gopalakrishnan AM, Kumar N (2013) Opposing roles for two molecular forms of replication protein A in Rad51-Rad54-mediated DNA recombination in *Plasmodium falciparum*. *MBio* 4:e00252–13
- Guo S, Zhang Y, Yuan F, Gao Y, Gu L, Wong I, Li GM (2006) Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem* 281:21607–21616
- Haber J (2014) RPA and Rad51 assembly can be assayed *IN VIVO*. In: Scholl S (ed) *Genome stability*. Garland Science, New York, pp 58–60
- Han MV, Zmasek CM (2009) phyloXML: XML for evolutionary biology and comparative genomics. *BMC Bioinformatics* 10:356
- Haring SJ, Humphreys TD, Wold MS (2010) A naturally occurring human RPA subunit homolog does not support DNA replication or cell-cycle progression. *Nucleic Acids Res* 38:846–858
- Henderson KA, Kee K, Maleki S, Santini PA, Keeney S (2006) Cyclin-dependent kinase directly regulates initiation of meiotic recombination. *Cell* 125:1321–1332
- Heyer WD, Kolodner RD (1989) Purification and characterization of a protein from *Saccharomyces cerevisiae* that binds tightly to single-stranded DNA and stimulates a cognate strand exchange protein. *Biochemistry* 28:2856–2862
- Heyer WD, Rao MR, Erdile LF, Kelly TJ, Kolodner RD (1990) An essential *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA binding protein is homologous to the large subunit of human RP-A. *EMBO J* 9:2321–2329
- Holloway JK, Sun X, Yokoo R, Villeneuve AM, Cohen PE (2014) Mammalian CNTD1 is critical for meiotic crossover maturation and deslection of excess precrossover sites. *J Cell Biol* 205:633–641
- Ishibashi T, Kimura S, Sakaguchi K (2006) A higher plant has three different types of RPA heterotrimeric complex. *J Biochem* 139:99–104
- Ishishita S, Matsuda Y, Kitada K (2014) Genetic evidence suggests that Spata22 is required for the maintenance of Rad51 foci in mammalian meiosis. *Sci Rep* 4:6148
- Ivanov EL, Sugawara N, White CI, Fabre F, Haber JE (1994) Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14:3414–3425
- Ivanov EL, Haber JE (1995) RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15:2245–2251
- Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467:678–683
- Joyce EF, Tanneti SN, McKim KS (2009) *Drosophila* hold'em is required for a subset of meiotic crossovers and interacts with the dna repair endonuclease complex subunits MEI-9 and ERCC1. *Genetics* 181:335–340
- Kallberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7:1511–1522
- Kauppi L, Jasin M, Keeney S (2013) How much is enough? Control of DNA double-strand break numbers in mouse meiosis. *Cell Cycle* 12:2719–2720
- Keshav KF, Chen C, Dutta A (1995) Rpa4, a homolog of the 34-kilodalton subunit of the replication protein A complex. *Mol Cell Biol* 15:3119–3128
- Kim DK, Stigger E, Lee SH (1996) Role of the 70-kDa subunit of human replication protein A (I). Single-stranded DNA-binding activity, but not polymerase stimulatory activity, is required for DNA replication. *J Biol Chem* 271:15124–15129
- Kurzbauer MT, Uanschou C, Chen D, Schlogelhofer P (2012) The recombinases DMC1 and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* 24:2058–2070

- La Salle S, Palmer K, O'Brien M, Schimenti JC, Eppig J, Handel MA (2012) Spata22, a novel vertebrate-specific gene, is required for meiotic progress in mouse germ cells. *Biol Reprod* 86:45. doi:10.1095/biolreprod
- Lange J, Pan J, Cole F, Thelen MP, Jasin M, Keeney S (2011) ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* 479:237–240
- Lao JP, Oh SD, Shinohara M, Shinohara A, Hunter N (2008) Rad52 promotes postinvasion steps of meiotic double-strand-break repair. *Mol Cell* 29:517–524
- Luo M, Yang F, Leu NA, Landaiche J, Handel MA, Benavente R, La Salle S, Wang PJ (2013) MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nat Commun* 4:2788
- Martini E, Diaz RL, Hunter N, Keeney S (2006) Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* 126:285–295
- Mehta A, Haber JE (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016428
- Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B (2002) The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115:1611–1622
- Murakami H, Keeney S (2014) Temporospatial Coordination of Meiotic DNA Replication and Recombination via DDK Recruitment to Replisomes. *Cell* 158:861–873
- Oliver-Bonet M, Campillo M, Turek PJ, Ko E, Martin RH (2007) Analysis of replication protein A (RPA) in human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 13:837–844
- Osman K, Sanchez-Moran E, Mann SC, Jones GH, Franklin FC (2009) Replication protein A (AtRPA1a) is required for class I crossover formation but is dispensable for meiotic DNA break repair. *EMBO J* 28:394–404
- Page SL, Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789
- Petalcorin MI, Sandall J, Wigley DB, Boulton SJ (2006) CeBRC-2 stimulates D-loop formation by RAD-51 and promotes DNA single-strand annealing. *J Mol Biol* 361:231–242
- Philipova D, Mullen JR, Maniar HS, Lu J, Gu C, Brill SJ (1996) A hierarchy of SSB protomers in replication protein A. *Genes Dev* 10:2222–2233
- Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmcl1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1:697–705
- Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T (1998) Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci* 111:413–423
- Qiao H, Prasada Rao HB, Yang Y, Fong JH, Cloutier JM, Deacon DC, Nagel KE, Swartz RK, Strong E, Holloway JK, Cohen PE, Schimenti J, Ward J, Hunter N (2014) Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nat Genet* 46:194–199
- Rider SDJ, Cai X, Sullivan WJJ, Smith AT, Radke J, White M, Zhu G (2005) The protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* possesses two functionally and evolutionarily divergent replication protein A large subunits. *J Biol Chem* 280:31460–31469
- Rijkers T, Van Den Ouweland J, Morolli B, Rolink AG, Baarends WM, Van Sloun PP, Lohman PH, Pastink A (1998) Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* 18:6423–6429
- Salas TR, Petrusseva I, Lavrik O, Saintome C (2009) Evidence for direct contact between the RPA3 subunit of the human replication protein A and single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 37:38–46
- Schwacha A, Kleckner N (1994) Identification of joint molecules that form frequently between homologs but rarely between sister chromatids during yeast meiosis. *Cell* 76:51–63
- Seeliger K, Dukowic-Schulze S, Wurz-Wildersinn R, Pacher M, Puchta H (2012) BRCA2 is a mediator of RAD51- and DMC1-facilitated homologous recombination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 193:364–375
- Sharan SK, Pyle A, Coppola V, Babus J, Swaminathan S, Benedict J, Swing D, Martin BK, Tessarollo L, Evans JP, Flaws JA, Handel MA (2004) BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 131:131–142
- Shultz RW, Tatini VM, Hanley-Bowdoin L, Thompson WF (2007) Genome-wide analysis of the core DNA replication machinery in the higher plants *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 144:1697–1714
- Siaud N, Dray E, Gy I, Gerard E, Takvorian N, Doutriaux MP (2004) Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmcl1. *EMBO J* 23:1392–1401
- Sneeden JL, Grossi SM, Tappin I, Hurwitz J, Heyer WD (2013) Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Res* 41:4913–4925
- Souquet B, Abby E, Herve R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgherri J, Toth A, Habert R, Livera G (2013) MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet* 9:e1003784
- Soustelle C, Vedel M, Kolodner R, Nicolas A (2002) Replication protein A is required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 161:535–547
- Sugiyama T, Kantake N, Wu Y, Kowalczykowski SC (2006) Rad52-mediated DNA annealing after Rad51-mediated DNA strand exchange promotes second ssDNA capture. *EMBO J* 25:5539–5548
- Sugiyama T, New JH, Kowalczykowski SC (1998) DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6049–6054
- Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* 272:7940–7945
- Sung P (1994) Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265:1241–1243
- Sung P (1997) Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* 272:28194–28197
- Suwaki N, Klare K, Tarsounas M (2011) RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* 22:898–905
- Tarsounas M, Davies D, West SC (2003) BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* 22:1115–1123
- Thorslund T, West SC (2007) BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* 26:7720–7730
- Tsubouchi H, Ogawa H (1998) A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* 18:260–268
- Walther AP, Gomes XV, Lao Y, Lee CG, Wold MS (1999) Replication protein A interactions with DNA. 1. Functions of the DNA-binding and zinc-finger domains of the 70-kDa subunit. *Biochemistry* 38:3963–3973
- Wang X, Haber JE (2004) Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biol* 2:E21
- Weiner BM, Kleckner N (1994) Chromosome pairing via multiple interstitial interactions before and during meiosis in yeast. *Cell* 77:977–991
- Wold MS (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61–92

- Wold MS, Kelly T (1988) Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2523–2527
- Xu X, Aprelikova O, Moens P, Deng CX, Furth PA (2003) Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* 130:2001–2012
- Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T (1998) The mouse RecA-like gene Dmcl is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1:707–718
- Youds JL, Boulton SJ (2011) The choice in meiosis-defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *J Cell Sci* 124:501–513

### III. Article 2 : la caractérisation du complexe MEIOB-SPATA22 d'un point de vue structurel et fonctionnel

Au début de mon doctorat, notre équipe venait de publier la première caractérisation de MEIOB chez la souris (Souquet et al., 2013). La même année, l'équipe du Dr. J.P. Wang publia ses travaux sur l'identification et l'étude du rôle MEIOB au cours de la recombinaison homologue méiotique (Luo et al., 2013). Cette équipe avait mis en évidence que MEIOB peut interagir avec SPATA22 et RPA2 (Luo et al., 2013). Enfin, les travaux de l'équipe du Dr. M.A. Handel sur le mutant *repro42* avaient montré que SPATA22 est également essentielle à la recombinaison homologue méiotique (La Salle et al., 2012). Cependant, nous ne savions pas comment MEIOB et son partenaire SPATA22 peuvent intervenir au cours de la recombinaison méiotique pour permettre sa progression. De plus, nous ne savions pas comment ces protéines interagissent avec RPA2, si elles peuvent interagir avec le complexe RPA ou la sous-unité RPA2 seule, et quel est le rôle de cette interaction au cours de la recombinaison méiotique. Les travaux de l'article qui va être présenté ici ont été réalisés dans le but de tenter d'éclaircir ces points. Une attention particulière sera portée sur (1) la logique et les problématiques qui nous ont conduites à mener nos études ainsi que sur (2) les limites des résultats produits au cours de ces travaux.

#### III.1 SPATA22 est une protéine avec un domaine OB-fold putatif et une potentielle activité de liaison à l'ADNsb

Lorsque j'ai initié ma thèse, nous savions que la protéine SPATA22 a une région C-terminale conservée (La Salle et al., 2012). Cependant, aucun domaine ni propriété biochimique n'avait été proposé pour cette protéine. Dans le but d'identifier une potentielle propriété biochimique de cette protéine, nous avons réalisé une prédiction de la structure de la protéine SPATA22 grâce au serveur RaptorX (Källberg et al., 2012). Ainsi, ce serveur a prédit la présence d'un domaine OB-fold dans la partie C-terminale conservée de SPATA22 (**Figure 1A** de l'article qui suit). Ce domaine OB-fold est similaire à celui de RPA2, ce qui suggère une potentielle similarité entre RPA2 et SPATA22.

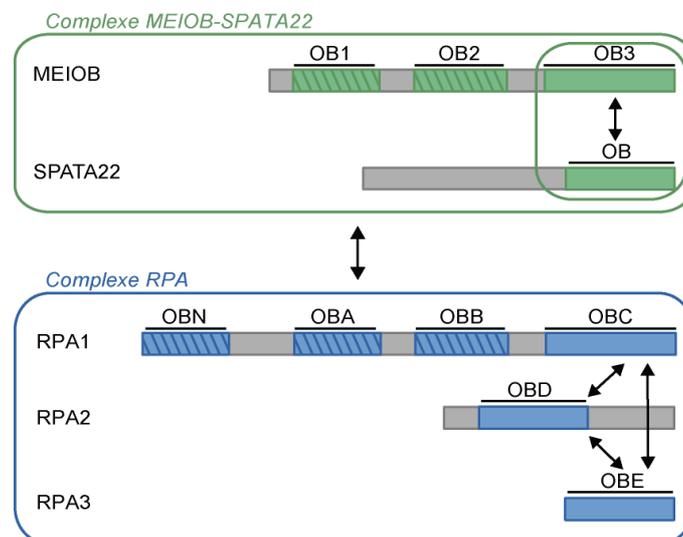
Etant donné le fait que certains domaines OB-folds sont capables de lier l'ADNsb (Murzin, 1993), nous avons testé une éventuelle activité de liaison à l'ADNsb de SPATA22 avec une protéine SPATA22 recombinante produite par un système acellulaire. Nous avons ainsi observé que SPATA22 est retenue par l'ADNsb, comme MEIOB (**Figure 1C et D** de l'article). Le système acellulaire que nous avons utilisé pour produire SPATA22 permet de tester ce type d'activité *in vitro* car il produit rapidement des quantités suffisantes de protéines pour mener des expériences de pull-down avec de l'ADN. Cependant, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la liaison de SPATA22 à l'ADNsb puisse être indirecte à cause d'un facteur tiers provenant du système de production acellulaire. Nos résultats suggèrent que SPATA22 pourrait avoir une activité de liaison à l'ADNsb, à condition que cette interaction que nous avons observé soit directe.

Puisque nos résultats suggèrent que SPATA22 puisse lier l'ADNsb et que la protéine possède un domaine OB-fold, nous avons cherché à savoir si cette activité est portée par son domaine OB-fold. De manière curieuse, nous avons observé que l'activité de liaison à l'ADNsb du domaine OB-fold putatif de SPATA22 semble être très faible et que la majorité de l'activité de SPATA22 semble être portée par la partie N-terminale de SPATA22 (**Figure 1C et D** de l'article). Du fait que les formes tronquées de SPATA22 ont été

produites avec un système acellulaire, il est possible que ces protéines ne soient pas correctement repliées. Le domaine OB-fold étant un domaine relativement complexe, il est alors probable ce dernier ne soit pas pleinement actif.

### III.2 MEIOB et SPATA22 forment un complexe partageant des similitudes avec RPA d'un point de vue structurel et collaborent pour interagir avec RPA

Les travaux de l'équipe du Dr. J.P. Wang ont révélé que MEIOB peut interagir avec SPATA22 (Luo et al., 2013). Cependant, les modalités de cette interaction restaient à être élucidée. MEIOB étant un paralogue de RPA1 et SPATA22 ressemblant à RPA2, nous avons émis l'hypothèse que MEIOB interagit avec SPATA22 comme RPA1 interagit avec RPA2 et RPA3. RPA1 interagit avec les domaines OB-folds de RPA2 et RPA3 via son domaine OB-fold C-terminal (Bochkareva et al., 2002). Or MEIOB possède un domaine OB-fold C-terminal similaire à celui de RPA1 et SPATA22 possède aussi un domaine OB-fold. Nous avons alors testé une interaction entre le domaine OB-fold C-terminal de MEIOB et le domaine OB-fold de SPATA22. Pour cela, nous avons sur-exprimé MEIOB et SPATA22 dans les cellules humaines et observé, par immunoprécipitation, leur interaction entre elles (**Figure 2B** et **C** et **Figure 3** de l'article). Nous avons observé que les domaines OB-folds C-terminaux de MEIOB et SPATA22 sont nécessaires et suffisants pour assurer l'interaction entre les deux protéines. Ces interactions semblent mimer les interactions observées entre les sous-unités du complexe RPA (les interactions sont résumées dans la **Figure complémentaire 2**).



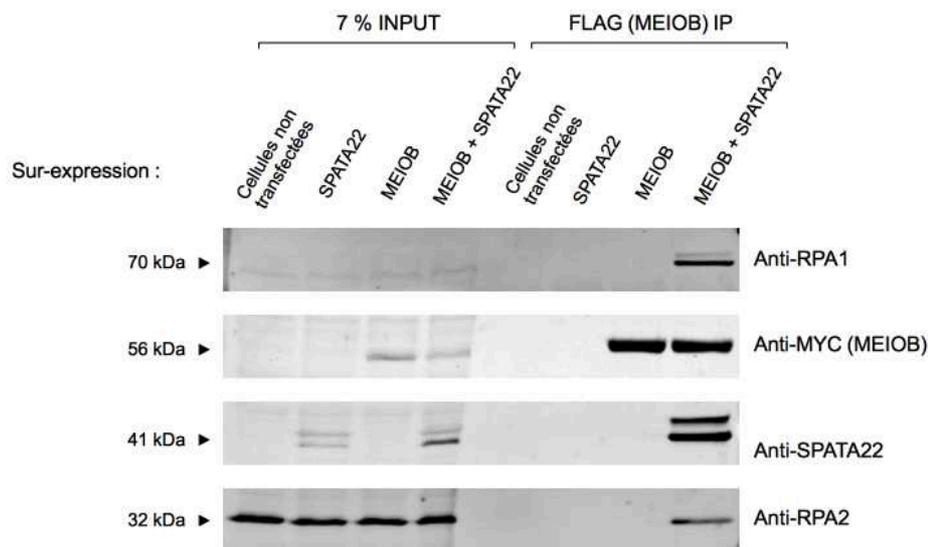
**Figure complémentaire 2 : Schéma récapitulatif des interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA**

A l'image des sous-unités de RPA, MEIOB et SPATA22 interagissent grâce à leurs OB-folds (OB3 et OB) C-terminaux. La collaboration entre MEIOB et SPATA22 permet au complexe d'interagir avec RPA.

Outre son interaction avec SPATA22, nous savions également que MEIOB peut interagir avec RPA2 (Luo et al., 2013). Cependant, nous ne savions pas si MEIOB interagit avec une protéine RPA2 isolée de son complexe ou avec le complexe RPA entier. Nous avons donc testé une éventuelle interaction entre MEIOB et RPA dans les cellules humaines. Nous avons ainsi observé que l'interaction entre MEIOB et SPATA22 est nécessaire pour interagir avec RPA1 et RPA2 dans les cellules (**Figure 3** de l'article et **Figure**

**complémentaire 2**). Nous n'avons pas pu confirmer une interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA3 à cause de limitations techniques. Cependant, RPA3 est essentielle à la formation du trimère RPA *in vitro* (Henricksen et al., 1994). Il est alors fortement probable que RPA3 co-précipite avec RPA1, RPA2 et MEIOB-SPATA22 dans nos tests. Nos résultats suggèrent donc que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec RPA. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas de savoir quelle sous-unité de RPA est ciblée par la collaboration entre SPATA22 et MEIOB car nous avons travaillé avec le complexe RPA endogène. De plus, l'approche que nous avons utilisé ne nous permet pas de savoir si les interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA sont directes ou non.

Nous avons observé que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec RPA. Ces interactions ont été étudiées suite à une digestion de l'ADN par la Benzonase pour éviter une interaction indirecte entre protéines, via des ponts ADN. Nous avons tenté de vérifier nos résultats par une approche autre que la digestion enzymatique. Pour cela, nous avons choisi le bromure d'éthidium car il s'agit d'un intercalant de l'ADN capable d'inhiber des interactions ADN-protéines (Lai and Herr, 1992). Nous avons donc précipité MEIOB en présence de bromure d'éthidium. Ainsi, nous avons observé que MEIOB interagit avec RPA uniquement en présence de SPATA22 (**Figure complémentaire 3**). Ce résultat est en accord avec nos résultats obtenus avec la digestion enzymatique.



**Figure complémentaire 3 : MEIOB interagit avec RPA en présence de SPATA22**

MEIOB et SPATA22 sont exprimées dans les HEK-293 (*Human embryonic kidney cells 293*) seules ou ensemble. MEIOB est précipitée avec un anticorps anti-FLAG en présence de bromure d'éthidium. Les échantillons ont ensuite été analysés par la méthode du Western blot. Les membranes sont analysées grâce à des anticorps anti-MYC, anti-SPATA22, anti-RPA1 et anti-RPA2 pour révéler respectivement MEIOB, SPATA22, RPA1 et RPA2. Une interaction entre MEIOB et RPA1 et RPA2 est visible uniquement en présence de SPATA22.

### III.3 MEIOB et SPATA22 collaborent pour être recrutées aux dommages à l'ADN associés à RPA

MEIOB et SPATA22 sont recrutées sur les intermédiaires de la recombinaison méiotique (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; La Salle et al., 2012; Souquet et al., 2013). Cependant, nous ne savons pas quels sont les facteurs nécessaires à ce recrutement de MEIOB et SPATA22. Nous avons alors tenté de déterminer si un dommage à l'ADN pouvant produire de l'ADNsb, dans un contexte mitotique et

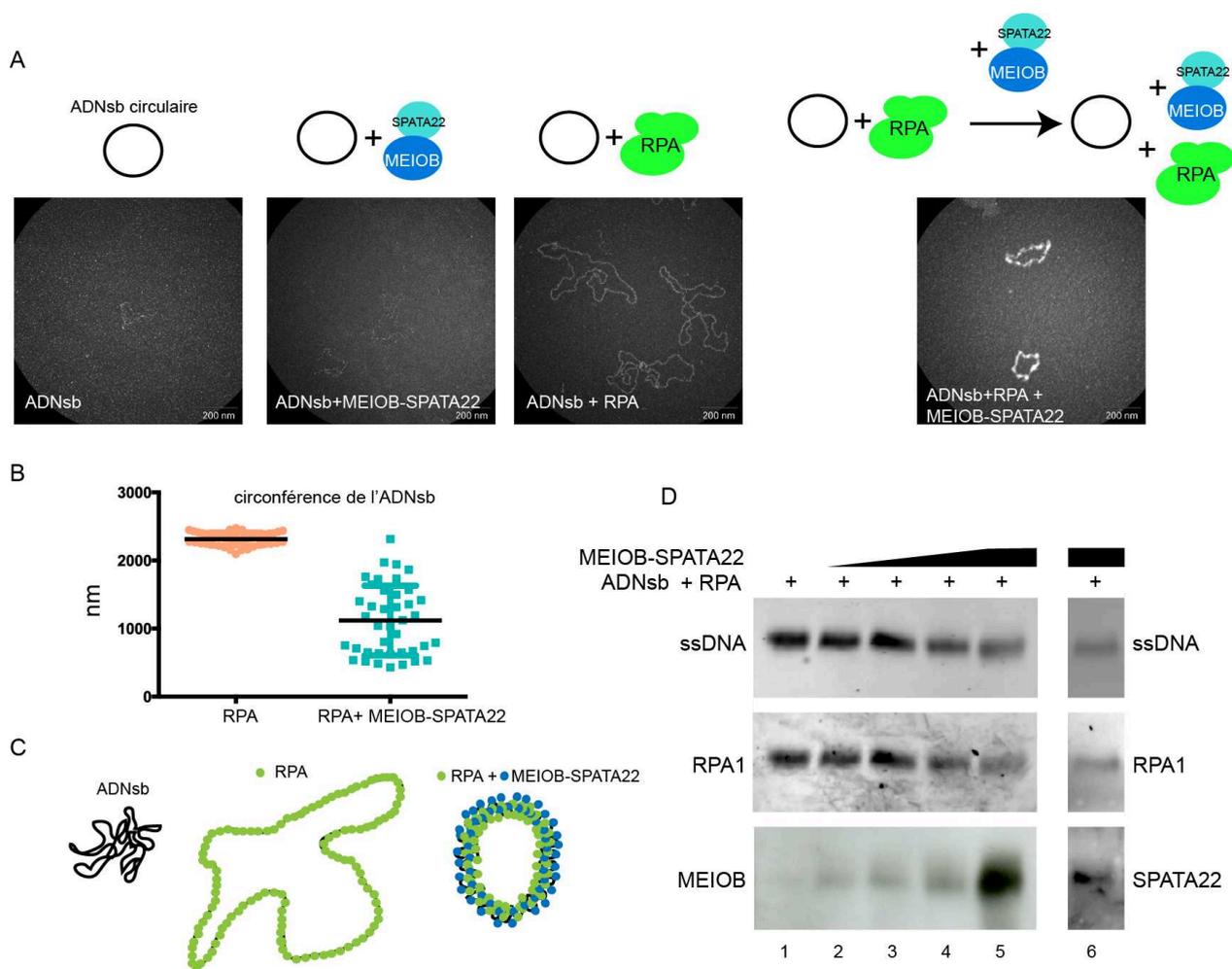
sans les membres de la chromatine méiotique, pouvait être suffisant pour recruter MEIOB ou SPATA22 ou les deux protéines *in vivo*. Pour cela, nous avons continué à utiliser le modèle de sur-expression dans les cellules humaines. Nous avons ainsi observé par immunofluorescence que les deux protéines MEIOB et SPATA22 co-localisent avec RPA après induction de dommages à l'ADN (**Figure 5** et **Figure S2** de l'article). Cependant, cette co-localisation n'a lieu que lorsque les deux protéines, MEIOB et SPATA22, sont co-exprimées. Ce résultat suggère que les deux protéines collaborent pour être recrutées aux dommages à l'ADN. Comme ces deux protéines collaborent aussi pour interagir avec RPA et co-localisent avec ce dernier, nous pouvons proposer que le recrutement de MEIOB et SPATA22 aux dommages à l'ADN pourrait passer par leur interaction avec RPA. Cependant, cette expérience ne nous permet pas de savoir si le complexe MEIOB-SPATA22 seul a la capacité d'être recruté aux dommages à l'ADN à cause de la présence du complexe RPA endogène.

#### III.4 MEIOB-SPATA22 modifient la structure du filament RPA-ADNsb

Afin de mieux comprendre le rôle de MEIOB-SPATA22 au cours des mécanismes de la recombinaison méiotique, nous avons initié la purification de ce complexe en collaboration avec le Dr. Xavier Veaute de la plateforme CIGEx (Cellule d'Ingénierie Génétique et d'Expression) de notre institut. Bien que le complexe MEIOB-SPATA22 s'exprime peu et soit peu soluble dans les cellules d'insectes, le Dr. Xavier Veaute est parvenu à purifier des quantités suffisantes du complexe pour mener une première étude biochimique de l'interaction fonctionnelle de ce complexe avec RPA.

Après avoir co-purifié MEIOB-SPATA22, nous avons cherché à savoir si l'interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA peut être impliquée dans le recrutement de MEIOB-SPATA22 sur un filament RPA-ADNsb. Avec l'aide du Dr. Pauline Dupaigne du Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire de l'Institut Gustave Roussy, nous avons pu observer par retard sur gel suivi d'un western blot que MEIOB et SPATA22 peuvent être associées à un ADNsb saturé par le complexe RPA (**Figure complémentaire 3D**). Ce résultat suggère que le dimère a la capacité d'être recruté sur un ADNsb saturé par RPA. Cependant, cette expérience ne nous permet pas de savoir si ce recrutement passe par une interaction avec RPA lié à l'ADNsb ou avec l'ADNsb directement. La génération d'une protéine MEIOB ou SPATA22 déficiente pour l'interaction avec RPA ou déficiente pour la liaison à l'ADNsb pourrait nous permettre à l'avenir de répondre à cette interrogation.

Puisque MEIOB-SPATA22 peut être recruté sur un filament RPA-ADNsb, nous avons cherché à savoir si le complexe MEIOB-SPATA22 peut modifier l'architecture de ce filament. Pour cela, nous avons observé la structure du filament RPA-ADNsb avec ou sans MEIOB-SPATA22 par microscopie électronique, avec l'aide du Dr. Dupaigne. De manière intéressante, nous avons observé que l'ajout de MEIOB-SPATA22 induit une condensation du filament RPA-ADNsb (**Figure 4** de l'article et **Figure complémentaire 3A et 3B**). Ce résultat suggère que le complexe MEIOB-SPATA22 modifie la structure du filament RPA. Cependant, encore une fois, cette expérience ne nous permet pas de savoir si cette modification du filament RPA passe par une interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA ou entre le dimère et l'ADNsb.



#### Figure complémentaire 4 : MEIOB-SPATA22 condense le filament RPA-ADNsb

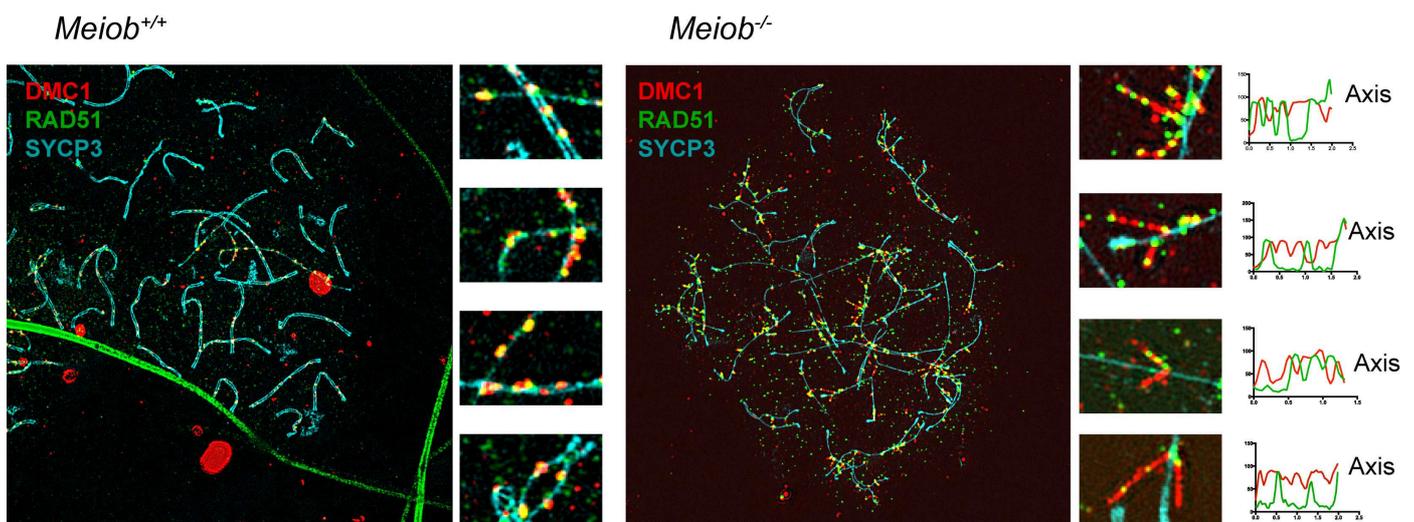
(A) Un ADNsb circulaire est incubé avec MEIOB-SPATA22 ou RPA ou RPA puis MEIOB-SPATA22. RPA couvre la globalité de l'ADNsb alors que peu de figures suggèrent une association de MEIOB-SPATA22 avec de l'ADNsb. En revanche, la présence de MEIOB-SPATA22 réduit la circonférence d'un filament d'ADNsb pré-saturé par RPA. (B) Quantification de la circonférence du filament RPA-ADNsb en présence ou non de MEIOB-SPATA22. (C) Modèle de la condensation du filament RPA-ADNsb par MEIOB-SPATA22. MEIOB-SPATA22 pourrait interagir avec plusieurs complexes RPA distants pour condenser le filament RPA-ADNsb. (D) MEIOB-SPATA22 peut être associé à un filament RPA-ADNsb. Des oligonucléotides couplés à une cyanine5 sont pré-saturés avec RPA. Puis des quantités croissantes de MEIOB-SPATA22 sont ajoutées à la réaction. Les complexes protéines-ADN sont analysés par retard sur gel. Puis les protéines sont analysées par western blot. Les signaux associés à MEIOB et SPATA22 superposent avec les signaux de RPA1 et de l'ADNsb, ce qui suggère que RPA et MEIOB-SPATA22 sont sur les mêmes molécules d'ADNsb.

### III.5 La polymérisation de DMC1 est dérégulée en absence de MEIOB

Le chargement des recombinaisons sur l'ADNsb est essentiel à la recherche d'homologie et à l'invasion d'une séquence homologe (Brown and Bishop, 2014). Notre équipe et une autre avaient précédemment publié que les recombinaisons sont éliminées des chromosomes méiotiques malgré l'absence de réparation des CDBs chez les souris *Meiob<sup>-/-</sup>* et les rats déficients pour *Spata22* (Ishishita et al., 2014; Souquet et al., 2013). Dans le but de mieux comprendre les causes de cette élimination des recombinaisons,

nous avons tenté de suivre plus finement la présence des recombinases sur les chromosomes méiotiques, par immunofluorescence. De manière surprenante, nous avons observé la présence de foyers DMC1 anormaux en absence de MEIOB (**Figure 6** de l'article et **Figure complémentaire 5**). Ces foyers DMC1 sont filiformes et extra-axiaux, associés fréquemment à un foyer RAD51 présent sur l'axe des chromosomes et parfois entre coupés de foyers RAD51 (**Figure 6** de l'article et **Figure complémentaire 5**). Ces résultats suggèrent que le chargement de DMC1 est dérégulé en absence de MEIOB. Le fait que RAD51 entre coupe parfois les foyers filiformes DMC1 suggère que ces filaments sont mixtes, avec une prépondérance de DMC1. RPA n'est pas localisé au niveau des foyers DMC1 extra-axiaux. Ce résultat suggère que DMC1 polymérise sur de l'ADNdb en absence de MEIOB. La polymérisation de DMC1 pourrait avoir commencé à partir de l'axe des chromosomes puis se serait prolongée sur les boucles de chromatine méiotique. Cependant, nous ne savons pas si ces filaments DMC1 sont capables ou non de catalyser la recherche d'homologie et l'invasion du brin homologue.

Enfin, nous avons observé que l'apparition des foyers DMC1 filiformes ne se manifeste pas chez toutes les souris *Meiob*<sup>-/-</sup>. Ce phénotype est directement dépendant de la présence d'un fond génétique mixte chez la souris. L'apparition de ces foyers DMC1 filiformes en absence de MEIOB semble alors être influencée par le degré de polymorphisme des souris, ce qui explique pourquoi notre équipe et celle de nos confrères n'ont pas observé ces foyers précédemment.



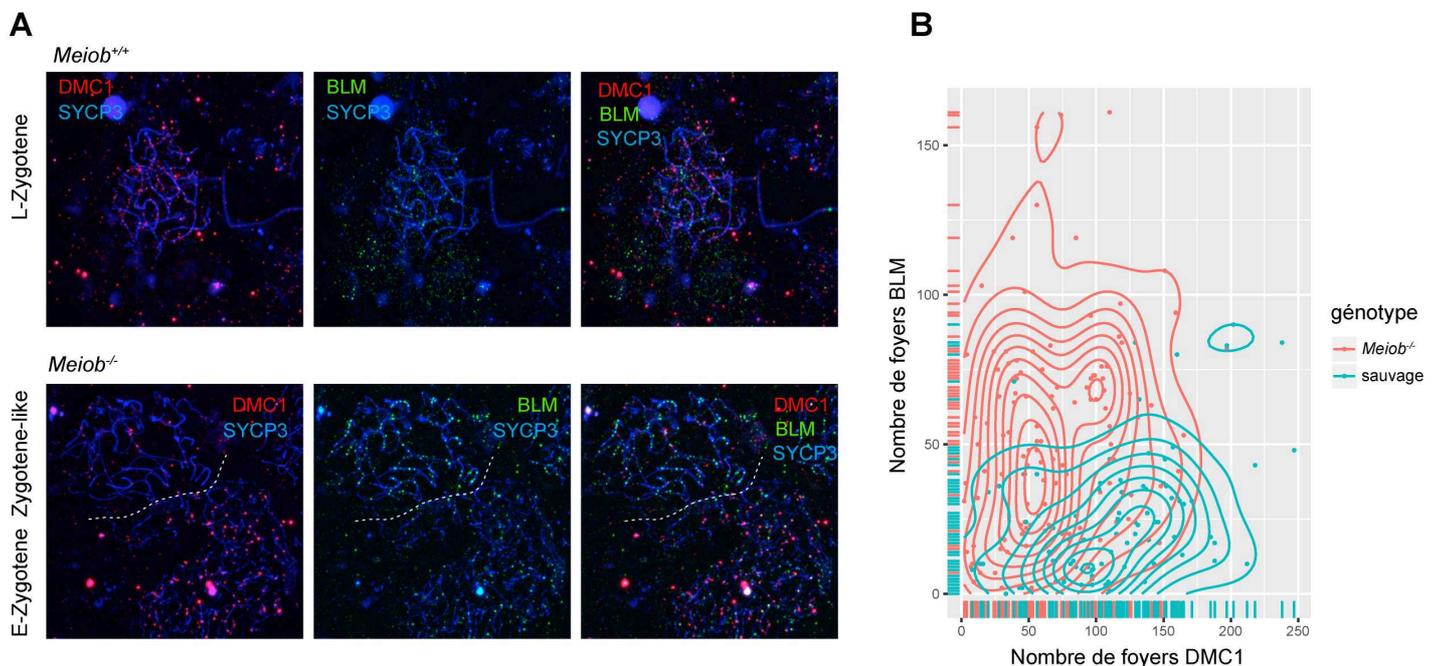
**Figure complémentaire 5 : DMC1 forme des foyers filiformes extra-axiaux en absence de MEIOB-SPATA22**

Des spermatocytes murins sauvages ou *Meiob*<sup>-/-</sup> sont étalés et les protéines RAD51, DMC1 et SYCP3 sont immunomarquées. Les marquages et cellules sont les mêmes que dans la **Figure 6** de l'article sauf que l'acquisition a été faite ici par illumination structurée (ou *Structured Illumination Microscopy*, SIM). Les histogrammes à droite représentent les signaux RAD51 (en vert) et DMC1 (en rouge) sur la longueur d'un foyer DMC1 filiforme. « Axis » représente les axes chromosomiques. Les signaux RAD51 et DMC1 s'alternent, ce qui suggère que les filaments DMC1 sont entre coupés de protéines RAD51.

### III.6 BLM s'accumule sur les intermédiaires de recombinaison en absence de MEIOB

Notre équipe et une autre avaient précédemment publié que les recombinases sont éliminées des chromosomes méiotiques malgré l'absence de réparation des CDBs chez les souris *Meiob*<sup>-/-</sup> et les rats déficients pour *Spata22* (Ishishita et al., 2014; Souquet et al., 2013). Nous nous sommes questionnés sur la

nature du mécanisme responsable de l'élimination des recombinaisons en absence de MEIOB ou SPATA22. L'hélicase BLM est capable de dissocier RAD51 de l'ADNsb *in vitro* (Bugreev et al., 2007). DMC1 étant le paralogue de RAD51 spécifique de la méiose, elle est susceptible d'être aussi dissociable par BLM. Nous avons donc suivi le recrutement de BLM, par immunofluorescence, sur les chromosomes des spermatocytes de souris *Meiob*<sup>-/-</sup> afin de savoir si BLM pourrait être responsable du déplacement de RAD51 et DMC1 en absence de MEIOB. Nous avons observé une augmentation du nombre de foyers BLM sur les chromosomes méiotiques en parallèle d'une diminution du nombre de foyers DMC1, en absence de MEIOB (**Figure 7** de l'article et **Figure complémentaire 6**). Ce résultat suggère que BLM est plus recrutée aux intermédiaires de recombinaison en absence de MEIOB par rapport aux conditions sauvages et pourrait contribuer à l'élimination de DMC1 des foyers de recombinaison. Cependant, l'hélicase BLM persiste sur les chromosomes méiotiques. Ce résultat pourrait suggérer que l'hélicase est recrutée à des intermédiaires de recombinaison mais qu'elle ne parvient pas à les dissoudre. En revanche, nos résultats ne nous permettent pas de savoir à quelle étape de la recombinaison homologe, pré- ou post-synaptique, intervient BLM en absence de MEIOB.



**Figure complémentaire 6 : BLM s'accumule sur les chromosomes méiotiques quand DMC1 est éliminée de ces derniers**

(A) Des spermatocytes murins sauvages ou *Meiob*<sup>-/-</sup> sont étalés et les protéines BLM, DMC1 et SYCP3 sont immunomarquées. Des cellules présentant un fort nombre de foyers BLM présentent peu de foyers DMC1 et inversement. (B) Représentation en nuage de points du nombre de foyers BLM en fonction du nombre de foyers DMC1. Chaque point représente une cellule en prophase I de méiose comptée. En absence de MEIOB, une population de cellules se distingue. Cette population présente un fort nombre de foyers BLM et un faible nombre de foyers DMC1.

Ces résultats ont fait l'objet de l'écriture d'un manuscrit qui a été soumis au journal PNAS, dans un premier temps. Ce manuscrit ainsi est présenté dans la suite de cette partie. Ce manuscrit a été révisé et nous avons réalisé des expériences complémentaires en prenant compte de cette révision. Une nouvelle version de ce manuscrit est en cours de préparation. Les modifications majeurs sur les résultats seront le remplacement des figures 4, 6 et 7 par les figures complémentaires 3, 5 et 6.

# A meiotic RPA-like complex is essential for recombinase filament integrity

Jonathan Ribeiro<sup>1</sup>, Clotilde Duquenne<sup>1</sup>, Xavier Veaute<sup>2</sup>, Pauline Dupaigne<sup>3</sup>, Cynthia Petrillo<sup>1</sup>, Didier Busso<sup>2</sup>, Raphaël Guerois<sup>4</sup>, Emmanuelle Martini<sup>1</sup> #\*, and Gabriel Livera<sup>1</sup>\*

<sup>1</sup>Laboratory of Development of the Gonads, Unit of Genetic stability Stem Cells and Radiation, UMR 967, INSERM; CEA/DRF/iRCM/SCSR; Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité; Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay aux Roses, F-92265, France

<sup>2</sup>CIGEx, UMR 967, INSERM, CEA/DRF/iRCM/SCSR, Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Fontenay aux Roses, F-92265, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, UMR 8126, Interactions Moléculaires et Cancer, CNRS– Université Paris Sud–Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

<sup>4</sup> CNRS I2BC UMR 9198, iBiTec-S / SB<sup>2</sup>SM CEA SACLAY, 91191 Gif sur Yvette, France

\*These authors contributed equally to this work

#To whom correspondence may be addressed: [emmanuelle.martini@cea.fr](mailto:emmanuelle.martini@cea.fr)

## Abstract

**Homologous recombination is a conserved process among eukaryotes. During meiosis, this mechanism is essential to the formation of crossovers and thus for the proper segregation of chromosomes. Meiotic recombination is ensured by the combined action of mitotic and meiotic factors. MEIOB has been recently identified and shown to be essential to the repair of meiotic DNA double-strand breaks. MEIOB is a paralog of RPA1, the large subunit of RPA, which is a ubiquitous ssDNA-binding trimeric composed of RPA1, RPA2 and RPA3. MEIOB has been shown to interact with SPATA22 and RPA2. This observation suggested that MEIOB, SPATA22 and RPA may work together. Based on the homology existing between structural domains of MEIOB, SPATA22 and the RPA subunits, we deciphered the modality and the role of their interactions. MEIOB and SPATA22 interact in an RPA-like manner and cooperate to interact with the RPA complex. Moreover, in the absence of MEIOB, BLM helicase accumulates on the meiotic chromosomes axis and DMC1 recombinase forms abnormal filaments in mouse spermatocytes. Together, our results suggest that MEIOB, SPATA22 and RPA form a meiosis-specific complex in order to prevent the formation of aberrant recombinase filaments and toxic recombination intermediates.**

### Significance statement

Meiotic recombination is essential for proper chromosome segregation and haploid gamete formation. This mechanism is ensured by the combined action of mitotic and meiotic factors. In this work, we show that MEIOB and SPATA22, two essential meiosis-specific factors resemble and collaborate with the RPA ubiquitous complex to complete meiotic recombination. We show that the lack of MEIOB induces aberrant recombinase filament formation and triggers helicase accumulation. We propose that MEIOB and SPATA22 work in complex with RPA to ensure proper recombinase filament assembly crucial for meiotic recombination. This work improves our knowledge on the specialization of homologous recombination during meiosis.

## Introduction

Meiosis is a specialized cell division program that halves the diploid genome of the germ cells to produce haploid gametes. In most organisms, this process requires the formation of a physical link (chiasma) between homologous chromosomes to ensure their proper segregation during the first meiotic division (1). Chiasmata are formed after reciprocal exchange of chromosomal arms, or crossover (COs). COs proceed from the repair of DNA double-strand breaks (DSBs) by homologous recombination (HR) (2). Meiotic and mitotic HR share common features and factors even though several facets differ (3). Meiotic HR is initiated by programmed DSBs (4, 5) and favor the use of the homologous chromosome rather than the sister chromatid as a repair template (6). Only a subset of DSBs are repaired with a reciprocal exchange of chromosomal arms to form COs whereas the remaining DSBs are repaired without reciprocal exchanges to form non-crossovers (NCOs) (7). COs are tightly regulated as shown by their controlled number along and among chromosomes (8, 9). This regulation is ensured by the combined action of proteins with various activities (6).

During HR, single-stranded DNA (ssDNA) is formed at different steps (10). After DSB formation, broken ends are resected to free 3'-ssDNA tails. Resected ends are subsequently covered by recombinases to form a nucleofilament essential to invade the homologous sequence. Next, D-loop formation and migration generate additional ssDNA. Studies performed during mitotic HR evidenced that the replication protein A complex (RPA) binds the resected DNA to prevent degradation and secondary structure formation (11-13). RPA is the main ssDNA-binding complex involved during key events of DNA metabolism such as DNA replication, repair and recombination (14). During HR, after being loaded on resected ends, RPA is replaced by RAD51 recombinase to form a presynaptic nucleofilament in a breast cancer susceptibility protein 2 (BRCA2) (mammals, plants)- or Rad52 (yeast)-dependent manner with the help of RAD51 paralogs (15-17). RPA was thought to play similar roles during mitosis and meiosis. However, it remains questionable whether RPA may be loaded before the recombinase during meiotic HR. Although RPA has been observed on unsynapsed chromosomes in mammals, only few faint RPA foci are detected when numerous bright RAD51 foci have already accumulated on the leptotene chromosome axis (18-20). Biochemical approaches demonstrated that RPA stabilizes RAD51-dependent pairing and

enhances strand exchange by coating the displaced strand (D-loop) to prevent its re-annealing (21, 22). The presence of numerous RPA foci during the zygotene stage when a large part of the DSBs have initiated the process of repair is compatible with a role in D-loop stability (20, 23). Aside from RAD51, meiotic HR in most organisms requires the meiotic specific DNA meiotic recombinase 1 (DMC1) (24-26). The current model proposed by studies performed in *Saccharomyces cerevisiae* and *Arabidopsis thaliana* suggested that during meiosis RAD51 and DMC1 can be loaded together on broken ends and that RAD51 preferentially plays an accessory role to allow DMC1 recombinase activity (27, 28). During HR, Bloom syndrome RecQ-like helicase (BLM) and its orthologs have been evidenced to play a major role in the regulation of recombination intermediates (6, 29-31). In particular, *in vitro* approaches evidenced that hBLM was able to dismantle RAD51-ssDNA filament and D-loop catalyzed by RAD51 (32).

RPA is an evolutionarily conserved trimeric complex composed of RPA1, RPA2 and RPA3. Recently, we and others identified Meiosis Specific With OB Domains (MEIOB), a conserved meiotic ssDNA binding protein homolog of RPA1. In mice, the absence of MEIOB induces an arrest in the zygotene/pachytene-like stages with an accumulation of unrepaired DSBs (23, 33). Furthermore, MEIOB, SPATA22, another essential meiosis-specific factor, and RPA2 interact and co-localize on meiotic chromosomes (23, 33, 34). These observations suggest that MEIOB and SPATA22 could work with RPA during meiotic HR to specialize its meiotic function (35). However how MEIOB, SPATA22 and RPA interact with each other and the role of these interactions remain to be elucidated.

In the present work, we report that MEIOB and SPATA22 interact with each other in a manner similar to those described for RPA subunits. Moreover, MEIOB and SPATA22 collaborate to interact with the RPA complex. We also show that in the absence of MEIOB, BLM accumulates on meiotic chromosomes and that DMC1 forms abnormal filaments. Together, our results suggest that during meiosis, MEIOB is crucial to avoid the formation of aberrant recombination intermediates, which is probably catalyzed by toxic DMC1 filaments. We propose that MEIOB, SPATA22 and RPA work in complex together to build a meiosis-specific recombinase nucleofilament efficient for proper invasion and repair.

## Results

### **SPATA22 is an OBCD containing protein that binds single-stranded DNA**

Published data suggest that MEIOB forms a complex with SPATA22, a meiosis-specific protein with unknown molecular function (33). As MEIOB resembles RPA1 (23, 35), the largest subunit of the trimeric RPA complex, we questioned whether SPATA22 possesses similarities to the other RPA subunits. Predicting the structure of SPATA22 using the protein structure prediction server RaptorX (36) revealed the presence of a putative domain containing an oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold (OB fold, consisting in five or six-stranded closed  $\beta$ -barrels) flanked by an  $\alpha$ -helix, later termed the OB containing domain (OBCD, Fig. 1A, left panel). This OBCD is located in the C-terminal part of SPATA22 and is similar to the OBCD of RPA2, the middle subunit of the RPA complex (Fig. 1A, right panel). This result suggests that, similar to MEIOB, SPATA22 may share common features with an RPA subunit. OB-folds often provide ssDNA binding activity (37) and are present in all RPA subunits (38). For this reason, we questioned whether SPATA22 interacts with ssDNA. An HA-tagged version of human SPATA22 (later termed SPATA22) (Fig. 1B) was expressed *in vitro* in a cell-free system and pulled down with a biotinylated 59-mer ssDNA (Fig. 1B, C and D). Full-length SPATA22 is retained by the ssDNA (Fig. 1C and D). This observation strongly suggests that SPATA22 interacts with ssDNA, although we cannot strictly rule out a possible indirect interaction due to a factor present in the cell-free expression system. Surprisingly, the ablation of the OBCD is not sufficient to fully abolish ssDNA binding activity (Fig. 1C and D, approximately 30% of the activity of the full-length protein), and the OBCD of SPATA22 presents only a low level of binding activity compared to the full-length protein (Fig. 1C and D, approximately 10% of the activity of the full-length protein). These two observations likely reveal that the N-terminal domain and the OBCD of SPATA22 cooperate to ensure the binding activity of the protein.

### **MEIOB and SPATA22 interactions recapitulate the interactions between RPA subunits**

Molecular and structural works evidenced that the three subunits of RPA interact through OBCDs (39-44). We previously identified in MEIOB (23) three OBCDs similar to RPA1 OBCDs (see (35) for a representation of predictive OB domains in the MEIOB structure

model), and we show in this work that SPATA22 possesses a putative OBCD. Given these similarities between MEIOB, SPATA22 and RPA subunits, we hypothesized that MEIOB and SPATA22 could, in a manner similar to RPA subunits, interact through their C-terminal OBCDs. To test this hypothesis, we constructed wild-type and truncated forms of tagged human MEIOB and tagged human SPATA22 and transiently expressed them in the HEK-293 cell line (Fig. 1B and 2A). The interactions of the two proteins were tested by co-immunoprecipitation (Co-IP) with strong nuclease treatment to avoid aberrant interactions due to oligonucleotide bridges. MEIOB and SPATA22 were co-immunoprecipitated using, respectively, anti-FLAG and anti-HA antibodies. In both cases, the wild-type versions of MEIOB and SPATA22 were co-immunoprecipitated confirming that their interaction was conserved when expressed in human cells (Fig. 2B, lane 6 (MEIOB+SPATA22) and C, lane 6 (SPATA22+MEIOB); see Fig. S1A and B for input). We examined truncated versions of MEIOB and SPATA22 lacking their C-terminal OB-fold domain or carrying the OB-fold domain alone (Fig. 1B, 2A, B and C, Fig. S1A and B). Co-IP results showed that the C-terminal OBCDs of MEIOB (MEIOB OBCD3) and SPATA22 (SPATA22 OBCD) are necessary and sufficient to ensure their interaction (Fig. 2B and C and Fig. 3C and Fig. S1A, B and C). Published analysis of the crystal structure of RPA highlighted the role of the OBCD C-terminal helices of the three RPA subunits for complex formation (42). We observed that the predicted structures of MEIOB and SPATA22 suggest the existence of such helices flanking their C-terminal OB domains (Fig.1A, 35). Interestingly, the deletion of the SPATA22 C-terminal helix abolishes MEIOB-SPATA22 interaction (Fig. 2C and Fig. S1B). However, the deletion of the MEIOB C-terminal helix did not abolish the interaction (Fig. 2B and Fig. S1A). Similarly, truncation of a part of the C-terminal domain of RPA1 that contains the helix is insufficient to abolish its interaction with RPA2 (39). Globally, our observations demonstrate that as described for RPA, OBCD3 of MEIOB and OBCD of SPATA22 are important for their interaction.

### **MEIOB and SPATA22 cooperate to interact with RPA**

Luo et al. reported that RPA2 co-immunoprecipitates with MEIOB in the mouse testis (33). To characterize the modalities of this interaction, we expressed and immunoprecipitated MEIOB and SPATA22 in human cells as described above. We further questioned whether

endogenous human RPA co-immunoprecipitates with MEIOB and SPATA22. Co-IPs were performed under strong nuclease conditions as above. Neither MEIOB nor SPATA22, when expressed alone, co-immunoprecipitated with endogenous RPA1 nor RPA2 (Fig. 3A and B and Fig. S1A and B for input). However, when the two proteins were co-expressed, they co-immunoprecipitated together with RPA1 and RPA2 (Fig. 3A and B and Fig. S1A and B). The same results were obtained when we immunoprecipitated either MEIOB or SPATA22 (Fig. 3A and B and Fig. S1A and B). Notably, we did not succeed in revealing RPA3 in our Co-IP experiments due to detection limitations. We further demonstrated that the OBCD of SPATA22 and the OBCD3 of MEIOB are necessary and sufficient not only to interact with each other (see above) but also to interact with RPA1 and RPA2 (Fig. 3C and Fig. S1C for input). These results demonstrate that MEIOB and SPATA22 cooperate to interact with RPA through their C-terminal OBCDs.

To verify whether MEIOB/SPATA22 and RPA are able to interact together with ssDNA, we co-purified MEIOB and SPATA22 proteins overexpressed in insect cells. Despite a low yield due in large part to very low solubility of MEIOB and SPATA22, we recovered enough protein to analyze ssDNA binding of the proteins by electron microscopy. In saturating conditions, human RPA polymerizes and coats circular ssDNA (Fig. 4). Interestingly, the addition of MEIOB and SPATA22 to the reaction induced thickening of the protein-DNA complexes with brighter patches (white arrowheads, Fig. 4) than RPA-DNA complexes (white arrows, Fig. 4). These results suggest that MEIOB, SPATA22 and RPA together coat ssDNA.

### **MEIOB and SPATA22 are recruited together with RPA at DNA lesions**

To better characterize the role of the interactions between MEIOB, SPATA22 and RPA, we questioned whether DNA lesions, formed in the absence of meiotic chromatin, were sufficient to recruit these proteins together. To test this hypothesis, we transiently expressed MEIOB and SPATA22 in transfected human HeLa cells and subjected them to DNA damage with 1  $\mu$ M camptothecin. Blocking DNA topoisomerase I (TOP1) with camptothecin induces DSB formation during DNA replication (45). To specifically reveal the damage-associated fraction, the cells were permeabilized before fixation. As expected, RPA1 and RPA2 co-localized and formed foci on damaged DNA after camptothecin treatment of HeLa cells (Fig. 5A)(46). RPA

foci were similar when HeLa cells were transfected with MEIOB alone, SPATA22 alone or MEIOB and SPATA22 (Fig. 5 and Fig. S2A). Neither MEIOB nor SPATA22 could be detected after DNA lesion formation when transfected alone (Fig. 5A and Fig. S2A). However, when expressed together, MEIOB and SPATA22 co-localized with RPA foci showing their recruitment to DNA lesions (Fig. 5B). Similar results were obtained with DSBs induced in different phases of the cell cycle with etoposide, an inhibitor of DNA topoisomerase II (Fig. S2B) (47). Together these results show that DNA damage induction is sufficient to recruit MEIOB and SPATA22 in an interdependent manner at RPA-associated sites.

### **MEIOB prevents aberrant loading of DMC1**

During meiosis, two recombinases are necessary to progress through meiotic recombination, namely, RAD51 and its meiosis-specific paralog DMC1 (24-26, 48). We previously described that in the absence of MEIOB and in response to meiotic DSB formation, RAD51 and DMC1 foci were formed in the leptotene and early zygotene stages. At these stages, the number of foci were similar to those obtained in wild-type mice (23). However, although the DSBs were not repaired, the numbers of DMC1 and RAD51 foci decreased (23) when *Meiob*<sup>-/-</sup> mutant failed to progress properly and became arrested in the zygotene-like and pachytene-like stages. This observation is strongly reinforced by the fact that the same phenotype has been described in rats lacking SPATA22 (34) suggesting that MEIOB and SPATA22 may play a role in the maintenance of the recombinases.

To further investigate the role of MEIOB and SPATA22, we co-immunolocalized RAD51 and DMC1 to decipher the behavior of the two proteins in WT and *Meiob*<sup>-/-</sup> mice. In the WT, DMC1 and RAD51 formed discrete round foci (Fig. S3) and most of the DMC1 foci co-localized with RAD51 foci ( $\approx 90\%$ ) (Fig. S3). Surprisingly, we observed abnormal DMC1 staining with elongated rather than round shape (later termed: long DMC1) in chromosome spreads performed on testes of adult *Meiob*<sup>-/-</sup> mice (observed in the five adult mice we analyzed) (Fig. 6A, yellow arrows). This long DMC1 is composed of the juxtaposition of multiple DMC1 foci. This staining was first detected in early zygotene (50% of the cells presented at least one long DMC1) and accumulated in cells arrested in the zygotene-like and pachytene-like stages (80% of the cells presented at least one long DMC1) (Fig. 6B and S4).

Although aberrant DMC1 staining has been observed in all the adult mutant mice we analyzed for this work, we cannot rule out the possibility that the mixed background of our mice may induce variability. Among the numerous spreads we analyzed, we did not observe a similar pattern of behavior for RAD51 foci. In wild-type mice, almost all DMC1 foci were associated with a RAD51 focus (Fig. S3). In *Meiob*<sup>-/-</sup> mice, almost all long DMC1 were associated with at least one RAD51 (Fig. 6B and C). Interestingly as shown in Fig. 6C and drawn in Fig. 6D, aberrant long DMC1 is often associated with a RAD51 focus on the axis and/or interrupted by a RAD51 focus outside of the axis. Altogether, these results demonstrate that the absence of MEIOB strongly affects DMC1 and RAD51 behavior in different ways.

### **BLM is recruited on the chromosome axis in the absence of MEIOB**

In the absence of MEIOB, the numerous connections observed between non-homologous chromosomes strongly suggest that aberrant invasions may occur (23). Moreover, we and others observed that in the absence of MEIOB or SPATA22, the recombinases RAD51 and DMC1 were precociously removed from the meiotic chromosome axes (23, 34). *In vitro* assays showed that BLM can dismantle RAD51 from ssDNA and reverse D-loops (32). Moreover, Moens et al. showed the presence of BLM proteins on meiotic chromosomes in mice and Holloway et al. reported that BLM deficiency leads to abnormal meiotic prophase I progression and an increase of chiasma number confirming its role in the proper progression of recombination intermediates during meiosis in mice (49, 50). Given these observations, we investigated the behavior of BLM in the presence or absence of MEIOB. On wild-type meiotic chromosomes, most of the BLM foci are faint and located outside of the chromosomes axis with only few bright foci located on chromosomes axis mostly during zygotene and early pachytene (Fig. 7A and Fig. S5 and S6). In the absence of MEIOB, bright BLM foci accumulate on the chromosome axis during the zygotene-like and pachytene-like stages (Fig. 7A and Fig. S5 and S6). Interestingly, the fact that BLM foci co-localized with RPA on the chromosome axis demonstrates that BLM accumulates at unrepaired DSBs in the absence of MEIOB (Fig. 7A). Moreover, the presence of BLM at connections of non-homologous chromosomes strongly suggests that these connections reflect non-homologous invasion initiated by a DSB (Fig. S6).

As mentioned above, the absence of MEIOB induces a meiotic arrest with a reduced number of DMC1 and RAD51 foci. To see whether there is a correlation between the formation of BLM foci and the disappearance of the recombinases, we co-stained and quantified DMC1 and BLM foci (Fig. 7B and C and Fig. S5). As DMC1 analysis revealed two populations of staining correlated with two populations of mice, with short or long DMC1, we distinguished these two populations for BLM quantification. In the absence of MEIOB, the disappearance of the recombinases is observed in zygotene-like and pachytene-like cells. For this reason, to investigate whether BLM accumulation could be correlated with DMC1 disappearance, we selected the categories of cells (high and low DMC1 foci) depending on the number of recombinase foci rather than on their SYCP3 staining. We used an arbitrary cutoff at 100 foci. Below this cutoff, wild-type cells are already advanced in the pachytene stage and have repaired part of the breaks whereas *Meiob*<sup>-/-</sup> meiotic cells are arrested in zygotene/early pachytene with unrepaired breaks. In all cases, the number of BLM foci increases in the mutant cells regardless of the number and the shape of the DMC1 foci (Fig. 7C). This increase is correlated with the decrease of DMC1 and is more pronounced for the cells without long DMC1 foci and low DMC1 foci number. Altogether, our results highlight a correlation between DMC1 removal and BLM accumulation.

## Discussion

Herein, we deciphered the modality and the role of MEIOB, SPATA22 and RPA interactions. Based on the homology existing between MEIOB and RPA1, we demonstrated that MEIOB and SPATA22 interact with each other in an RPA-like manner (Fig. 2B and C). In particular, we showed that as observed for RPA, the minimum dimerization core consists on the last OBCD (OBCD3) of MEIOB and the OBCD of SPATA22. In addition, we showed that MEIOB and SPATA22 cooperate to interact with RPA (Fig. 3). Interestingly, we showed that the minimum dimerization core of MEIOB and SPATA22, was necessary and sufficient to ensure an interaction between the two proteins and RPA. Further work involving RPA truncations will be necessary to clarify precisely how RPA interacts with MEIOB and SPATA22. Bochkareva et al. observed in the crystal of the minimal domains essential to form the RPA trimer (trimerization core) that two independent trimers were packed together, with one trimer complementing an interface exposed by the other (42). Therefore, a tempting hypothesis would be to propose that RPA and MEIOB/SPATA22 interact with each other as do these two trimers by complementing, respectively, the exposed surfaces of the trimerization core of RPA and the dimerization core of MEIOB/SPATA22. Consequently, they would form a meiosis-specific RPA-like complex composed of (at least) five different proteins with OB domains including MEIOB, SPATA22 and RPA1/2/3. The fact that MEIOB and SPATA22 co-localize with RPA on meiotic chromosomes and DNA lesions induced by various agents (Fig. 5 and Fig. S5B) strongly supports the existence of this meiosis-specific ssDNA binding complex. The existence of this complex is also supported by electron microscopy experiments suggesting that MEIOB/SPATA22 and RPA form a nucleofilament on ssDNA (Fig. 4). However, we cannot fully rule out the possibility that MEIOB and SPATA22 form a meiotic ssDNA binding complex distinct from RPA.

Biochemical studies evidenced that RPA coating of ssDNA protects ssDNA from degradation and secondary structure formation. Consequently, RPA loading favors proper recombinase (RAD51/DMC1) filament formation but slows down their loading on ssDNA (51). The dissociation of RPA from ssDNA stimulates the loading of RAD51 and DMC1. Biophysical assays performed on RPA and proteins involved in presynaptic nucleofilament assembly evidenced that RPA binding on ssDNA is not frozen but dynamic (52, 53). Several RPA-

interacting proteins have been shown to be able to modulate the ssDNA binding activity of RPA (54). Therefore, these proteins can modify RPA turnover on ssDNA. These proteins can be divided into different classes: (i) proteins that favor RPA dissociation from ssDNA, (ii) proteins that are able to stimulate RPA binding to ssDNA, and (iii) proteins that can limit RPA dissociation (54). The first class is well illustrated by BRCA2, which locally displaces RPA and overcomes its inhibition of RAD51 and DMC1 loading on ssDNA (51, 55-57). Recent data evidenced that RPA/RAD51 exchange was ensured by the combined action of BRCA2 and DSS1 (56), with DSS1 mimicking ssDNA to reduce the affinity of RPA with DNA (58). The second class includes the BLM helicase, which stimulate RPA binding to ssDNA by unwinding DNA (54). Finally, the Rad52 protein from *S.cerevisiae* limits RPA dissociation and belongs to the third class of RPA-interacting proteins (53). The fact that MEIOB, SPATA22 and RPA co-localize at DNA-damaged sites, combined to the fact that we hypothesized that MEIOB and SPATA22 could interact with RPA through a complementation of the trimerization core of RPA with the dimerization core of MEIOB/SPATA22, let us suggest that rather than transiently interacting with RPA, MEIOB and SPATA22 could associate with RPA to form a new RPA-like complex. Compared to RPA alone, this complex may have different (i) turnover and (ii) response to RPA-interacting proteins (working model presented in Fig. 8). For example, this complex could have a stronger resistance to BRCA2-mediated DMC1 loading compared to RPA alone (Fig. 8). This property could explain why extensive DMC1 filaments are formed in the absence of MEIOB (Fig. 6 and 8). Consequently, these abnormal recombinase filaments could catalyze improper invasion and generate toxic recombination intermediates. Biochemical approaches with purified proteins will be necessary to test this hypothesis.

Unlike DMC1, RPA did not form long filaments in the absence of MEIOB. This result suggests that aberrant DMC1 filaments are extended on dsDNA rather than on ssDNA formed by extensive resection (Fig. 8). Notably, RAD51 and DMC1 can be loaded and form a filament on dsDNA *in vitro* (59). We observed that aberrant DMC1 staining is systematically initiated on the axis and extended outside of the axis (Fig. 6A, C and D) suggesting that the polymerization occurs on chromosome loops. Interestingly, this aberrant staining was accompanied most of the time by one RAD51 focus on the axis, suggesting that DMC1 polymerization initiates with RAD51. Moreover, these long DMC1 filaments were often

interrupted by sparse RAD51 foci that could correspond to a reinitiation by RAD51 (Fig. 6C and D). Our data describe for the first time a difference between DMC1 and RAD51 behavior on meiotic chromosomes in mice and are consistent with the current model proposing that RAD51 loading initiates DMC1 filament formation (60). Interestingly DMC1, the meiotic recombinase, seems to be more affected than RAD51 by the lack of MEIOB, which is also meiosis specific. A tempting hypothesis is to propose that MEIOB and SPATA22 could complement RPA to regulate the specific features of the meiotic nucleofilament containing DMC1.

Because in the absence of MEIOB, non-homologous connections often occur and DMC1 forms aberrant filaments, we questioned whether BLM, known to dismantle RAD51-ssDNA filaments and D-loops, could be stimulated in the absence of MEIOB (32). Interestingly, we observed that BLM accumulates on meiotic chromosomes in the absence of MEIOB (Fig. 7). This accumulation increases when the number of DMC1 foci decreases suggesting that BLM could be responsible for the clearance of the recombinases in the absence of MEIOB. BLM accumulation is observed in cells whether or not they present long DMC1. However, BLM accumulation is more pronounced in juvenile mice that do not present long aberrant DMC1 foci (Fig. 7C). These data strongly suggests that BLM has removed the recombinases, preventing abnormal extension of the filament in these cells (Fig. 8). However, the reason why DMC1 filaments cannot be removed in cells of adult mice remains unclear. As BLM staining is reduced in these cases, a possible explanation would be that BLM recruitment efficiency and/or BLM availability is not sufficient in these mice.

We previously published that MEIOB was loaded on meiotic chromosomes in *Dmc1*<sup>-/-</sup> mice that do not support strand invasion of the homolog (23). This observation suggests that MEIOB can be loaded before invasion. In the present work, we show that the formation of DMC1 foci is affected by the absence of MEIOB. Together, these observations support the idea that MEIOB and SPATA22 play an early role to ensure the integrity of the recombinase nucleofilament necessary for proper strand invasion. However, RPA binding on the D-loop is important to facilitate strand invasion by the recombinase filament. The fact that MEIOB, SPATA22 and RPA co-localize and form bright foci in late zygotene and early pachytene is also consistent with loading on the D-loop (23, 33). Moreover, as MEIOB, SPATA22 and

RPA foci persist longer than recombinase foci, they may also play a later role in the maturation of recombination intermediates.

RPA is a protein complex that is essential and particularly well conserved among eukaryotes. An RPA-like complex has been identified in archaea, with the large subunit sharing homology with RPA1 (61). Altogether, these observations demonstrate that RPA is an ancestral complex. The fact that homologs of MEIOB have been found in metazoans, fungi, and *Capsasporidae* but not in all eukaryotes (plants) suggests that the appearance of MEIOB occurred more recently, at the early evolution of the Opisthokonta monophyletic group (35). Consequently, the homology existing between RPA1 and MEIOB and the fact that the *Meiob* gene emerged more recently than *Rpa1* favor the idea that MEIOB issued from a duplication of an ancestral *Rpa1* gene.

Interestingly, our results suggest that MEIOB and SPATA22 could have evolved as counterparts of the meiosis-specific recombinase DMC1 in order to regulate DMC1 filaments. However, the co-conservation of MEIOB/SPATA22 and DMC1 is not universal among eukaryotes. For example, the *Drosophila melanogaster* genome does not present an apparent ortholog of DMC1 but possesses HDM, a homolog of MEIOB (23, 62, 63), whereas DMC1 is conserved in the *Saccharomyces cerevisiae* genome, and we have not been able to find any homolog of MEIOB or of SPATA22 in this species. To reconcile the evolution of these species with a putative functional link between MEIOB and DMC1, we can propose two scenarios. In the case of *Drosophila*, the loss of DMC1 would have been accompanied by a modification of the role of MEIOB rather than its loss, whereas the loss of MEIOB in *S. cerevisiae* would have been followed by a gain of function of RPA to counteract DMC1. The gene loss hypothesis proposed in these scenarios is reinforced by the fact that MEIOB co-exists with DMC1 in phyla close to these species.

To conclude, our cellular and biochemical approaches allowed us to propose that RPA, MEIOB and SPATA22 work closely together during meiotic recombination. Their combined action may have evolved in mammals to satisfy the specific outcome of the meiotic recombination such as dealing with a mixed recombinase filament. Biochemical assays with purified factors will be necessary to better understand their role.

## Acknowledgements

We thank the members of the Laboratory of the Development of the Gonads for discussions and technical support. We are thankful to the members of the animal housing facility at the iRCM, in particular V. Neuville and C. Joubert. We thank L. Irbah for technical support for confocal imaging. We thank M.S. Wold for RPA plasmids, C. Saintomé for purified HsRPA and P. Drevet for the development of the baculovirus system. We are especially grateful to M. Grelon for careful reading and constructive comments on the manuscript. This work was supported by ANR, INSERM, Fondation ARC, and La Ligue contre le Cancer. J.R. was supported by a CEA fellowship and La Ligue contre le Cancer.

## Materials and Methods

### **ssDNA pulldown assay**

ssDNA pulldowns were performed as previously described (23) with some modifications. Briefly, full-length and truncated forms of SPATA22 were expressed using the TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). The binding reaction was performed with biotinylated ssDNA and Dynabeads M-280 Streptavidin (Life Technologies) in binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mg/ml BSA, 0.05% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, complete protease inhibitor without EDTA (Roche)), washed in rinsing buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 0.05% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, complete protease inhibitor without EDTA (Roche)), and elution was performed directly in Laemmli buffer. Details can be found in the *SI Materials and Methods*.

### **Co-Immunoprecipitations**

Co-immunoprecipitations were performed as previously described (64) with modifications. HEK-293 cells were lysed in supplemented cell lysis buffer (Cell Signaling), and proteins were bound overnight in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol except for IP-HA, 10 mg/ml BSA,

complete protease inhibitor without EDTA, Roche, 10  $\mu$ M MG-132 and 90 U/ml Benzonase nuclease, Novagen). Additional digestion with Benzonase was performed with the following reagents: 90 U/ml Benzonase nuclease, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM beta-mercaptoethanol except for IP-HA, 10 mg/ml BSA, and complete protease inhibitor without EDTA (Roche). Details can be found in the *SI Materials and Methods*.

### **Immunofluorescence on HeLa cells**

To remove the free proteins and retain the chromatin-associated fraction, the cells were permeabilized before fixation as previously described (65). Details can be found in the *SI Materials and Methods*.

### **Immunofluorescence on preparations of chromosome spreads**

Chromosomes spreads are detailed in the *SI Materials and Methods*.

## References

1. Zickler D, Kleckner N (2015) Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7
2. Baudat F, Imai Y, de Massy B (2013) Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* 14:794–806.
3. Andersen SL, Sekelsky J (2010) Meiotic versus mitotic recombination: two different routes for double-strand break repair: the different functions of meiotic versus mitotic DSB repair are reflected in different pathway usage and different outcomes. *Bioessays* 32:1058–1066.
4. Lam I, Keeney S (2014) Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016634.
5. Robert T, Vrielynck N, Mézard C, de Massy B, Grelon M (2016) A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Semin Cell Dev Biol* 54:165–176.
6. Hunter N (2015) Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7
7. Youds JL, Boulton SJ (2011) The choice in meiosis - defining the factors that influence crossover or non-crossover formation. *J Cell Sci* 124:501–513.
8. Cole F, Kauppi L, Lange J, Roig I, Wang R, Keeney S, Jasin M (2012) Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat Cell Biol* 14:424–430.
9. Martini E, Diaz RL, Hunter N, Keeney S (2006) Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* 126:285–295.
10. Mehta A, Haber JE (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a016428.
11. Alani E, Thresher R, Griffith JD, Kolodner RD (1992) Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of y-RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* 227:54–71.
12. Sugiyama T, Zaitseva EM, Kowalczykowski SC (1997) A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem* 272:7940–7945.

13. Wang X, Haber JE (2004) Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biol* 2:E21.
14. Wold MS (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61–92.
15. Gasior SL, Olivares H, Ear U, Hari DM, Weichselbaum R, Bishop DK (2001) Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8411–8418.
16. Gaines WA, Godin SK, Kabbinavar FF, Rao T, VanDemark AP, Sung P, Bernstein KA (2015) Promotion of presynaptic filament assembly by the ensemble of *S. cerevisiae* Rad51 paralogues with Rad52. *Nat Commun* 6:7834.
17. Suwaki N, Klare K, Tarsounas M (2011) RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol* 22:898–905.
18. Plug AW, Peters AH, Keegan KS, Hoekstra MF, de Boer P, Ashley T (1998) Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci* 111:413–423.
19. Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B (2002) The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115:1611–1622.
20. Oliver-Bonet M, Campillo M, Turek PJ, Ko E, Martin RH (2007) Analysis of replication protein A (RPA) in human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 13:837–844.
21. Egger AL, Inman RB, Cox MM (2002) The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J Biol Chem* 277:39280–39288.
22. Sneed JL, Grossi SM, Tappin I, Hurwitz J, Heyer WD (2013) Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Res* 41:4913–4925.
23. Souquet B, Abby E, Herve R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, Duquenne C, Messiaen S, Martini E, Bernardino-Sgherri J *et al.* (2013) MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination. *PLoS Genet* 9:e1003784.
24. Bishop DK, Park D, Xu L, Kleckner N (1992) DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* 69:439–456.

25. Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1:707–718.
26. Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1:697–705.
27. Cloud V, Chan YL, Grubb J, Budke B, Bishop DK (2012) Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science* 337:1222–1225.
28. Da Ines O, Degroote F, Goubely C, Amiard S, Gallego ME, White CI (2013) Meiotic Recombination in Arabidopsis Is Catalysed by DMC1, with RAD51 Playing a Supporting Role. *PLoS Genet* 9:e1003787.
29. Croteau DL, Popuri V, Opresko PL, Bohr VA (2014) Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annu Rev Biochem* 83:519–552.
30. De Muyt A, Jessop L, Kolar E, Sourirajan A, Chen J, Dayani Y, Lichten M (2012) BLM Helicase Ortholog Sgs1 Is a Central Regulator of Meiotic Recombination Intermediate Metabolism. *Mol Cell* 46:43–53.
31. Zakharyevich K, Tang S, Ma Y, Hunter N (2012) Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell* 149:334–347.
32. Bugreev DV, Yu X, Egelman EH, Mazin AV (2007) Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* 21:3085–3094.
33. Luo M, Yang F, Leu NA, Landaiche J, Handel MA, Benavente R, La Salle S, Wang PJ (2013) MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nat Commun* 4:2788.
34. Ishishita S, Matsuda Y, Kitada K (2014) Genetic evidence suggests that Spata22 is required for the maintenance of Rad51 foci in mammalian meiosis. *Sci Rep* 4:6148.
35. Ribeiro J, Abby E, Livera G, Martini E (2016) RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* 125:265–276.
36. Kallberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J (2012) Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7:1511–1522.
37. Murzin AG (1993) OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J* 12:861–867.

38. Chen R, Wold MS (2014) Replication protein A: single-stranded DNA's first responder: dynamic DNA-interactions allow replication protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *Bioessays* 36:1156–1161.
39. Kim DK, Stigger E, Lee SH (1996) Role of the 70-kDa subunit of human replication protein A (I). Single-stranded dna binding activity, but not polymerase stimulatory activity, is required for DNA replication. *J Biol Chem* 271:15124–15129.
40. Lin YL, Chen C, Keshav KF, Winchester E, Dutta A (1996) Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A. *J Biol Chem* 271:17190–17198.
41. Bochkarev A, Bochkareva E, Frappier L, Edwards AM (1999) The crystal structure of the complex of replication protein A subunits RPA32 and RPA14 reveals a mechanism for single-stranded DNA binding. *EMBO J* 18:4498–4504.
42. Bochkareva E, Korolev S, Lees-Miller SP, Bochkarev A (2002) Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J* 21:1855–1863.
43. Gomes XV, Wold MS (1996) Functional domains of the 70-kilodalton subunit of human replication protein A. *Biochemistry* 35:10558–10568.
44. Fan J, Pavletich NP (2012) Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. *Genes Dev* 26:2337–2347.
45. Ryan AJ, Squires S, Strutt HL, Johnson RT (1991) Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Res* 19:3295–3300.
46. Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450:509–514.
47. Muslimović A, Nyström S, Gao Y, Hammarsten O (2009) Numerical analysis of etoposide induced DNA breaks. *PLoS ONE* 4:e5859.
48. Shinohara A, Ogawa H, Ogawa T (1992) Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69:457–470.
49. Moens PB, Freire R, Tarsounas M, Spyropoulos B, Jackson SP (2000) Expression and nuclear localization of BLM, a chromosome stability protein mutated in Bloom's syndrome, suggest a role in recombination during meiotic prophase. *J Cell Sci* 113:663–672.

50. Holloway JK, Morelli MA, Borst PL, Cohen PE (2010) Mammalian BLM helicase is critical for integrating multiple pathways of meiotic recombination. *J Cell Biol* 188:779–789.
51. Kowalczykowski SC (2015) An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7
52. Gibb B, Ye LF, Gergoudis SC, Kwon Y, Niu H, Sung P, Greene EC (2014) Concentration-dependent exchange of replication protein A on single-stranded DNA revealed by single-molecule imaging. *PLoS One* 9:e87922.
53. Gibb B, Ye LF, Kwon Y, Niu H, Sung P, Greene EC (2014) Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nat Struct Mol Biol* 21:893–900.
54. Fanning E, Klimovich V, Nager AR (2006) A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* 34:4126–4137.
55. Martinez JS, von Nicolai C, Kim T, Ehlen A, Mazin AV, Kowalczykowski SC, Carreira A (2016) BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*
56. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer WD (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17:1260–1262.
57. Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467:678–683.
58. Zhao W, Vaithiyalingam S, San Filippo J, Maranon DG, Jimenez-Sainz J, Fontenay GV, Kwon Y, Leung SG, Lu L, Jensen RB *et al.* (2015) Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol Cell* 59:176–187.
59. Sheridan SD, Yu X, Roth R, Heuser JE, Sehorn MG, Sung P, Egelman EH, Bishop DK (2008) A comparative analysis of Dmc1 and Rad51 nucleoprotein filaments. *Nucleic Acids Res* 36:4057–4066.
60. Bishop DK (2012) Rad51, the lead in mitotic recombinational DNA repair, plays a supporting role in budding yeast meiosis. *Cell Cycle* 11
61. Komori K, Ishino Y (2001) Replication protein A in *Pyrococcus furiosus* is involved in homologous DNA recombination. *J Biol Chem* 276:25654–25660.

62. Joyce EF, Tanneti SN, McKim KS (2009) *Drosophila* hold'em is required for a subset of meiotic crossovers and interacts with the dna repair endonuclease complex subunits MEI-9 and ERCC1. *Genetics* 181:335–340.
63. Abdu U, González-Reyes A, Ghabrial A, Schüpbach T (2003) The *Drosophila* spn-D gene encodes a RAD51C-like protein that is required exclusively during meiosis. *Genetics* 165:197–204.
64. Abby E, Tourpin S, Ribeiro J, Daniel K, Messiaen S, Moison D, Guerquin J, Gaillard JC, Armengaud J, Langa F *et al.* (2016) Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat Commun* 7:10324.
65. Martini E, Roche DM, Marheineke K, Verreault A, Almouzni G (1998) Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells. *J Cell Biol* 143:563–575.
66. Maiti R, Van Domselaar GH, Zhang H, Wishart DS (2004) SuperPose: a simple server for sophisticated structural superposition. *Nucleic Acids Res* 32:W590–4.
67. Kraulis PJ (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography* 24:946–950.
68. mattingly RR, Macara IG (1996) Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature* 382:268–272.
69. Bieniossek C, Imasaki T, Takagi Y, Berger I (2012) MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* 37:49–57.
70. Fitzgerald DJ, Berger P, Schaffitzel C, Yamada K, Richmond TJ, Berger I (2006) Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nat Methods* 3:1021–1032.
71. Dupaigne P, Le Breton C, Fabre F, Gangloff S, Le Cam E, Veaute X (2008) The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination. *Molecular Cell* 29:243–254.

## Figure Legends

### Figure 1

SPATA22 is a ssDNA binding protein. (A) Left panel: Stereo ribbon representation of predicted OB containing domain (OBCD) of human SPATA22. This model has been obtained using the RaptorX server (36) and visualized with Jmol ([www.jmol.org](http://www.jmol.org)). Right panel: superposition of the stereo ribbon representations of RPA2 OBCD (yellow, (42)) and of SPATA22 OBCD (red) obtained from its predicted structure. (B) Schematic representation of human tagged SPATA22 and truncated forms used in this study. The OBCD of SPATA22 is presented as a blue box, and the 3xHA tag as a red one. (C) Tagged versions of full-length SPATA22,  $\Delta$ OBCD or OBCD were expressed in a cell-free system and mixed with biotin alone or a biotinylated single-stranded DNA 59-mer (ssDNA 59-mer) and precipitated with streptavidin-coupled magnetic beads. The retained proteins were subjected to western blotting and hybridized with anti-HA antibody to reveal SPATA22. Tagged-full length SPATA22,  $\Delta$ OBCD and OBCD displayed respective sizes of 44, 30 and 18 kDa, corresponding to their theoretical molecular weights. The data are representative of three independent experiments. (D) Quantification of band intensity in C. Quantifications were relative to pulldown input protein extracts. Mean  $\pm$  SEM, n=3.

### Figure 2

MEIOB and SPATA22 interact in an RPA-like manner. (A) Schematic representation of human tagged MEIOB, tagged SPATA22 and truncated forms used in this study with OBCDs of MEIOB (green boxes), OBCD of SPATA22 (blue boxes) and tags (red boxes). SPATA22  $\Delta$ OBCD and OBCD are presented in Fig. 1B. (B) MEIOB and/or SPATA22 were transfected in HEK-293 cells, and MEIOB (FLAG (MEIOB) IP) was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. Full-length and truncated forms of MEIOB were expressed alone (lanes 2 to 5) or co-expressed with SPATA22 (lanes 6 to 9). Immunoprecipitated proteins were detected by western blotting using anti-FLAG to detect MEIOB (the three upper panels) or anti-HA to detect SPATA22 (lower panel). Tagged-full length MEIOB,  $\Delta$ OBCD3, OBCD3 and  $\Delta$ C helix displayed respective sizes of 56, 37, 23 and 54 kDa, corresponding to their theoretical

molecular weights. The data are representatives of three independent experiments. (C) MEIOB and/or SPATA22 were transfected in HEK-293 cells and SPATA22 (HA (SPATA22) IP) was immunoprecipitated with anti-HA antibody. Full-length or truncated forms of SPATA22 were expressed alone (lanes 2 to 5) or co-expressed with MEIOB (lanes 6 to 9). Immunoprecipitated proteins were detected by western blotting using anti-HA to detect SPATA22 (the three upper panels) or anti-FLAG to detect MEIOB (lower panel). Tagged full-length SPATA22,  $\Delta$ OBCD, OBCD and  $\Delta$ C helix displayed respective sizes of 44, 30, 18 and 41 kDa, corresponding to their theoretical molecular weights. (\*) Represents a non-specific band or a post-translational modification of SPATA22 OBCD that displays a molecular weight greater than 30 kDa. (#) MEIOB is slightly retained in a non-specific manner on the anti-HA column. The data are representative of at least two independent experiments.

### Figure 3

MEIOB and SPATA22 collaborate to interact with RPA. (A) Co-IPs with FLAG (MEIOB) of Fig. 2B were used to detect human RPA1 and RPA2 with anti-RPA1 (upper panel) and anti-RPA2 (lower panel). The interactions between MEIOB and SPATA22 observed in Fig. 2B are summarized (interaction MEIOB-SPATA22). The data are representatives of three independent experiments. (B) Human RPA1 and RPA2 from HA (SPATA22) IP of Fig. 2C were detected using anti-RPA1 (upper panel) and anti-RPA2 (lower panel). Interactions between MEIOB and SPATA22 observed in Fig. 2C are summarized. The data are representative of at least two independent experiments. (C) MEIOB OBCD3 and SPATA22 OBCD interact with RPA. MEIOB and/or SPATA22 were transfected in HEK-293 cells, and MEIOB (FLAG (MEIOB) IP) was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody. Full-length SPATA22 and full-length MEIOB were expressed alone (lane 1 and 2) or co-expressed (lane 5). SPATA22 OBCD and MEIOB OBCD3 were expressed alone (lane 3 and 4) or co-expressed (lane 6). Immunoprecipitated proteins were detected by western blotting using anti-FLAG to detect MEIOB (two first upper panels), anti-HA to detect SPATA22 (two middle panels), anti-RPA1 or anti-RPA2 (two lower panels). The data are representative of two independent experiments.

### Figure 4

MEIOB, SPATA22 and RPA are recruited together on ssDNA. Circular ssDNA ( $\Phi$ X virion) is incubated with RPA alone (left panels) or with RPA + MEIOB/SPATA22 (right panels) and analyzed by electronic microscopy. Thicker areas (arrowheads) are formed when MEIOB and SPATA22 are present with RPA. Thinner areas (arrows) resemble filaments formed by ssDNA and RPA alone as shown on the left panels.

#### Figure 5

MEIOB and SPATA22 cooperate to be recruited to camptothecin-induced DNA lesions. HeLa cells were transiently transfected with MYC-FLAG-tagged MEIOB alone or MYC-FLAG-tagged MEIOB and SPATA22. Cells were exposed to 1  $\mu$ M camptothecin in order to induce DNA damage and were permeabilized before fixation. (A) Representative HeLa cells immunostained for the RPA subunits RPA1 and RPA2 and for FLAG (MEIOB). MEIOB co-localizes with RPA only in the presence of SPATA22 and after camptothecin exposure. (B) Representative HeLa cells immunostained for RPA2, SPATA22 and for FLAG (MEIOB). MEIOB and SPATA22 co-localize together with RPA after induction of DNA damage. Images correspond to a focal plane obtained by confocal microscopy.

#### Figure 6

DMC1 forms elongated foci in the absence of MEIOB. (A) Chromosome spread of representative spermatocyte nucleus from a *Meiob*<sup>-/-</sup> mouse immunostained for RAD51 (white) and DMC1 (green) recombinases and for the lateral axis marker SYCP3 (red). Long DMC1 stainings initiate on the chromosome axis. At the bottom are presented enlarged view of the white box. Yellow arrows show long DMC1. (B) Quantification of the number of RAD51 and DMC1 foci per cell in *Meiob*<sup>-/-</sup> mice. Circle= RAD51 foci, square= DMC1 foci, triangle= co-localized RAD51 and DMC1 foci, inverted triangle= number of long DMC1 observed per cell, diamond= number of long DMC1 non-associated with a RAD51 focus. Leptotene (n= 12); early zygotene (n=12); zygotene (n=20); zygotene-like/ pachytene-like (n=46); total mice analyzed (n=2). Error bars show the mean  $\pm$  SEM. (C) Magnified representative examples of long DMC1 staining from *Meiob*<sup>-/-</sup> spermatocytes. Long DMC1 (green) is punctuated by RAD51 foci (red). SYCP3 (white) stains the lateral axis. White arrows show a RAD51 focus on the axis localized at the initiation of long DMC1. (D)

Cartoon representing an example of situations often observed with long DMC1, RAD51 and chromosome axis.

### Figure 7

BLM accumulates on meiotic chromosomes in the absence of MEIOB. (A) BLM foci co-localize with RPA in the absence of MEIOB. Chromosome spreads of representative spermatocyte nuclei from *Meiob*<sup>+/+</sup> and *Meiob*<sup>-/-</sup> mice are immunostained for RPA2 (red), BLM (green) and SYCP3 (blue). Enlarged views of chromosomes highlighted by the white boxes, are shown for *Meiob*<sup>+/+</sup> and *Meiob*<sup>-/-</sup> mice at the bottom. Merges (left) and offset (right) of the red and green channels are presented. White dashed lines separate individual spread cells. (B) WT and *Meiob*<sup>-/-</sup> mice are immunostained for BLM (red), DMC1 (green) and SYCP3 (blue). Wild-type cells show little BLM staining on the meiotic chromosome axis, whereas spermatocytes from *Meiob*<sup>-/-</sup> spermatocytes present BLM accumulation and long DMC1. On the right column, chromosomes highlighted by the white box are enlarged. The white arrow indicates a DMC1 focus that co-localizes with a BLM focus. The yellow arrow highlights a long DMC1 devoid of BLM foci. (C) Quantification of BLM and DMC1 immunostained foci. With short DMC1 (spreads from mice presenting mainly short DMC1): high DMC1 (above 100 foci), WT (n=27) and mutant (n=4), low DMC1 (below 100 foci), WT (n=11) and mutant (n=27). With long DMC1 (spreads from mice presenting long DMC1): high DMC1 (above 100 foci), WT (n=22) and mutant (n=25), low DMC1 (below 100 foci), WT (n=22) and mutant (n=63). Total mice analyzed, WT (n=4), *Meiob*<sup>-/-</sup> (n=5). Error bars show the mean ± SEM. P values were calculated with the non-parametric Mann-Whitney test. \*P<0.05, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.0005, \*\*\*\*P<0.0001.

### Figure 8

Hypothetical model of MEIOB and SPATA22 function during meiotic nucleofilament assembly. In the absence of MEIOB, RPA turnover and its displacement mediated by BRCA2-DSS1 do not support proper RAD51 and DMC1 nucleofilament formation. Unregulated polymerization of DMC1/RAD51 filaments goes beyond the ssDNA/dsDNA junction and BLM is recruited. Then, BLM dismantles the recombinase filament or D-loop formed by this aberrant filament. In WT, MEIOB and SPATA22 complement RPA to form a meiotic-specific ssDNA binding complex with lower turnover compared to RPA alone and/or

higher resistance to BRCA2-DSS1 resulting in the formation of a nucleofilament capable of properly invading the homologous sequence.

## Supplementary information

### Materials and Methods

#### **Mice**

All animal studies were conducted in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals of the French Ministry of Agriculture and were submitted to the ethics committee of CETEA-CEA DSV (France). Mice were raised and mated, and gonads were isolated as previously described (23). Mice used in this study were on a 129/Sv x C57BL/6 x NMRI mixed background, and were previously described in (23). To minimize variability from strain background experimental animals were compared to littermate controls. Mice were genotyped by PCR of tailed DNA using a REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. The sequences of primers used are published in (23).

#### **Protein structures**

Models were obtained using the RaptorX server (36) and visualized with Jmol ([www.jmol.org](http://www.jmol.org)). Superposition was performed using the SuperPose server (66) and visualized with MolScript (67).

#### **Cell culture and plasmid transfections**

Cells were cultivated in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator at 37°C. Human Embryonic Kidney cells (HEK-293, ATCC) and HeLa cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco). Plasmid transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

#### **Plasmid constructions**

Before use, all constructs were validated by DNA sequencing. To express 3xHA N-terminal tagged human SPATA22 full length,  $\Delta$ OBCD,  $\Delta$ C helix and OBCD only in human cells for

Co-IP, we generated pKH3-hSPATA22 full length,  $\Delta$ OBCD,  $\Delta$ C helix and OBCD only. The desired fragments of human SPATA22 cDNA were amplified by PCR and the PCR products were digested by EcoRI and BamHI and cloned into a pKH3 plasmid (Addgene, (68)). To express 3xHA N-terminal tagged human SPATA22 full length,  $\Delta$ OBCD and OBCD only in a cell-free system, we generated pcDNA3.1(-)3xHA-hSPATA22,  $\Delta$ OBCD and OBCD only. pKH3-hSPATA22 full length,  $\Delta$ OBCD and OBCD only plasmids were digested with XbaI and EcoRI and the digested fragments were cloned into a pcDNA3.1(-) plasmid (Invitrogen). To express a truncated form of MEIOB in human cell lines for Co-IP, pCMV6-hMEIOB-MYC-FLAG (Origene, cat# RC228391) was amplified by PCR and religated to generate pCMV6-hMEIOB $\Delta$ OBCD3-MYC-FLAG, pCMV6-hMEIOB $\Delta$ Chelix-MYC-FLAG and pCMV6-hMEIOB OBCD3 only MYC-FLAG. Immunofluorescence analyses in human cells were performed with pCMV6-XL5-SPATA22 (variant 2) (Origene, cat# SC123038) used to express human SPATA22 full length and pCMV6-hMEIOB-MYC-FLAG (Origene, cat# RC228391) or pCIG-HsMEIOB-IRES-HsSPATA22 (described below).

pCIG-HsMEIOB-IRES-HsSPATA22, a vector to enable co-expression of human MEIOB and human SPATA22 in transfected cells, was constructed in two steps. Briefly, the sequence encoding human SPATA22 was amplified from pET15b-HsSPATA22 (from E. Martini). The resulting PCR product was digested by *MscI*-*BglII* and inserted in a pCIG-MCS-IRES plasmid (obtained from D. Busso). The human MEIOB-MYC-FLAG encoding sequence was amplified from a pCMV6-hMEIOB-MYC-FLAG plasmid. The resulting PCR product was inserted in the previously obtained vector encoding HsSPATA22 by digestion with *XmaI*-*EcoRI*.

pFBGW-GST-HsMEIOB/His6-HsSPATA22/HsRPA2, a vector to enable concomitant expression of the three proteins in insect cells, was constructed in 3 steps. First, the human MEIOB encoding sequence was amplified from pCMV6-hMEIOB-MYC-FLAG. The resulting PCR product was inserted in pDONOR207 during the Gateway BP reaction and subsequently transferred into a pFBGGW plasmid (obtained from D. Busso) during the Gateway LR reaction. This plasmid allowed human MEIOB with an N-terminal GST fusion to be expressed in insect cells. A linker sequence (GAAGG) was inserted between the TEV cleavage site and human MEIOB by PCR. Second, the human SPATA22 coding sequence was released from pET15b-HsSPATA22 (from E. Martini) by *NdeI*-*BamHI* and inserted in a

pFCHGW plasmid (obtained from D. Busso). Thus, the sequence corresponding to the His6-HsSPATA22 coding sequence was digested by *NotI-XbaI* to be inserted in the previously obtained vector encoding GST-HsMEIOB. Finally, the human RPA2 coding sequence was released from pET3a-HsRPA2 (kindly provided by MS. Wold) by *NdeI-BamHI* and inserted in a pFC0GW plasmid (obtained from D. Busso). Thus, the sequence corresponding to the human RPA2 encoding sequence was digested by *NotI-XbaI* to be inserted in the previously obtained vector encoding GST-HsMEIOB and HsSPATA22 to generate the pFBGW-GST-HsMEIOB/His6-HsSPATA22/HsRPA2 vector. The final construct allowed expression of GST-HsMEIOB under the control of a p10 promoter and expression of His6-HsSPATA22 and of HsRPA2 under the control of a pH promoter.

Recombinant baculovirus was constructed using the MultiBac system (69, 70)

### **Purification of the GST-MEIOB His-SPATA22 complex**

High Five cells were infected with the recombinant baculovirus at a multiplicity of infection of  $5 \times 10^{-3}$ . After incubation at 27°C for five days, the cells were harvested, resuspended at  $1.7 \times 10^7$  cells.ml<sup>-1</sup> in 50 mM phosphate buffer pH 7.2, 130 mM NaCl, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 1X Triton X-100, 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 2 μM pepstatin, and 5 μg.ml<sup>-1</sup> leupeptin, and disrupted by sonication. The extract was cleared by centrifugation at 150,000 x g for 1 h. The supernatant was incubated with Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) for 3 h at 4°C. The mixture was poured into a Midi Spin column (GENERON). The resin was washed with buffer A (50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM 1,4-dithiothreitol), and the protein complex was eluted with buffer A containing 30 mM glutathione (GSH). The GST-MEIOB His-SPATA22 complex was stored at 4°C. Note that although MEIOB, SPATA22 and RPA2 were co-expressed, only MEIOB and SPATA22 were retained on the GSH column. Moreover, a high proportion of endogenous GST was co-purified with the GST-MEIOB His-SPATA22 fraction and conserved in the electron microscopy experiments.

### **Transmission electron microscopy (TEM) analysis**

Thirty millimolar  $\phi$ X174 ssDNA virion (NEB- *N3023*) was incubated with 3 mM hRPA (one protein heterotrimer per 10 nucleotides) and with or without GST-purified GST-MEIOB His-SPATA22 preparation in Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, for 5 min at 37°C.

TEM sample preparations were performed by positive staining as previously described (71). Five microliters of diluted DNA-protein reaction was deposited onto a 600 mesh copper grid coated with a thin carbon film, previously activated by glow discharge in the presence of pentylamine (Merck, France). After 1 min, the grids were washed with aqueous 2% (w/vol) uranyl acetate (Merck, France) and then dried with ashless filter paper (VWR, France). TEM observations were carried out with a Zeiss 902 transmission electron microscope in filtered annular dark field mode. Electron micrographs were obtained using a Veleta digital camera and iTEM software (Olympus, Soft Imaging Solutions).

### **ssDNA pulldown assay**

ssDNA pulldowns were performed as previously described (23) with some modifications. An HPLC-purified biotinylated oligonucleotide was used for the pulldown assay: ss59-mer, 5'-GAT CTG CAC GAC GCA CAC CGG ACG TAT CTG CTA TCG CTC ATG TCA ACC GCT CAA GCT GC-3'-biotin-TEG. Human recombinant 3xHA-tagged SPATA22 was produced in a cell-free system. The TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) was used with the pcDNA3.1(-)3xHA-hSPATA22 full length,  $\Delta$ OBCD and OBCD plasmids in a 50- $\mu$ l reaction according to the manufacturer's instructions. Twenty microliters of recombinant hSPATA22 from cell-free extracts and 500  $\mu$ g of Dynabeads M-280 Streptavidin (Life Technologies) with immobilized ssDNA were incubated in 430  $\mu$ l binding buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mg/ml BSA, 0.05% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, complete protease inhibitor without EDTA (Roche)). The DNA-protein mixture was incubated for 2 h at 4°C with gentle agitation. After magnetic separation, the beads were washed twice in 500  $\mu$ l binding buffer without BSA and then washed once in 500  $\mu$ l rinsing buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 0.05% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, complete protease inhibitor without EDTA (Roche)). Bound proteins were eluted directly in 18  $\mu$ l of Laemmli buffer and

boiled for 5 min at 95°C before magnetic separation of the beads and western blotting of the samples.

### **Co-immunoprecipitations**

HEK-293 cells were lysed under native conditions by homogenization in 1X cell lysis buffer (Cell Signaling) supplemented with complete protease inhibitor (Roche), 1 mM beta-mercaptoethanol and 10 μM MG-132 (Sigma-Aldrich) followed by 10 min medium sonication (30 sec « on », 30 sec « off ») and centrifugation at 16,200 x g for 10 min at 4°C. Extracts were diluted four times in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol except for IP-HA, 10 mg/ml BSA, complete protease inhibitor without EDTA, Roche, 10 μM MG-132 and 90 U/ml Benzonase nuclease, Novagen). Extracts of  $\approx 5 \times 10^6$  cells were used for IP with 25 μl of anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich) or anti-HA magnetic beads (ThermoFisher Scientific). The protein/beads mixture was incubated for 16 h at 4°C with gentle agitation. To optimize Benzonase digestion after the binding reaction, the beads were washed twice with Benzonase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM beta-mercaptoethanol except for IP-HA, 10 mg/ml BSA, complete protease inhibitor without EDTA, Roche) and incubated in Benzonase buffer supplemented with 90 U/ml Benzonase nuclease for 45 min at 37°C before being washed three times with rinsing buffer (binding buffer supplemented with 0.05% Tween 20). Immunoprecipitated proteins were eluted directly in 18 μl of Laemmli buffer and boiled for 5 minutes at 95°C before magnetic separation of the beads and western blotting of the samples.

### **Western blotting**

Prior to gel migration, the protein samples were supplemented with Laemmli buffer, boiled for 5 min at 95°C and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 12%, 14% or 15% polyacrylamide gels, respectively, for the IP-FLAG, IP-HA and ssDNA pulldown assays. The separated proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare) before hybridization with appropriate primary antibodies and fluorescent dye-coupled secondary antibody (see Table S1 for antibodies). When the proteins

could be differentiated by size, the same dye was used to reveal different primary antibodies. Images were acquired using a Typhoon 9400 scanner (Amersham Biosciences).

### **DNA damage and drug treatments**

Cells were treated with 1  $\mu$ M camptothecin (Sigma-Aldrich) or 250  $\mu$ M etoposide (Sigma-Aldrich) for 1 h followed by three hours of recovery.

### **Immunofluorescence on HeLa cells**

HeLa cells were grown on glass coverslips 24 h before the experiments. To specifically analyze the chromatin-associated fraction to highlight DNA damage foci, the cells were permeabilized with Triton X-100 before fixation with paraformaldehyde as previously described (65). Briefly, the cells were washed with PBS supplemented with 500  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub> and 500  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub> (PBS-S), then with CSK buffer (10 mM PIPES, pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose and 3 mM MgCl<sub>2</sub>) and incubated for 10 min with CSK buffer containing 0.5% Triton X-100 and complete protease inhibitor (Roche). Cells were further washed with PBS-S, fixed with 4% PFA for 20 min and washed with PBS-S. Before staining, cells were blocked with PBS-S/0.1% Tween 20 (PBS-S-T) containing 5% BSA. Cells were incubated with primary antibodies in PBS-S-T/5% BSA and then washed with PBS-S-T and incubated with the appropriate fluorescent dye-coupled secondary antibody (see Table S1 for antibodies). After washes in PBS-S, coverslips were mounted on glass slides using Prolong Gold (Life Technologies). Imaging was performed using an AX70 epi-fluorescence microscope (Olympus) equipped with a Photometrics CoolSNAP MYO CCD camera or using an SP8 confocal microscope from Leica. Images were analyzed using ImageJ software.

### **Immunofluorescence on preparations of chromosome spreads**

Spermatocyte chromosome spreads were performed according to previously described techniques with modifications (49). Briefly, spermatocytes were homogenized in 0.1 M sucrose before being surface spread on glass slides covered with PFA containing either 0.1% Triton X-100 or 0.25% NP40, incubated for 1-2 h in a humid chamber and washed with H<sub>2</sub>O

plus 0.4% Photo-Flo (Kodak) after a soft drying. For immunofluorescence analysis, the spreads were blocked in 0.2% BSA/0.2% cold-water fish skin gelatin/0.05% Tween 20 in PBS. Primary and secondary antibodies were incubated in the blocking buffer and rinsed 3 times with 0.05% Tween 20 in PBS. The primary antibodies were incubated overnight at room temperature. The dye-conjugated secondary antibodies were incubated for 1 h at 37°C. Slides were mounted in Prolong Gold (Life Technologies) and kept at 4°C until analysis.

### **Antibodies**

A list of antibodies with details including references, applications and dilutions is provided in Table S1.

## Supplementary Data

### Figure S1

Immunoblots for input controls of Fig. 2 and 3. (A) Input control for the FLAG IP presented in Fig. 2B and 3A: 7% of the total volume of the whole-cell extracts were analyzed by western blotting with anti-RPA1, anti-FLAG, anti-HA and anti-RPA2. The data are representative of three independent experiments. (\*) represents the specific signal corresponding to MEIOB  $\Delta$ C helix (B) Input control for the HA IP presented in Fig. 2C and 3B: 7% of the total volume of the whole-cell extracts were analyzed by western blotting with anti-RPA1, anti-FLAG, anti-HA and anti-RPA2. The data are representative of at least two independent experiments. (C) Input control for the FLAG IP presented in Fig. 3C: 7% of the total volume of the whole-cell extracts were analyzed by western blotting with anti-RPA1, anti-FLAG, anti-HA and anti-RPA2. The data are representative of two independent experiments.

### Figure S2

MEIOB or SPATA22 are recruited to DNA lesions induced by various chemical agents. (A) MEIOB or SPATA22 alone is not recruited to camptothecin-induced DNA lesions. HeLa cells were transiently transfected with MYC-FLAG-tagged MEIOB alone, or SPATA22 alone, or MYC-FLAG-tagged MEIOB and SPATA22. After induction of DNA damages with 1  $\mu$ M camptothecin exposure, the cells were permeabilized before fixation and immunostained for RPA2 and FLAG (MEIOB) or RPA2 and SPATA22. When expressed together, MEIOB and SPATA22 co-localize with RPA2 at the sites of DNA damage. When expressed alone, MEIOB and SPATA22 are hardly detectable and neither of them forms foci with RPA2 at DNA lesions. Images were analyzed by epi-fluorescence microscopy. (B) MEIOB is recruited to DNA lesions induced by etoposide after co-expression with SPATA22. HeLa cells were transiently co-transfected with MYC-FLAG-tagged MEIOB and SPATA22. After exposure to 250  $\mu$ M etoposide, the cells were permeabilized before fixation and immunostained for RPA subunits RPA1 and RPA2 and for FLAG (MEIOB). In the presence

of SPATA22, MEIOB forms foci that co-localize with etoposide-induced DNA lesions. Images correspond to a focal plane of confocal microscopy.

#### Figure S3

RAD51 and DMC1 co-immunostaining during prophase I progression in wild-type spermatocytes. (A) Chromosome spreads of representative spermatocytes nuclei from early zygotene to pachytene stages. Long DMC1 is not found in wild-type cells. (B) Quantification of the number of RAD51 and DMC1 foci for RAD51 and DMC1 alone (RAD51 and DMC1) or co-localized (RAD51/DMC1) in wild-type mice. Small square= RAD51 foci, large square= DMC1 foci, triangle= co-localized RAD51 and DMC1 foci. Leptotene (n=4); zygotene (n=26); pachytene (n=15); total mice analyzed (n=2). Error bars show the mean  $\pm$  SEM.

#### Figure S4

RAD51 and DMC1 co-immunostaining during prophase I progression in *Meiob*<sup>-/-</sup> spermatocytes. Chromosome spreads of representative spermatocytes nuclei from leptotene to zygotene-like stages. RAD51 (red), DMC1 (green) and SYCP3 (white). Arrowheads highlight long DMC1 foci emerging from zygotene and maintained during zygotene-like and pachytene-like stages in the absence of MEIOB.

#### Figure S5

BLM and DMC1 co-immunostaining during zygotene stage in WT and *Meiob*<sup>-/-</sup> spermatocytes. Chromosome spreads of representative spermatocytes nuclei are immunostained for BLM (green), DMC1 (red) and SYCP3 (blue). Upper panels: *Meiob*<sup>+/+</sup> shows numerous bright DMC1 foci on the chromosome axis in early (E-Zygotene) and late zygotene (L-Zygotene) with faint BLM foci not restricted to the chromosome axis. Lower panels: *Meiob*<sup>-/-</sup> shows numerous bright DMC1 foci in early zygotene (E-Zygotene) but a decreased number of DMC1 foci in the zygotene-like and pachytene-like stages. Bright BLM foci accumulate on the chromosome axis when the numbers of DMC1 foci are reduced in the zygotene-like and pachytene-like stages. To highlight the antagonistic behavior between DMC1 and BLM and rule out staining and acquisition bias, two cells corresponding to different stages are presented together and separated by white dotted lines.

Figure S6

BLM accumulates at the junction between non-homologous chromosomes in the absence of MEIOB. Chromosome spreads of representative spermatocyte nuclei are immunostained for BLM (red) and SYCP3 (green). In zygotene, BLM foci are not restricted to the chromosome axis in WT and accumulate on the chromosome axis in *Meiob*<sup>-/-</sup> spermatocytes. WT spermatocytes progress through the pachytene stage with fully synapsed chromosomes lacking BLM staining. In *Meiob*<sup>-/-</sup>, spermatocytes are arrested with unsynapsed chromosomes presenting numerous BLM foci on their axis. At the bottom is an enlarged view of the white box that indicates BLM accumulation at non homologous junctions.

Table S1

Antibody table

primary antibodies					
Target	Specie	Clone/ reference	Source	Dilution for IF	Dilution for IB
RPA2	Rat	4E4	Cell signaling	1:400	1:1000
RPA1	Rat	4D9	Cell signaling	-	1:1000
RPA1	Mouse	SAB1406399	Sigma-Aldrich	1:200	-
HA tag	Rabbit	Ab9110	Abcam	-	1:1000
FLAG tag	Mouse	M2	Sigma-Aldrich	1:400	-
FLAG tag	Chicken	Ab1170	Abcam	1:100	1:1000
SPATA22	Rabbit	16989-1-AP	Proteintech	1:400	1:1000
DMC1	Rabbit	SC-22768	Santa-Cruz	1:200	-
DMC1	Goat	SC-8973	Santa-Cruz	1:200	-
RAD51	Rabbit	PC130	Calbiochem	1:200	-
SYCP3	Mouse	ab7672	Abcam	1:500	-
SYCP3	Rabbit	NB300-232	Novus	1:500	-
BLM	Rabbit	NB100-214	Novus	1:200	-

Figure 1

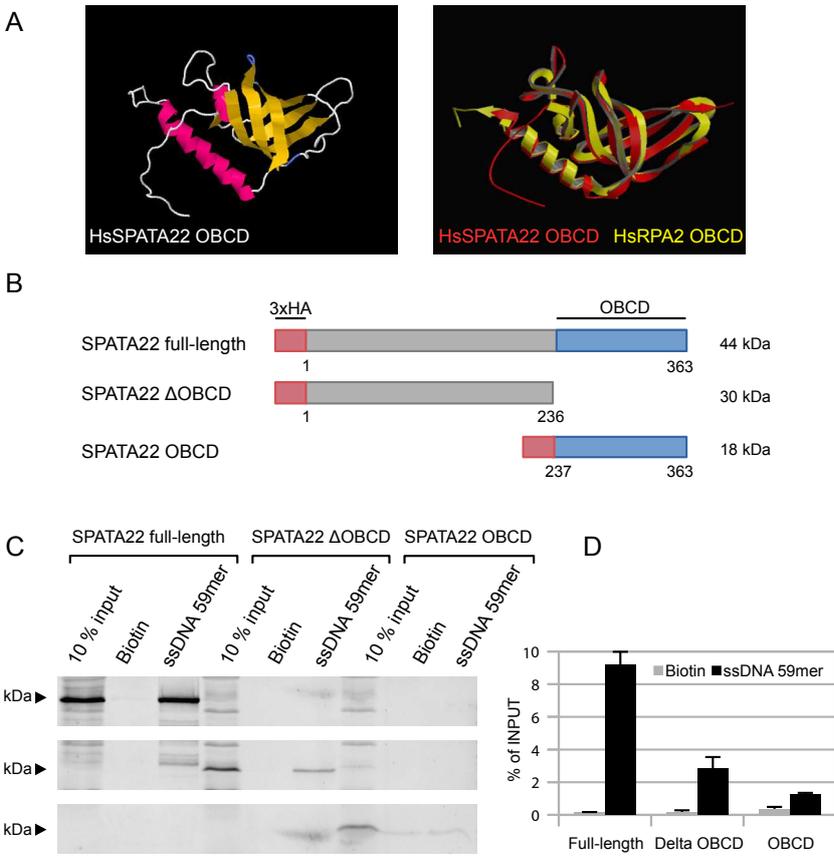


Figure 2

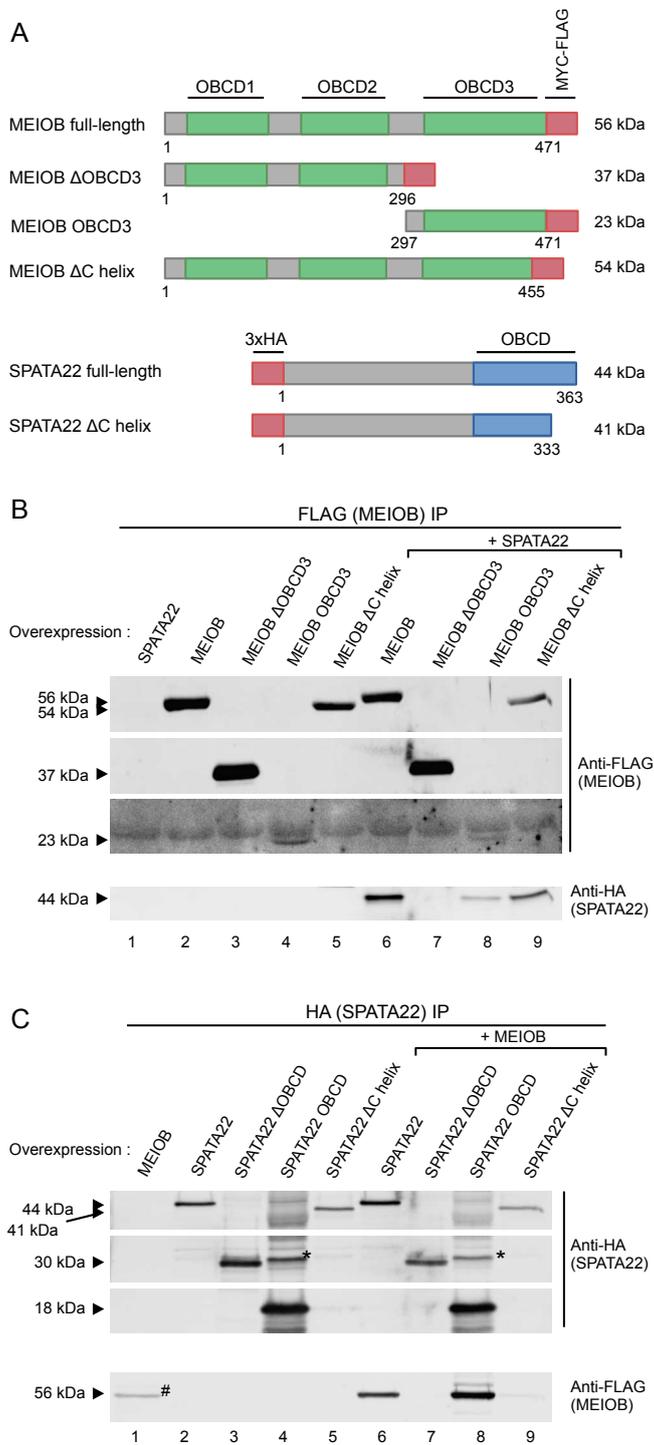


Figure 3

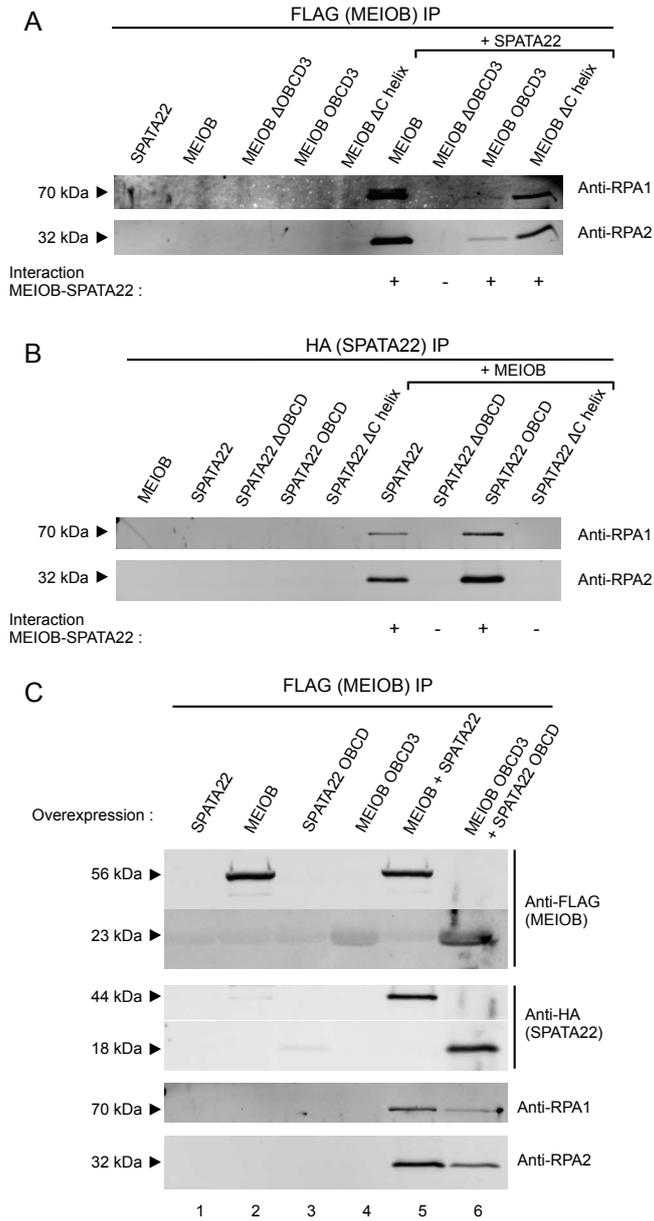


Figure 4

ssDNA ( $\Phi$  x virion) + RPA

ssDNA ( $\Phi$  x virion) + RPA + MEIOB/SPATA22

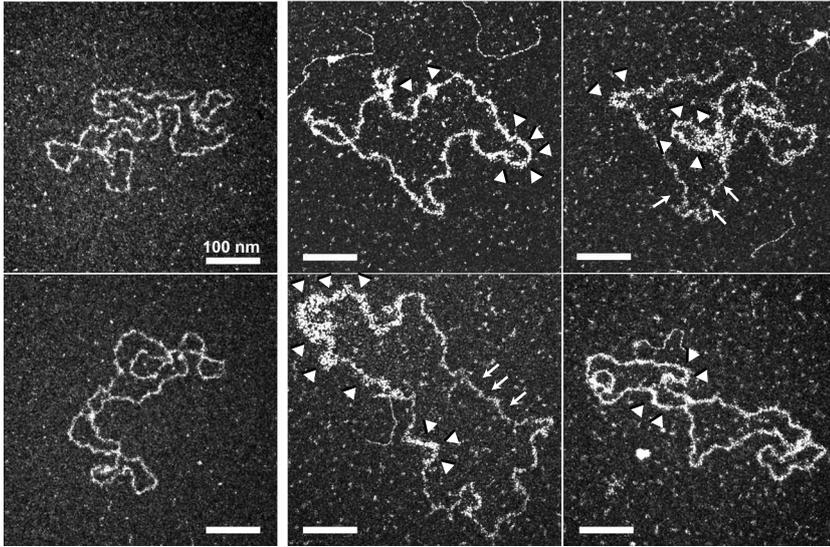


Figure 5

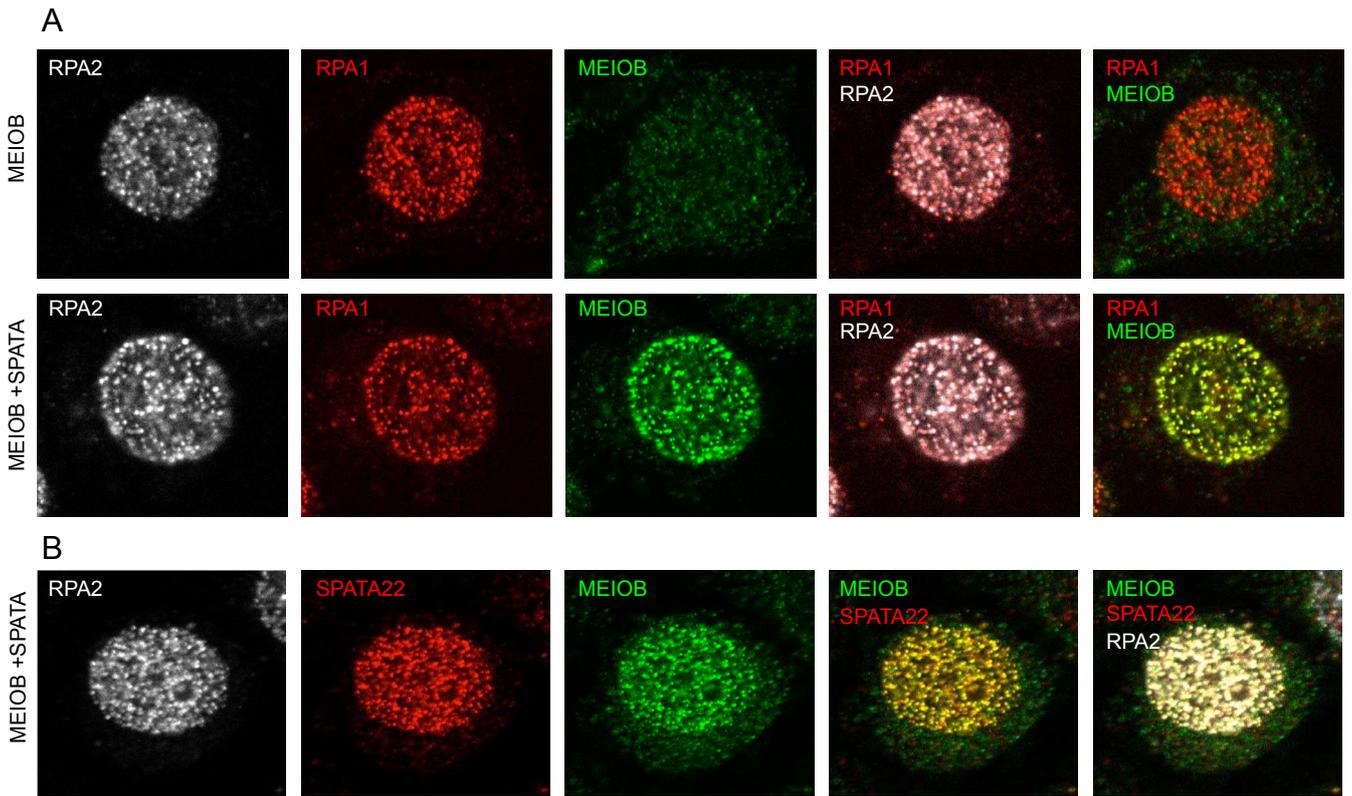


Figure 6

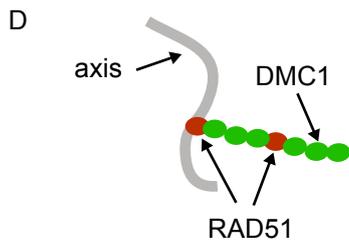
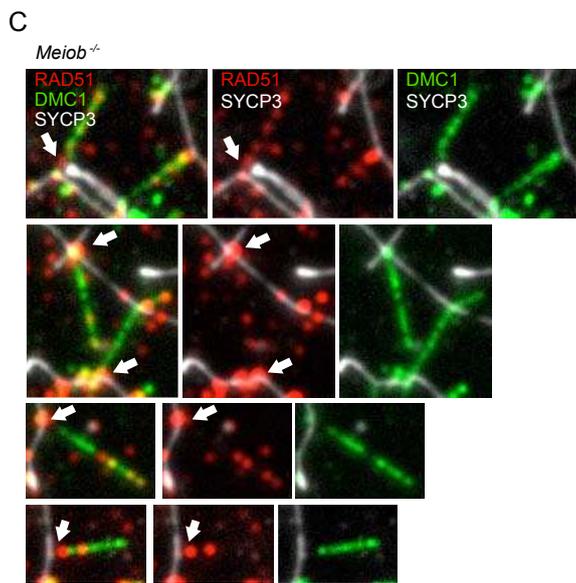
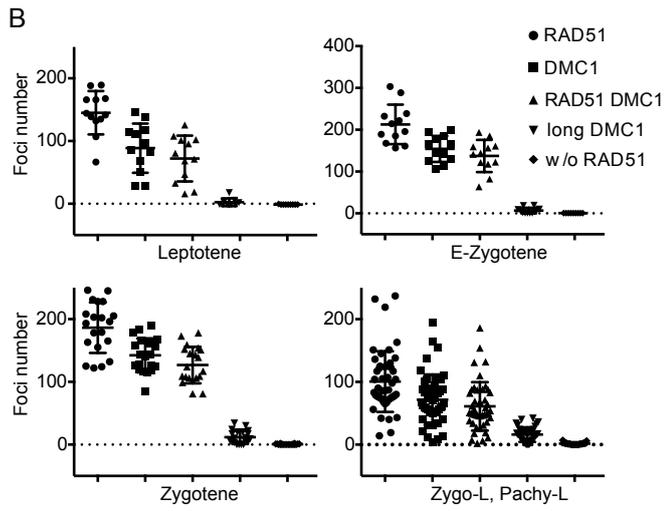
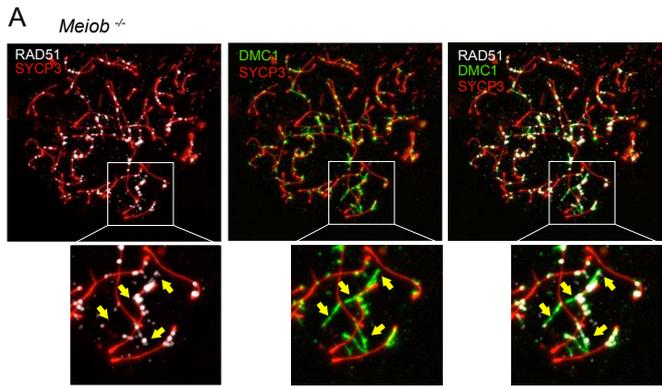
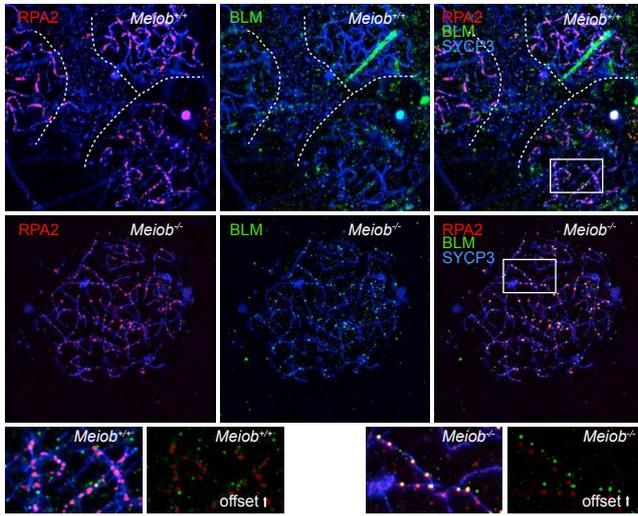
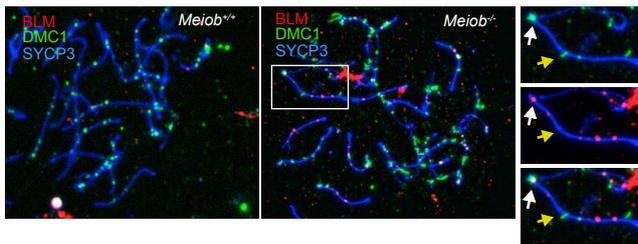


Figure 7

A



B



C

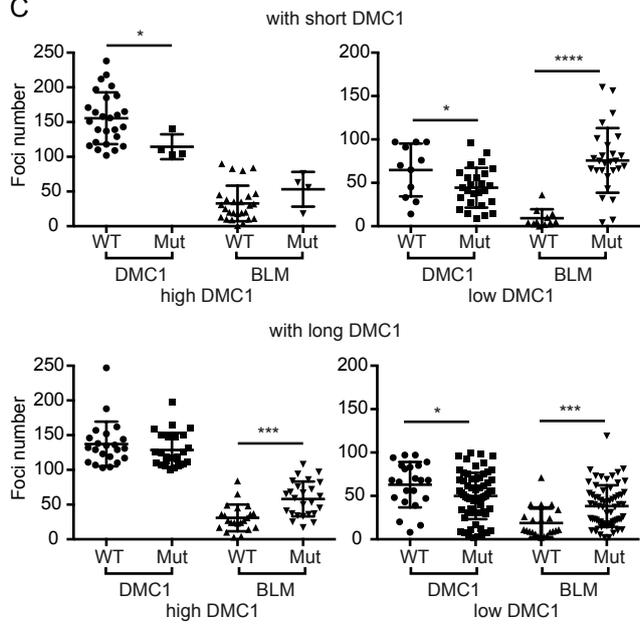


Figure 8

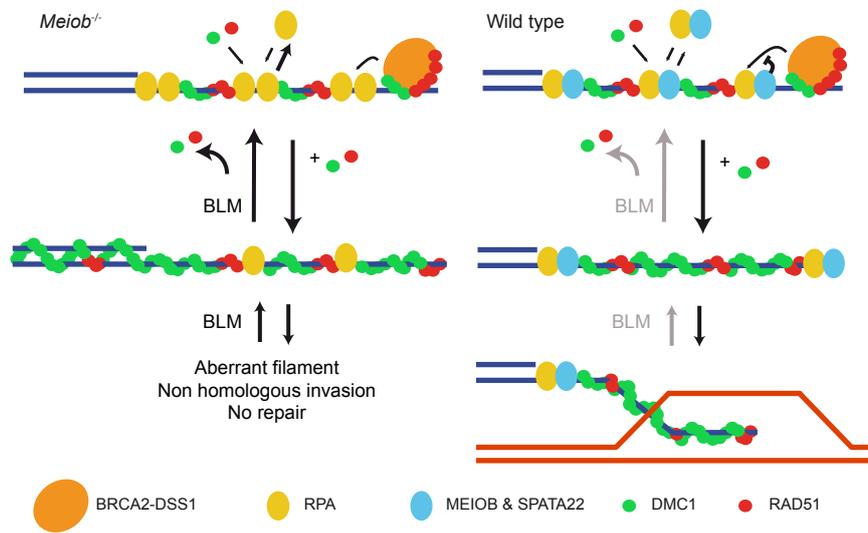


Figure S1

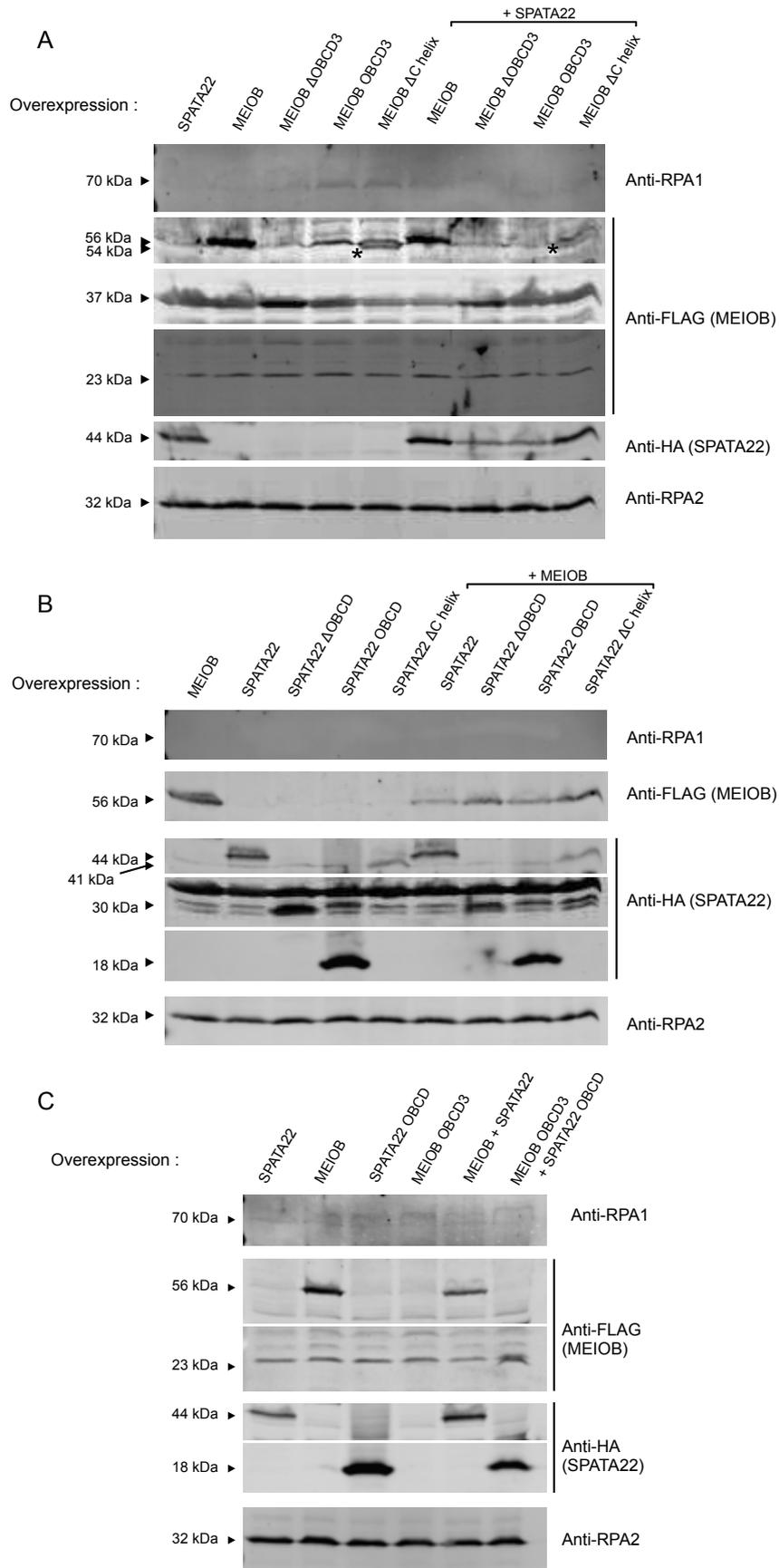
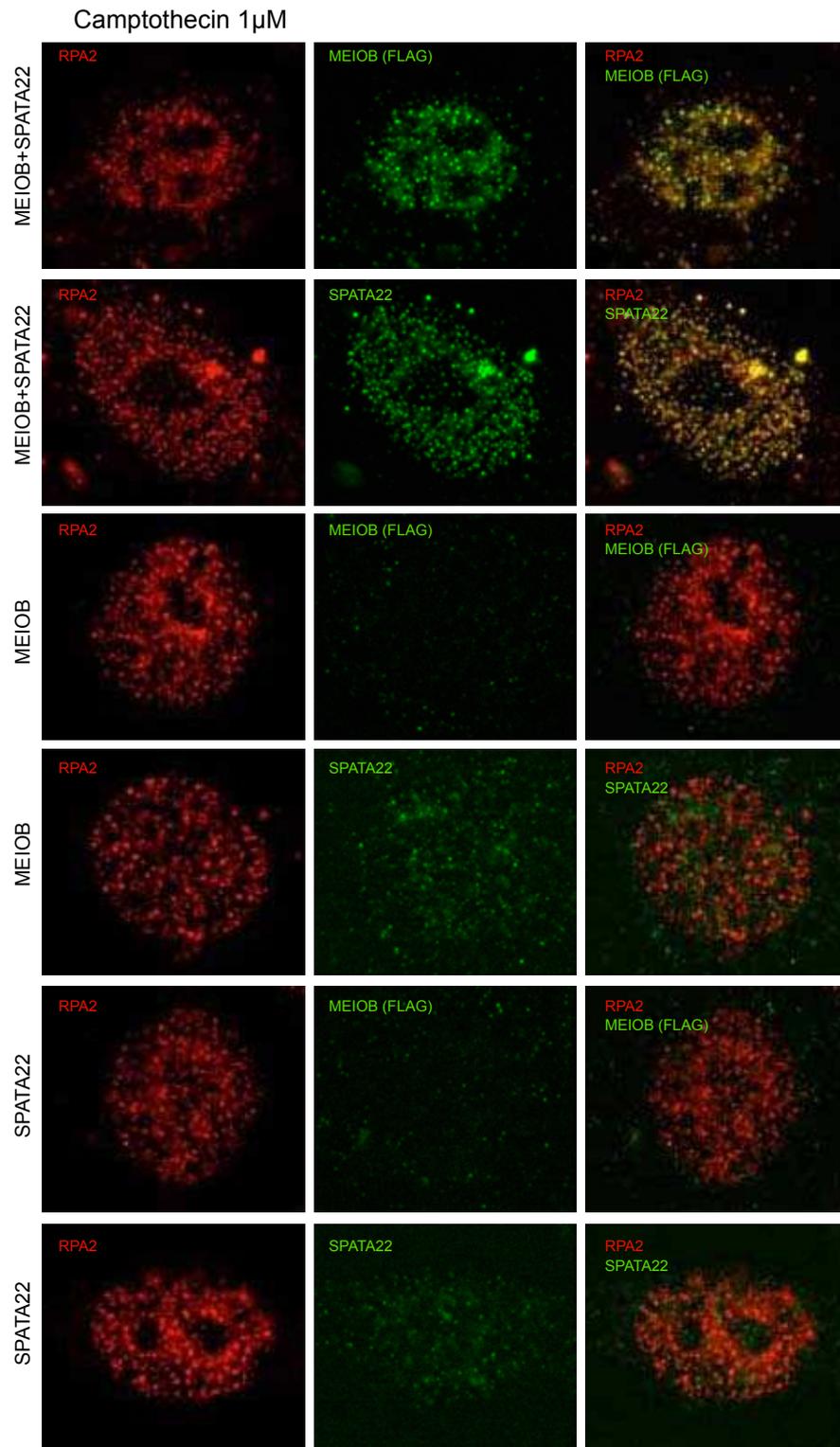


Figure S2

A



B

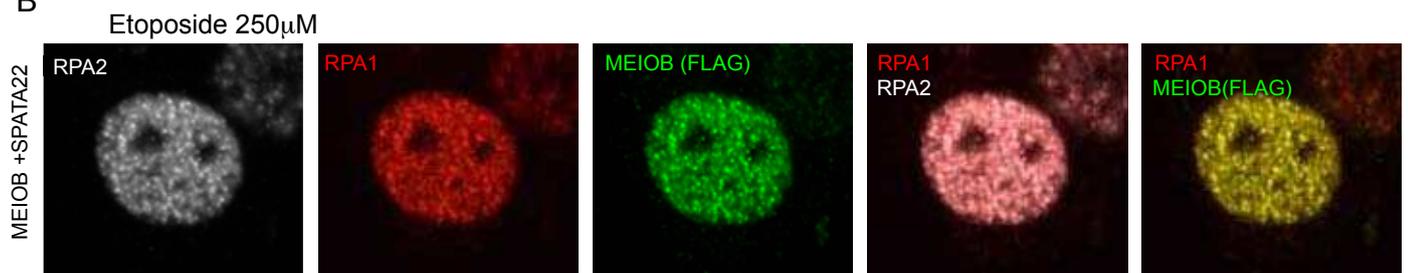
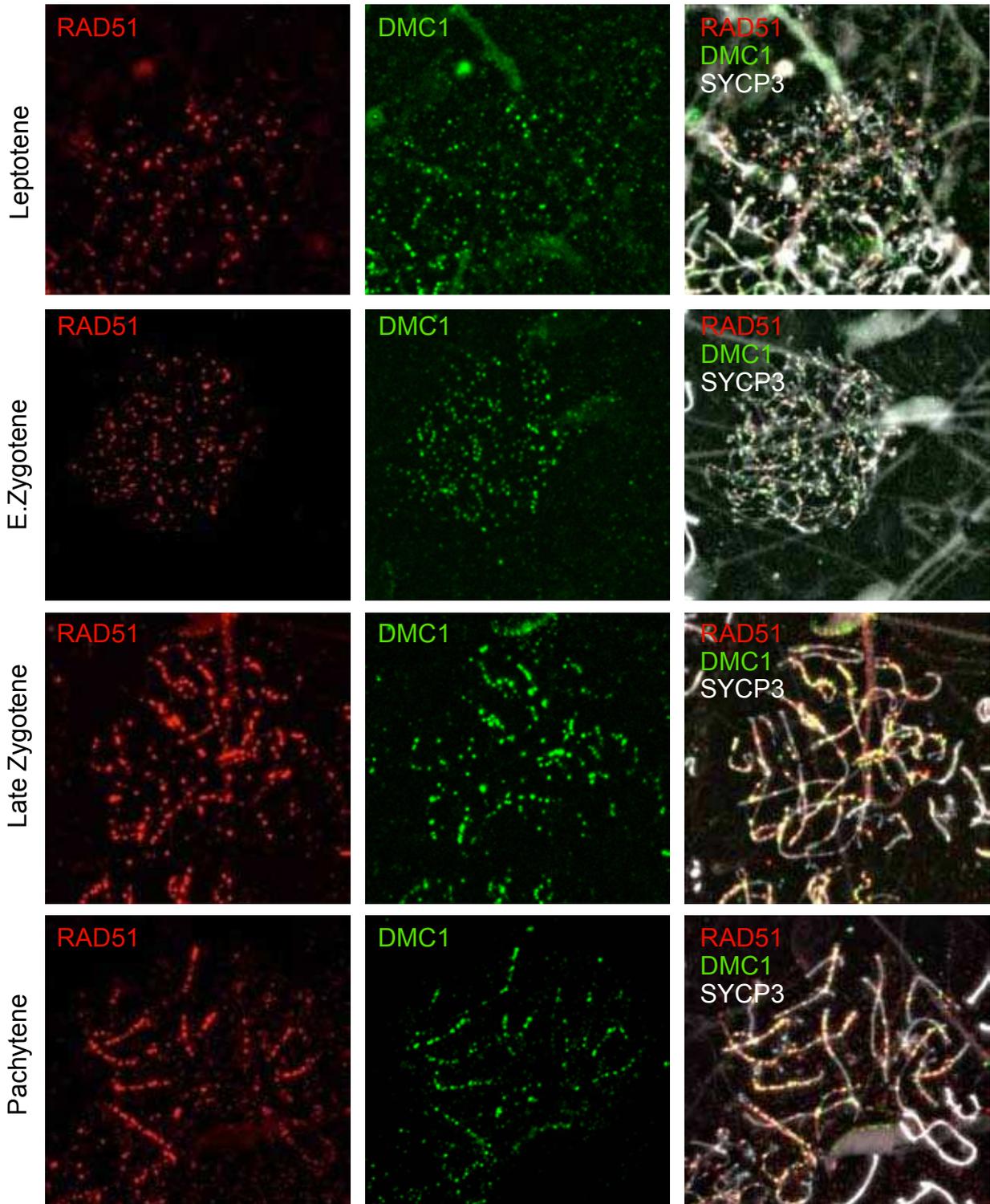


Figure S3

A

*Meiob*<sup>+/+</sup>



B

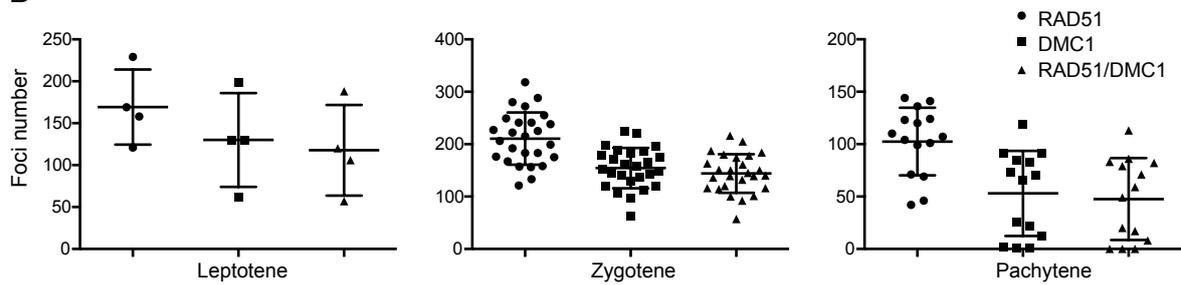


Figure S4

*Meiob*<sup>-/-</sup>

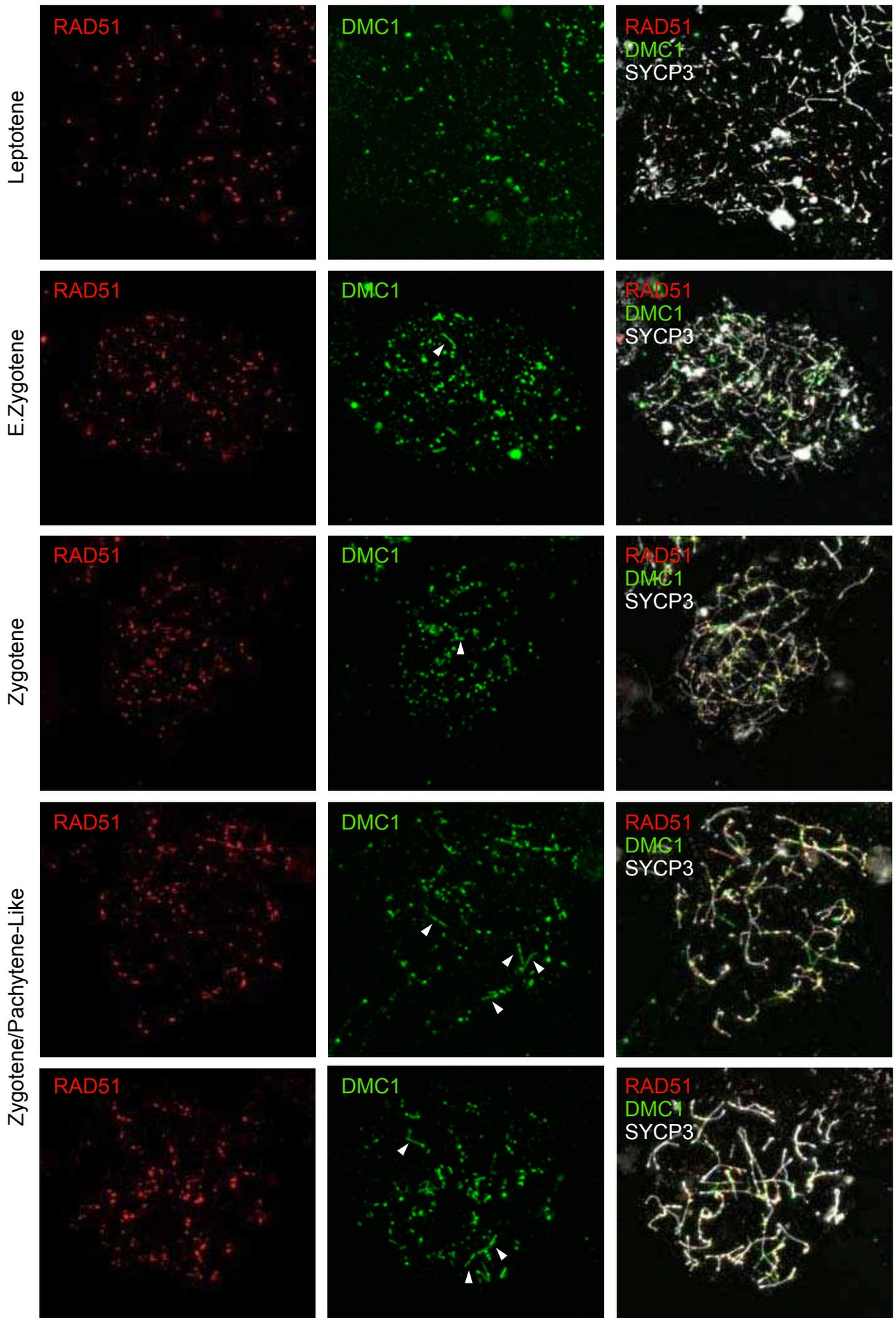
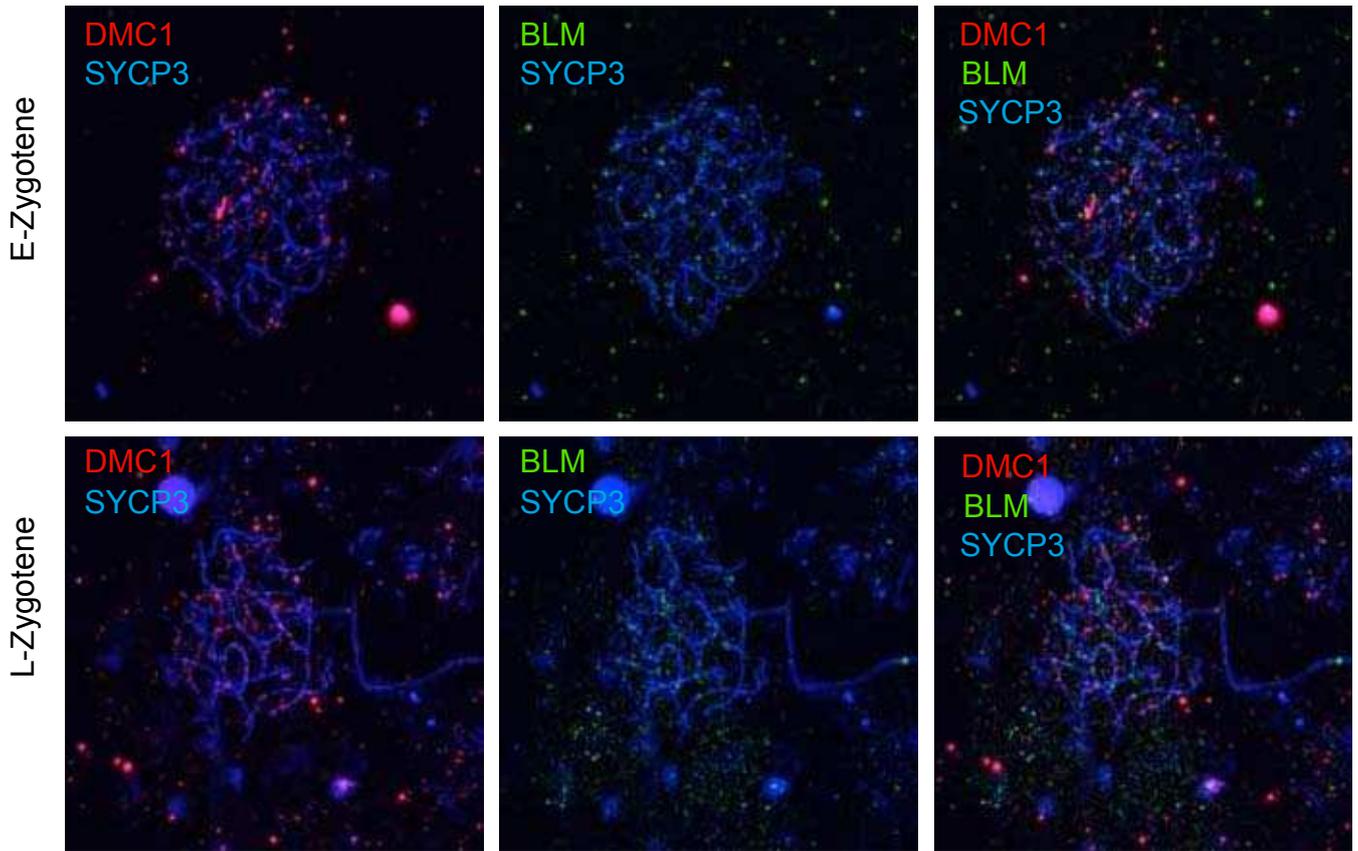


Figure S5

*Meiob*<sup>+/+</sup>



*Meiob*<sup>-/-</sup>

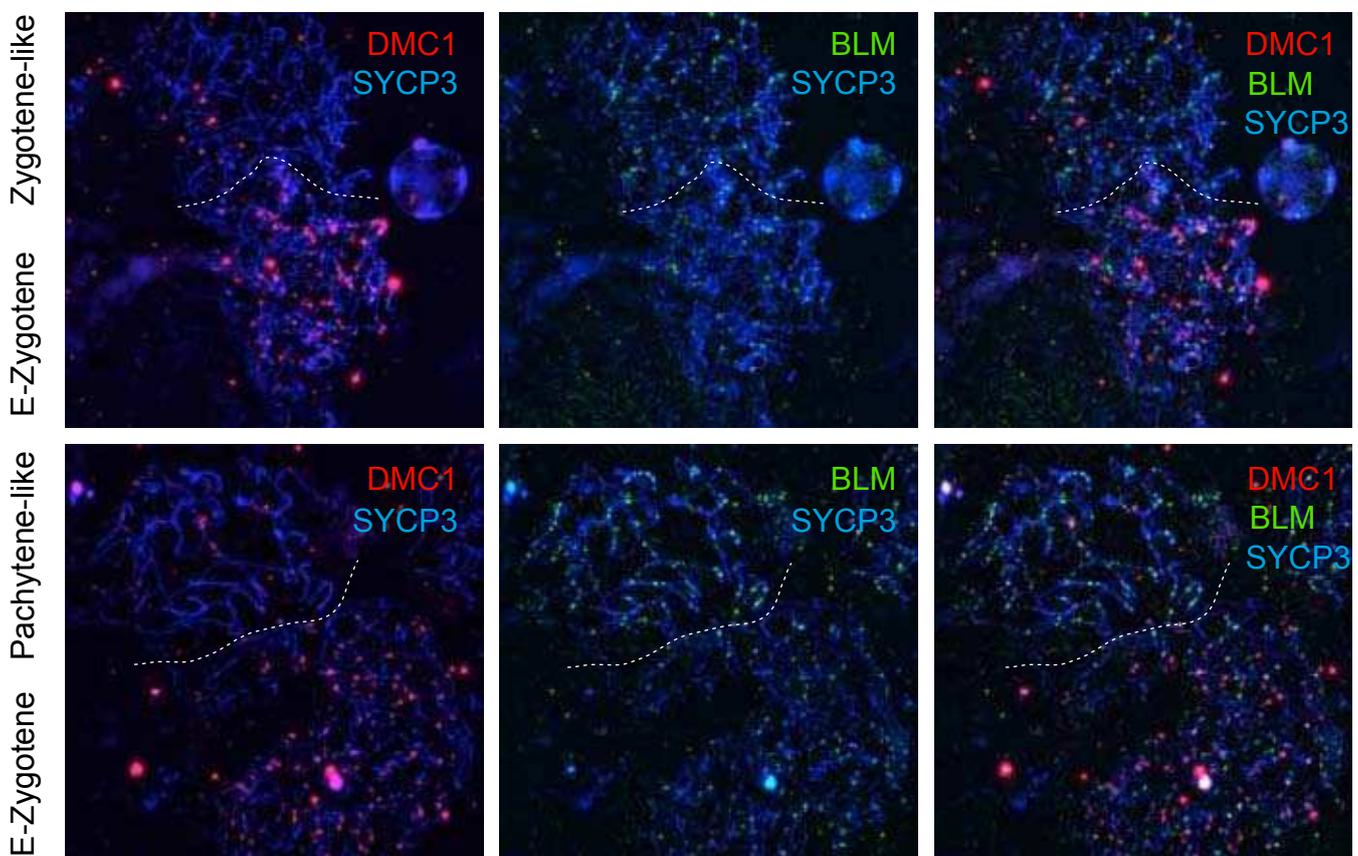
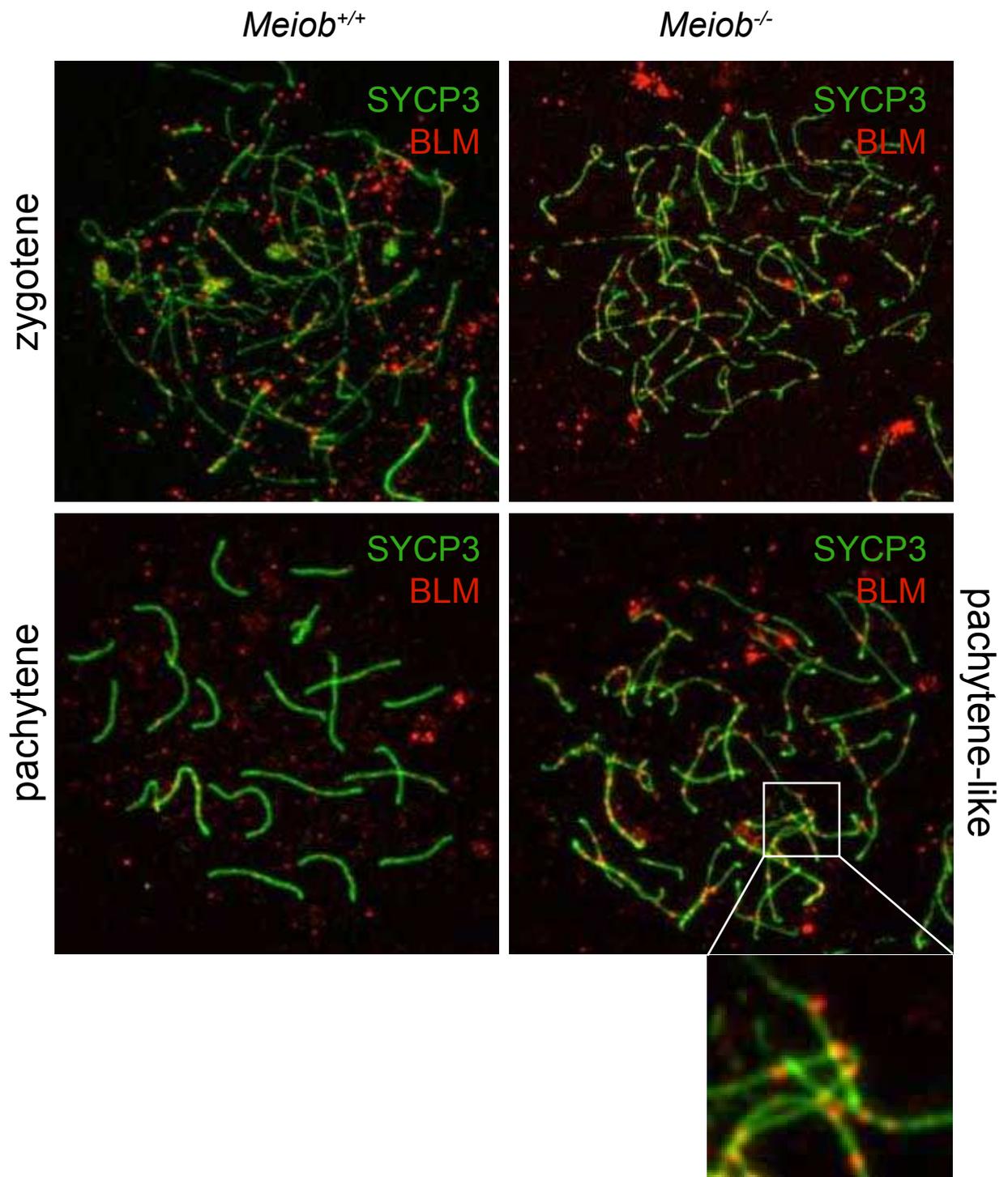
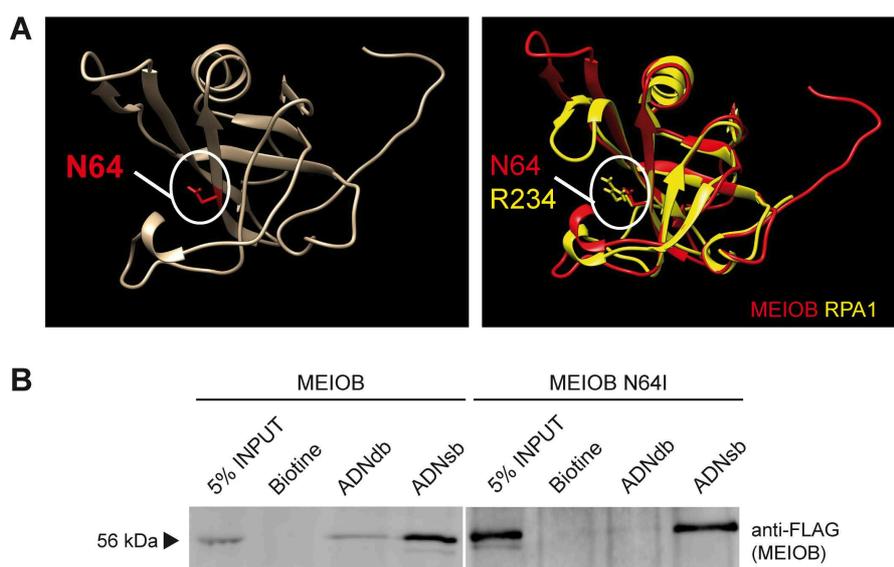


Figure S6



### III.7 Résultats complémentaires : la caractérisation préliminaire d'un mutant ponctuel de MEIOB associé à des cas d'azoospermies humaines

Une mutation de MEIOB a été associée à des cas d'azoospermies chez l'Homme (Gershoni et al., 2017). Cette mutation, N64I, est dans le premier domaine OB-fold de MEIOB. Elle est alors susceptible d'altérer la capacité de ce domaine de lier l'ADNsb. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons tenté dans un premier temps de connaître la potentielle localisation de cette mutation dans le domaine OB-fold. Nous avons constaté que cette mutation est située dans un sillon formé par le domaine (**Figure complémentaire 7A**). Ce sillon accueille l'ADNsb chez RPA1 et le résidu équivalent à N64 est R234 chez RPA1 (Bochkarev et al., 1997). Ce résidu est en contact avec l'ADNsb chez RPA1. Ces résultats pourraient suggérer que la mutation N64I pourrait affecter un résidu de MEIOB en contact avec l'ADNsb. Pour savoir si cette mutation abolit ou non l'interaction entre MEIOB et l'ADNsb, nous avons testé cette interaction par pull-down après production de protéines dans un système acellulaire. Ainsi, nous avons observé que la protéine mutante est toujours capable de lier l'ADNsb (**Figure complémentaire 7B**). Les conditions dans lesquelles nous avons testé cette interaction ne nous ont pas permis d'évaluer l'affinité de la protéine mutante pour l'ADNsb par rapport à la protéine sauvage. Par conséquent, il serait intéressant à l'avenir d'utiliser des conditions plus sensibles afin de déterminer l'affinité de cette protéine mutante par rapport à la protéine sauvage.



#### Figure complémentaire 7 : La mutation MEIOB N64I n'abolit pas la liaison à l'ADNsb de MEIOB

(A) Représentation en rubans du domaine OB-fold n°1 de MEIOB chez l'Homme. Image de gauche : le résidu N64 de MEIOB est dans le sillon du domaine OB-fold n°1. Image de droite : superposition du domaine OB-fold n°1 de MEIOB et de l'OBA de RPA1. Le résidu N64 est analogue à l'arginine 234 de RPA1 qui interagit avec l'ADNsb (Bochkarev et al., 1997) (Modèle de la structure de MEIOB obtenu grâce au serveur RaptorX (Källberg et al., 2012), la structure de RPA1 provient de (Bochkarev et al., 1997), référence Protein Data Bank 1JMC, visualisation et superposition des structures grâce au logiciel UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004)). (B) Pull-down de MEIOB et MEIOB N64I avec de l'ADNdb ou de l'ADNsb. MEIOB N64I est retenue par l'ADNsb.



# **Informations supplémentaires sur la méthodologie**



## Informations supplémentaires sur la méthodologie

### Génération du plasmide d'expression pour MEIOB N64I et production de la protéine recombinante

Le vecteur pCMV6-hMEIOB-MYC-FLAG a été modifié par mutagenèse dirigée pour introduire la mutation N64I et ainsi obtenir le vecteur pCMV6-hMEIOB N64I-MYC-FLAG. La mutation a été vérifiée par séquençage avant l'amplification du plasmide. Les protéines MEIOB et MEIOB N64I recombinantes ont été produites grâce au système de production acellulaire *TnT T7 Quick coupled Transcription/Translation System* (Promega) selon les recommandations du fabricant et grâce aux vecteurs pCMV6-hMEIOB-MYC-FLAG et pCMV6-hMEIOB N64I-MYC-FLAG.

### Pulldown de MEIOB N64I avec de l'ADNsb et de l'ADNdb

Les pulldowns exécutés avec les protéines MEIOB et MEIOB N64I suivent la même méthodologie expliquée dans l'article de recherche présenté dans cette thèse.

### Immunoprécipitation de MEIOB, en présence de bromure d'éthidium

Les cellules transfectées sont lysées avec un tampon de lyse (Cell lysis buffer, Cell Signaling) complété avec des inhibiteurs de protéases (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche) et du  $\beta$ -mercaptoethanol à 1mM. Cette lyse est suivie d'une sonication (10 minutes de cycles de 30 secondes ON/ 30 secondes OFF). L'extrait est ensuite clarifié par une centrifugation à 16,200 g pendant 10 minutes à 4°C. Les extraits sont ensuite dilués quatre fois dans le tampon d'immunoprécipitation (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 10 % glycérol, 1mM EDTA, 1mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 10mg/ml BSA et cocktail d'inhibiteurs de protéases, Roche) avec 50 $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium. Les extraits dilués sont incubés pendant 16 heures à 4°C avec 25 $\mu$ l de billes magnétiques anti-FLAG, clone M2 (Sigma-Aldrich). Les billes sont ensuite rincées trois fois avec le tampon de rinçage (le tampon d'immunoprécipitation avec 0,05 % de Tween 20). L'éluion des protéines précipitées est réalisée en incubant les billes avec 20 $\mu$ l de tampon Laemml. Ces billes sont bouillies à 95°C pendant 5 minutes avant de récupérer que le surnageant pour une analyse par Western blot.

Les extraits sont ensuite analysés par Western blot. Dans un premier temps, une électrophorèse est réalisée sous conditions dénaturantes et avec 12 % d'acrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, General Electric healthcare). La membrane est ensuite bloquée avec 5 % de lait en poudre dans du PBS-Tween 0,05 % (Phosphate Buffered Saline) puis incubée avec les anticorps primaires : anti-FLAG (Sigma-Aldrich, M2) dilué au 1/500<sup>e</sup>, anti-SPATA22 (Proteintech, 16989-1-AP) dilué au 1/1000<sup>e</sup>, anti-RPA1 (Cell signaling, 4D9) dilué au 1/1000<sup>e</sup> et anti-RPA2 (Cell signaling, 4E4) dilué au 1/1000<sup>e</sup>. La membrane est rincée avec du PBS-Tween 0,05 % puis incubée avec les secondaires appropriés couplés à un fluorochrome Alexa488. La membrane est ensuite analysée grâce à l'imageur Typhoon 9400 (Amersham Biosciences).

## Retards sur gels

Un oligonucléotide de 400pb couplé à une cyanine 5 (Cy5) à son extrémité 5' phosphate (2,5  $\mu$ M nucleotides) a été incubé pendant 3 minutes à 37°C, seul ou avec 0,25  $\mu$ M de RPA humain dans 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl. Ensuite, différentes quantités de GST-MEIOB/His-SPATA22 (0.03, 0.06, 0.2 and 0.24  $\mu$ M) ont été ajoutées aux réactions. Les réactions ont ensuite été incubées pendant 7 minutes à 37°C. Les complexes ADN-protéines ont été fixés avec l'ajout de 0,01% glycéraldéhyde final. Les produits de réaction ont ensuite été analysés par électrophorèse, dans 0,7 % d'agarose, à 4°C. Puis les images ont été acquises en utilisant un imageur Typhoon (Amersham Biosciences). Les western blots ont été réalisés selon un protocole précédemment décrit. Brièvement, les gels d'agarose ont été incubés deux fois avec un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 0,2 M glycine, 0,015% SDS) pendant 20 minutes. Les protéines ont été ensuite transférées sur une membrane de PVDF avec un dispositif de transfert semi-sec (Biorad) en appliquant 0,8 mA/cm<sup>2</sup> pendant 1 h 15 mins. Les membranes ont été bloquées puis elles ont été incubées avec les anticorps primaires (anti-RPA1, Sigma-Aldrich, SAB1406399, 1/1000; anti-MEIOB, Abcam, Ab178756, 1/1000; anti-SPATA22, Proteintech, 16989-1-AP, 1/1000) et les secondaires couplés à un fluorochrome ou à une peroxidase.

## Imagerie par illumination structurée (ou *Structured Illumination Microscopy*, SIM)

Les images analysées par SIM sont acquises et analysées comme suit : les protéines sont immunomarquées en suivant un protocole standard et révélées grâce à des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes Alexa. Les lames sont montées ensuite avec un milieu de montage immunogold. Les images sont acquises grâce à un microscope Elyra PS.1 de Zeiss et grâce à une caméra iXon 885 d'Andor. Les acquisitions sont finalement analysées avec le logiciel ZEN de Zeiss.

# **Discussion**



## Discussion

Ces travaux de thèse avaient pour but principal d'élucider le rôle de MEIOB et de son partenaire SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique. Ce travail a été possible grâce à l'expertise et aux efforts conjoints de notre équipe, de la plateforme CIGEx, du Dr. Pauline Dupaigne, du Dr. Raphaël Guerois et de la plateforme d'imagerie photonique de l'Institut Jacques Monod. Les données originales générées par ces travaux serviront de bases pour mieux comprendre, à l'avenir, le rôle de ces protéines que nous allons maintenant discuter. Nous allons également mettre à profit cette discussion pour confronter certains de nos résultats avec ceux publiés récemment par nos confrères et pour proposer plusieurs rôles de MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique ainsi que des expériences à mener pour tester ces potentiels rôles.

### I. SPATA22 lie l'ADNsb

Dans l'optique de caractériser une activité biochimique de SPATA22, nous avons testé une potentielle activité de liaison à l'ADNsb de SPATA22. Ainsi, nos résultats suggèrent que SPATA22 pourrait lier spécifiquement l'ADNsb. Cependant, comme mentionné précédemment, dans le test que nous avons employé, la liaison de SPATA22 à l'ADNsb pourrait être indirecte à cause d'un éventuel facteur tiers présent dans le système acellulaire. Une meilleure approche serait de purifier SPATA22 et de tester sa capacité à lier l'ADNsb par retard sur gel. Cependant, nos précédents essais de purification de SPATA22 avaient révélé que la protéine est insoluble quand exprimée seule. La production acellulaire s'est alors révélée être la meilleure approche à ce jour.

Le fait que SPATA22 pourrait lier l'ADNsb a soulevé la question de l'identité du domaine de SPATA22 qui porte cette activité. Nous avons observé que la partie N-terminale de SPATA22 pourrait lier l'ADNsb. Cette partie ne présente aucun domaine connu et semble être désordonnée. Il est intéressant de noter que yHed1 est une protéine désordonnée également capable de lier l'ADNsb (Busygina et al., 2008). La partie N-terminale de SPATA22 pourrait lier l'ADNsb selon un mécanisme similaire à celui employé par yHed1. Ensuite, nous avons observé que le domaine OB-fold putatif de SPATA22 présente aussi une activité de liaison à l'ADNsb mais cette activité semble très faible. Ce résultat peut sembler surprenant pour un domaine OB-fold, défini originellement comme un domaine capable de lier les oligonucléotides (Murzin, 1993). Cependant, cette observation n'est pas unique. Par exemple, d'autres protéines avec des domaines OB-folds comme RPA3, RMI1 et RMI2 semblent être incapables de lier l'ADNsb (Fan and Pavletich, 2012; Xu et al., 2008). Il n'est alors pas aberrant d'observer que le domaine OB-fold de SPATA22 ait une faible activité de liaison à l'ADNsb. Cependant, le fait que la protéine soit produite dans un système acellulaire n'est pas à omettre. Le domaine OB-fold de SPATA22 pourrait être mal replié dans ce contexte et montrer ainsi une faible activité.

## II. MEIOB et SPATA22 forment un complexe qui partage des similitudes structurales avec RPA et collaborent pour interagir avec RPA

La caractérisation moléculaire de SPATA22 a permis de mettre en évidence la présence d'un domaine OB-fold dans la protéine. Nous avons cherché à déterminer le domaine de SPATA22 responsable de l'interaction avec MEIOB afin de décrire les modalités d'interactions entre SPATA22 et MEIOB. Nous avons basé notre approche sur les similitudes qui existent entre MEIOB, SPATA22, RPA1 et RPA2 et nous avons observé que MEIOB et SPATA22 interagissent ensemble via leur domaines OB-folds C-terminaux, comme les sous-unités de RPA. Cependant, ces deux complexes diffèrent par leur nombre de sous-unités, RPA étant un trimère et MEIOB-SPATA22 un potentiel dimère. La formation d'un complexe comme RPA avec trois sous-unités n'engage probablement pas les mêmes résidus que la formation d'un dimère, même si les domaines impliqués sont similaires. Cette différence laisse alors suggérer que les modalités d'interactions, à l'échelle des acides aminés, pourraient être différentes entre ces deux complexes. Une seconde éventualité serait que MEIOB et SPATA22 ne formeraient pas un dimère mais plutôt un trimère, comme RPA. Ce trimère pourrait être composé de (1) deux protéines MEIOB et une protéine SPATA22 ou (2) deux SPATA22 et une MEIOB. Enfin, (3) MEIOB et SPATA22 pourraient être accompagnées par une sous-unité du complexe RPA pour former un trimère, hypothèse que nous ne pouvons pas exclure. La détermination de la structure du complexe MEIOB-SPATA22 par cristallographie pourrait permettre à l'avenir de savoir (1) quels sont les résidus des domaines OB-folds C-terminaux de MEIOB et SPATA22 impliqués dans la formation du complexe et (2) si le complexe est un trimère ou un dimère.

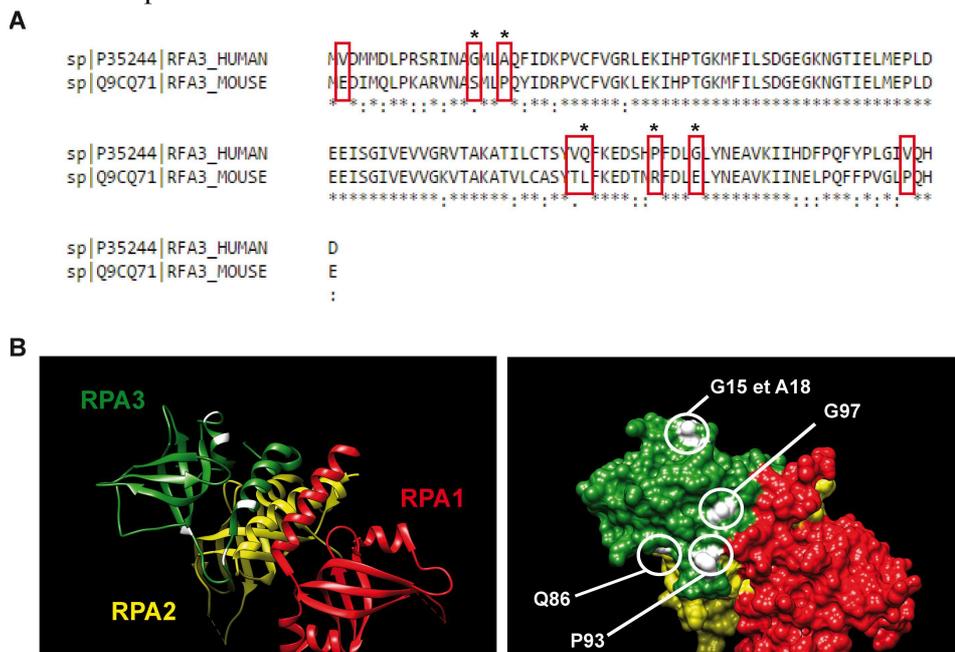
Etant donné le fait que MEIOB puisse interagir avec RPA2 (Luo et al., 2013), nous avons testé si MEIOB interagit avec une sous-unité seule de RPA, RPA2, ou avec le complexe RPA. Nous avons observé que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec RPA. Cependant, nos résultats ne permettent pas de savoir quelle sous-unité de RPA est ciblée par cette collaboration entre MEIOB et SPATA22. En revanche, l'équipe du Dr. J.P. Wang a très récemment montré que les deux protéines collaborent pour interagir avec RPA3 (Xu et al., 2017). Ce résultat suggère alors que l'interaction que nous observons pourrait cibler RPA3. Il serait intéressant à l'avenir de co-surexprimer les domaines OB-folds C-terminaux de MEIOB et SPATA22 avec RPA3 pour confirmer que le complexe minimum MEIOB-SPATA22 cible bien RPA3. Nos confrères ont observé que les protéines MEIOB et SPATA22 murines n'interagissent pas avec le complexe RPA humain endogène (Xu et al., 2017). Par conséquent, pour étudier une interaction entre MEIOB, SPATA22 et RPA3 sans que le complexe RPA endogène ne puisse interférer avec ces interactions, il sera nécessaire de mener cette expérience avec des protéines humaines sur-exprimées dans des cellules murines.

Le modèle d'étude des interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA3 décrit ci-dessus pourrait s'avérer utile à l'avenir pour mettre en place un mutant de RPA3 ou SPATA22 ou MEIOB déficient pour l'interaction entre RPA et MEIOB-SPATA22. Un tel mutant pourra être utilisé afin d'explorer le rôle de cette interaction *in vitro* puis *in vivo*. Nous pourrions « muriniser » la protéine RPA3 humaine, ou humaniser son homologue murin, pour obtenir un mutant déficient pour l'interaction avec MEIOB-SPATA22. Les protéines RPA3 humaine et murine présentent huit résidus peu ou non similaires (**Figure 20A**). Cinq de ces résidus ne semblent pas être masqués par la formation du trimère et ne semblent donc pas être nécessaires à la formation du complexe RPA (**Figure 20B**). Ces résidus pourraient alors être de potentielles cibles pour obtenir un mutant de RPA3 déficient pour l'interaction avec MEIOB-SPATA22 car ils minimiseraient

l'impact d'une mutation de RPA3 sur la formation du trimère RPA tout en affectant l'interaction avec MEIOB-SPATA22.

L'équipe dirigée par le Dr J.P. Wang a observé que mMEIOB (« m » pour murin) et mRPA1 peuvent interagir entre elles ainsi que mSPATA22 et mRPA2 ou mRPA1, lorsque les protéines sont co-surexprimées (Xu et al., 2017). Nous avons cependant observé que MEIOB et SPATA22 doivent collaborer pour interagir avec le complexe RPA. Comment expliquer les différences entre nos résultats? Nous avons étudié une interaction entre hMEIOB-hSPATA22 (« h » pour humain) et un complexe hRPA endogène, déjà formé. Nos confrères ont co-surexprimé mMEIOB ou mSPATA22 avec un membre isolé de mRPA. Si une interaction entre MEIOB ou SPATA22 et un membre de RPA est faible, une approche en co-surexpression permet peut-être de révéler cette interaction plus facilement. Cependant, RPA est essentiellement purifiable sous la forme d'un trimère et chaque sous-unité exprimée seule est insoluble *in vitro* (Henricksen et al., 1994). Ces résultats suggèrent que le trimère est l'unité fonctionnelle et pertinente du complexe RPA. L'interaction de MEIOB ou SPATA22 avec une sous-unité isolée de RPA n'est alors peut-être pas le reflet de l'interaction physiologique de ces protéines avec le complexe RPA. Pour réconcilier les données de notre équipe et de celle du Dr. J.P. Wang nous proposons le modèle suivant : les complexes MEIOB-SPATA22 et RPA se forment indépendamment dans un premier temps. Ensuite, ces complexes interagissent via plusieurs points de contact entre MEIOB, SPATA22 et les sous-unités de RPA. Ces différents points de contacts correspondent peut-être aux interactions entre les sous-unités de RPA seules et MEIOB et SPATA22 seules observées par nos confrères. La synergie entre ces différents contacts permet l'interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA. La nécessité d'une telle synergie pour interagir avec RPA pourrait expliquer pourquoi nous n'observons pas MEIOB ou SPATA22 interagir seules avec le complexe RPA endogène.

Enfin, les approches menées par notre équipe et nos confrères pour étudier les interactions entre MEIOB-SPATA22 et RPA ne permettent pas de savoir si l'interaction entre ces protéines est directe ou non. Nous avons co-purifié MEIOB et SPATA22. Nous pourrions à l'avenir incuber ce complexe avec le complexe RPA humain purifié et immunoprécipiter RPA ou MEIOB ou SPATA22 pour déterminer si l'interaction entre ces protéines est directe ou non.



**Figure 20 : Les potentiels résidus de RPA3 impliqués dans l'interaction avec MEIOB-SPATA22**

(A) Alignement des séquences peptidiques de RPA3 humaine (référence Uniprot P35244) et RPA3 murine (référence Uniprot Q9CQ71), alignement réalisé avec ClustalOmega (Sievers et al., 2014)). Les résidus encadrés sont divergents

Suite de la légende dans la page suivante

entre la séquence humaine et son homologue murin. Les étoiles indiquent les résidus résolus par cristallographie et exposés au solvant. (B) Image de gauche : représentation en rubans des domaines de RPA humain nécessaires à la formation du trimère. Image de droite : représentation des surfaces de ces domaines. Les résidus en blanc sont les résidus de RPA3 humaine exposés au solvant et divergeant entre les séquences humaine et murine (modèle provenant de (Bochkareva et al., 2002), référence Protein Data Bank 1L1O et visualisé grâce au logiciel USCF Chimera (Pettersen et al., 2004)).

### III. MEIOB et SPATA22 collaborent pour être recrutées aux dommages à l'ADN

Nous avons observé que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec RPA. Etant donné le fait que RPA soit un acteur majeur de la réparation de l'ADN, cette interaction pourrait contribuer au recrutement de MEIOB-SPATA22 aux dommages à l'ADN. Nous avons donc suivi le recrutement de ces protéines à ces dommages. Nous avons ainsi observé que MEIOB et SPATA22 collaborent pour être recrutées à des dommages associés à RPA dans des cellules mitotiques. Puisque MEIOB et SPATA22 collaborent aussi pour interagir avec RPA, ces résultats pourraient laisser suggérer que l'interaction avec RPA pourrait contribuer au recrutement de MEIOB-SPATA22 aux dommages à l'ADN. Cependant, Xu et al. ont sur-exprimé des protéines murines, incapables de lier RPA humain endogène, dans des cellules humaines (Xu et al., 2017). Ils ont pourtant observé que les protéines MEIOB et SPATA22 murines co-exprimées sont capables d'être recrutées à une CDB de l'ADN dans une cellule humaine. Ce résultat suggère que l'interaction avec RPA est dispensable pour le recrutement de MEIOB-SPATA22 à une CDB de l'ADN.

Comment la collaboration entre MEIOB et SPATA22 pourrait permettre leur recrutement à une CDB ? MEIOB est capable de lier l'ADNsb et nous avons montré que SPATA22 présente aussi cette activité *in vitro*. Leur interaction pourrait permettre la formation d'un complexe avec une affinité pour l'ADNsb plus forte que celle des deux protéines seules. Ce complexe aurait une affinité suffisante pour entrer efficacement en compétition avec d'autres protéines pour l'ADNsb. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi le recrutement aux dommages à l'ADN de ces deux protéines est interdépendant (Hays et al., 2017; Luo et al., 2013; Xu et al., 2017). Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions mettre en place un mutant de MEIOB ou SPATA22 déficient pour son interaction avec l'ADNsb. Nous pourrions ensuite tester le recrutement aux dommages à l'ADN de cette protéine mutante avec son partenaire sauvage. Cependant, nous n'excluons pas que l'interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA pourrait favoriser le recrutement de MEIOB-SPATA22 à l'ADNsb *in vivo*, en complément de la capacité de MEIOB-SPATA22 de lier l'ADNsb.

### IV. Les rôles potentiels de MEIOB-SPATA22 et de leur interaction avec RPA

Nous avons dans un premier temps étudié les modalités d'interactions entre MEIOB, SPATA22 et RPA. Ces approches nous ont permis d'envisager une collaboration entre MEIOB, SPATA22 et RPA pour leurs interactions et leur recrutement à des dommages. Cependant, ces approches ne nous informaient pas sur le rôle éventuel de ces interactions au cours de la progression de la recombinaison méiotique. Nous avons alors étudié le rôle de MEIOB-SPATA22 *in vivo*. De manière très intéressante, nous avons pu observer lors de notre étude *in vivo* du rôle de MEIOB au cours de la recombinaison méiotique, que des foyers DMC1 filiformes peuvent se former en absence de MEIOB. Pour expliquer ce phénomène, nous proposons deux hypothèses. La première suggère une collaboration entre MEIOB-SPATA22 et RPA dans la régulation de la

polymérisation de DMC1 tandis que la seconde hypothèse suggère que MEIOB ne régule pas directement la polymérisation de DMC1 mais que cette polymérisation étendue de DMC1 est une conséquence indirecte de l'absence de MEIOB. Ces deux hypothèses ainsi que les raisons qui nous ont conduites à la proposition de ces hypothèses sont expliquées dans les deux paragraphes suivants.

- Un rôle de MEIOB-SPATA22 dans la régulation de la polymérisation de DMC1

La première hypothèse nous a été suggérée suite à la caractérisation biochimique du complexe MEIOB-SPATA22. Nous avons observé dans cette étude que le complexe MEIOB-SPATA22 peut être associé à un filament RPA-ADNsb et que MEIOB-SPATA22 peut condenser ce filament. Ces résultats suggèrent que MEIOB-SPATA22 pourrait interagir avec le filament RPA pour modifier sa structure. Pour vérifier que cette condensation du filament RPA-ADNsb est bien due à une interaction avec MEIOB-SPATA22, un mutant de RPA ou de MEIOB-SPATA22 déficient pour cette interaction sera nécessaire à l'avenir.

Ces résultats soulèvent la question du rôle de la condensation du filament RPA-ADNsb par MEIOB-SPATA22. Au cours de la recombinaison homologue, les recombinases doivent déplacer RPA pour se charger sur l'ADNsb. Le changement de conformation du filament RPA-ADNsb en présence MEIOB-SPATA22 pourrait constituer une barrière stringente pour le chargement des recombinases (**Figure 21A**). Ainsi, RPA et MEIOB-SPATA22 pourraient réguler la polymérisation des recombinases au cours de la recombinaison homologue méiotique. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi DMC1 présente une polymérisation étendue en absence de MEIOB dans les spermatocytes murins. Pour vérifier si MEIOB-SPATA22 peut réguler la polymérisation des recombinases en interagissant avec RPA, nous pourrions suivre la polymérisation, *in vitro*, de DMC1 sur un filament d'ADNsb saturé par RPA et MEIOB-SPATA22. Cette polymérisation pourra être suivie par microscopie électronique.

Nous avons observé que DMC1 forme des foyers filiformes sur les chromosomes méiotiques en absence de MEIOB. De manière intéressante, l'absence de RAD54 chez la souris induit la formation de foyers RAD51 filiformes sur les chromosomes méiotiques (Wesoly et al., 2006). Ces foyers semblent être similaires à ceux que nous avons observé pour DMC1 en absence de MEIOB. L'anticorps anti-RAD51 utilisé dans cette étude est dirigé contre toute la protéine RAD51. Cependant, RAD51 et DMC1 partagent une grande identité de séquence (52 % d'identité entre les deux protéines humaines). Cet anticorps n'est alors probablement pas spécifique de RAD51. Il est donc possible que la polymérisation de DMC1 soit dérégulée en absence de RAD54, comme en absence de MEIOB. MEIOB-SPATA22 et RAD54 semblent alors être impliquées dans la régulation de la polymérisation de DMC1.

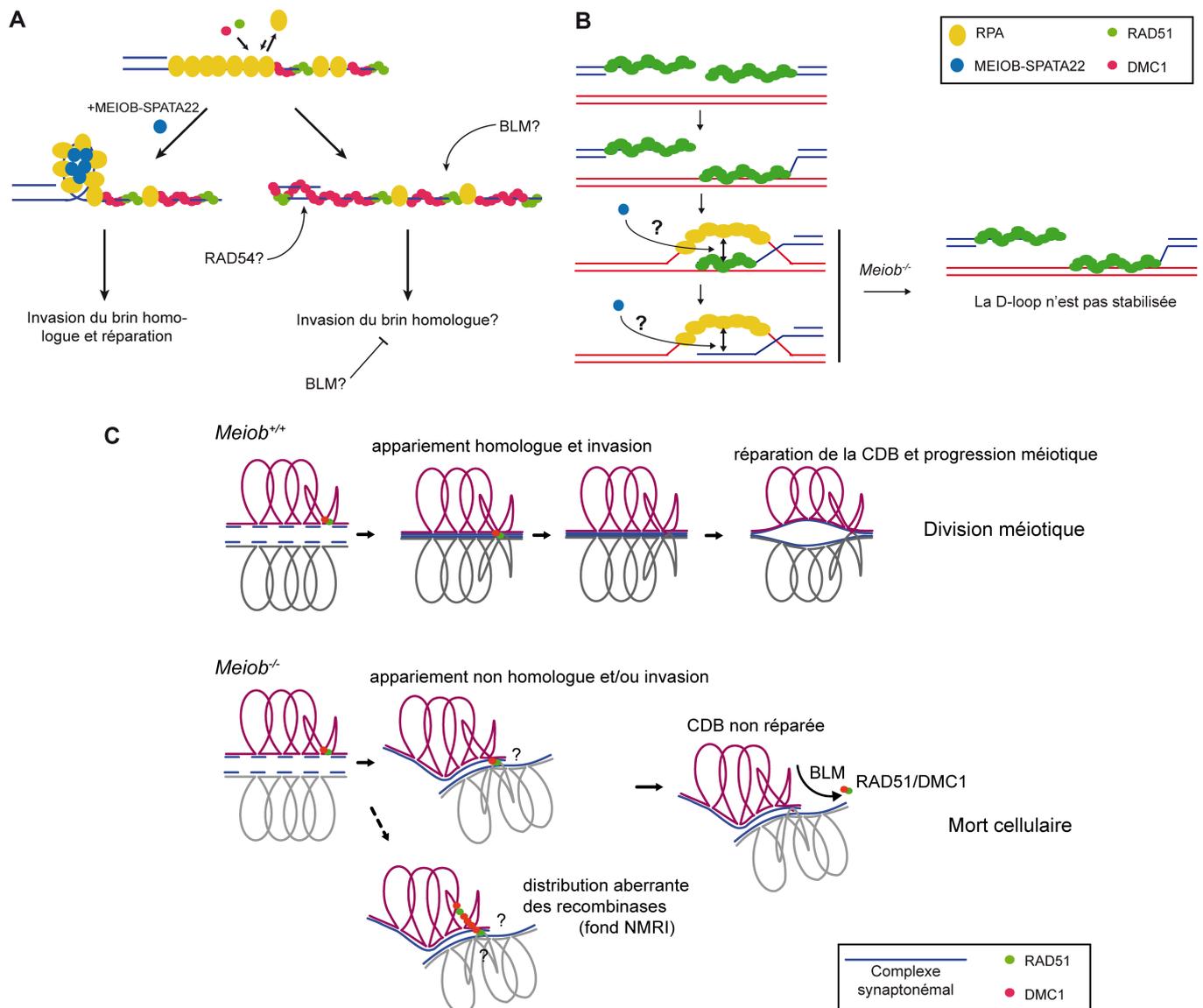
RAD54 et MEIOB-SPATA22 semblent réguler la polymérisation de DMC1 au cours de la recombinaison méiotique chez la souris. Cependant, comment interviennent ces protéines dans cette régulation ? Nous savons que yRad54 peut déplacer yRad51 de l'ADNdb *in vitro* (Solinger et al., 2002). RAD54 pourrait également déplacer DMC1 de l'ADNdb en méiose (**Figure 21A**) alors que MEIOB-SPATA22 et RPA pourraient agir en amont de RAD54 en empêchant que la polymérisation de DMC1 n'atteigne la jonction ADNsb/ADNdb (**Figure 21A**). En absence de MEIOB, RAD54 éliminerait la formation de polymères de DMC1 sur l'ADNdb qui serait normalement bloquée en amont par MEIOB-SPATA22. Cependant, RAD54 pourrait être rapidement saturée et DMC1 finirait par persister sur l'ADNdb. Ainsi, nous observons la formation de foyers DMC1 filiformes en absence de MEIOB. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait comparer le nombre de foyers DMC1 filiformes par cellules dans les souris

*Meiob<sup>-/-</sup>*, *Rad54<sup>-/-</sup>* et *Meiob<sup>-/-</sup>Rad54<sup>-/-</sup>*. Des effets additifs des deux mutations suggéreraient que MEIOB et RAD54 interviennent à des étapes indépendantes de la régulation de DMC1.

- Un rôle de MEIOB-SPATA22 dans la stabilisation de la D-loop

Nous avons observé au cours de nos travaux que l'apparition des foyers filiformes DMC1, en absence de MEIOB, semble être favorisée par la mixité du fond génétique murin. La question du lien entre la mixité du fond génétique et la formation de foyers DMC1 filiformes en absence de MEIOB se pose alors. Une particularité de la recombinaison méiotique est l'invasion d'une séquence homologue sur le chromosome homologue. Cette invasion induit la formation d'un hétéroduplex avec des mésappariements de l'ADN qui est moins stable qu'un duplex sans mésappariements. MEIOB-SPATA22 pourrait aider l'invasion d'une séquence du chromosome homologue, lorsque le locus lésé et le locus intact divergent. Cette étape pourrait faire intervenir la faible affinité de MEIOB pour l'ADNdb (Souquet et al., 2013). Nous proposons que MEIOB-SPATA22 pourrait stabiliser la D-loop en interagissant à la fois avec RPA qui est sur le brin déplacé et avec l'hétéroduplex grâce à l'affinité de MEIOB pour l'ADNdb (**Figure 21B**). Une telle stabilisation de la D-loop pourrait permettre la gestion des mésappariements de cet hétéroduplex et la progression de la recombinaison méiotique. En absence de MEIOB, le brin déplacé de la D-loop pourrait s'hybrider de nouveau sur son brin complémentaire avant que l'hétéroduplex ne soit complètement stabilisé pour permettre la synthèse de l'ADN (**Figure 21B**).

Cette hypothèse est confortée par le phénotype du mutant *Mnd1* chez *S.cerevisiae* (Brown et al., 2015). En effet, HOP2-MND1 interviendrait dans la formation de la D-loop au cours de la recombinaison méiotique, comme proposé pour MEIOB-SPATA22 (Chen et al., 2004; Petukhova et al., 2005). Or en absence de *yMnd1*, des foyers *yDmc1* aberrants se forment en méiose et ces foyers DMC1 présentent des similitudes avec les foyers filiformes que nous avons observé en absence de MEIOB (Brown et al., 2015). Ce résultat suggère que la polymérisation étendue de DMC1 en méiose proviendrait d'une perturbation de la stabilisation de la D-loop. Ce phénotype ne serait alors pas spécifique de l'absence d'une régulation de la polymérisation de DMC1 par MEIOB-SPATA22 mais serait due à un comportement générique de DMC1 en absence d'invasion efficace du chromosome homologue. Cependant, les raisons qui conduisent DMC1 à former des filaments sur l'ADNdb lorsque l'invasion du chromosome homologue est perturbée restent encore à être élucidées.



**Figure 21 : Rôles proposés de MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique**

(A) Rôle proposé de MEIOB-SPATA22 dans la régulation de la polymérisation de DMC1. La condensation du filament RPA-ADNsb pourrait contribuer à la régulation de la polymérisation de DMC1 au cours de la recombinaison méiotique. En absence de MEIOB-SPATA22, DMC1 formerait des filaments très longs, même sur l'ADN db. BLM et RAD54 pourraient intervenir en aval pour éliminer ces filaments ou les intermédiaires formés par ces filaments. (B) Rôle proposé de MEIOB-SPATA22 dans la stabilisation de la D-loop, lorsque le brin lésé et le brin intact divergent en séquence. En absence de MEIOB, la D-loop est peu stable et l'hétéroduplex qui s'est formé n'est pas assez stabilisé. La D-loop se dissocie ensuite. (C) L'absence de MEIOB-SPATA22 induit des appariements non-homologues des chromosomes qui pourraient être liés à une fonction anormale des recombinaisons. BLM pourrait intervenir pour éliminer les intermédiaires aberrants de la recombinaison formés dans ce contexte.

#### V. Un autre rôle de l'interaction entre MEIOB/SPATA22 et RPA : la second-end capture ?

Nos résultats nous laissent suggérer deux rôles potentiels de l'interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA. Cependant, l'équipe du Dr. J.P. Wang avait précédemment proposé que l'interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA pourrait assurer la second-end capture (Luo et al., 2013). Nos données ne nous permettent pas d'infirmer complètement cette hypothèse. Cependant, si l'interaction entre MEIOB-SPATA22 et RPA

pouvait à elle seule catalyser le rapprochement de deux molécules d'ADNsb, nous aurions dû observer, par microscopie électronique, des molécules d'ADNsb s'agréger en présence de MEIOB-SPATA22 et RPA. Or, nous n'avons pas observé de telles figures. En revanche, nous n'avons pas utilisé de molécules d'ADNsb complémentaires dans nos expériences. Ce type de substrats a été couramment utilisé pour tester l'activité de RAD52 au cours de l'hybridation de deux brins d'ADNsb (Jensen et al., 2010; Mortensen et al., 1996; Shinohara et al., 1998; Sugiyama et al., 1998). Pour tester à l'avenir l'hypothèse de la second-end capture catalysée par MEIOB-SPATA22 et RPA, nous pourrions tenter de suivre l'hybridation de deux ADNsb complémentaires et saturés par RPA en présence ou non de MEIOB/SPATA22 purifié.

## VI. La caractérisation plus approfondie du phénotype des souris *Meiob*<sup>-/-</sup>

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons cherché à identifier un facteur impliqué dans l'élimination des recombinaisons en absence de MEIOB chez la souris. Nous avons fait l'hypothèse que BLM intervient dans ce phénomène et avons alors suivi BLM en absence de MEIOB. Nous avons ainsi pu constater que BLM s'accumule sur les chromosomes méiotiques, ce qui suggère que cette hélicase pourrait bien être impliquée dans l'élimination des recombinaisons en absence de MEIOB (**Figure 21A et C**). Cette idée est confortée par le fait que nous ayons observé que les cellules exprimant des forts foyers BLM présentent des faibles foyers DMC1. Cependant, BLM ne s'accumule pas transitoirement et persiste sur les chromosomes méiotiques. La persistance de BLM sur les chromosomes méiotiques en absence de MEIOB pourrait être le témoin (1) d'un arrêt de la progression de la recombinaison homologue à un stade où intervient BLM en temps normaux ou (2) de l'échec du démantèlement, par BLM, d'intermédiaires aberrants de la recombinaison méiotique formés en absence de MEIOB. Dans ce contexte, BLM reste bloquée aux intermédiaires de recombinaison non démantelés et s'accumule.

Afin de savoir si les intermédiaires de recombinaison, en absence de MEIOB, sont bloqués avant ou après la stabilisation de l'invasion, nous avons regardé si MSH4 qui stabilise les intermédiaires post-synaptiques est présente sur les chromosomes méiotiques. Malheureusement, à cause de problèmes d'anticorps, nous n'avons pas pu obtenir cette information. En revanche, nous pourrions tester la synthèse d'ADN au cours de la recombinaison homologue en tentant de révéler une incorporation du BrdU (Bromodésoxyuridine) après incubation des spermatocytes avec ce dernier. Si nous observons que la synthèse d'ADN a lieu en absence de MEIOB, nous pourrions suggérer que le problème de recombinaison caractéristique du mutant *Meiob*<sup>-/-</sup> a lieu au moins après l'invasion. Dans le cas contraire, nous pourrions suggérer que MEIOB et SPATA22 interviennent avant l'étape d'invasion, comme le suggère le recrutement de MEIOB sur les chromosomes méiotiques en absence de DMC1 (Souquet et al., 2013).

## VII. L'étude du rôle de MEIOB et SPATA22 chez *S.pombe*

*MEIOB* est un gène conservé chez les métazoaires mais aussi chez les champignons (Ribeiro et al., 2016). Nous avons également identifié un potentiel homologue de la protéine MEIOB chez *S.pombe*, *Meu32*. De manière très intéressante, un homologue de SPATA22 chez *S.pombe* a aussi été identifié par notre confrère et collaborateur, le Dr. Raphaël Guerois de l'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (IBITECS). Cet homologue, *Mug37* (*Meiotically up-regulated gene 37*), est exprimé spécifiquement en

méiose comme l'homologue de MEIOB. Puisque MEIOB et SPATA22 semblent être conservées chez *S.pombe*, il serait intéressant de vérifier si leur rôle est conservé de la levure à l'Homme. Cependant, contrairement à la souris et à *S.cerevisiae*, la formation des COs méiotiques est essentiellement dépendante de Mus81 chez *S.pombe* (Boddy et al., 2001). La régulation de la recombinaison méiotique est donc différente entre *S.pombe* et la souris. Le rôle de MEIOB et SPATA22 pourrait alors avoir également divergé au cours de l'évolution de *S.pombe*. Cependant, *S.pombe* reste un modèle puissant d'un point de vue génétique et pourrait à l'avenir nous aider à mieux comprendre le rôle de MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique.

Les gènes codant les homologues de MEIOB et SPATA22 pourraient être invalidés chez *S.pombe* à l'avenir pour étudier le rôle de ces homologues au cours de la recombinaison méiotique. Les avantages de *S.pombe* pour l'étude de la recombinaison méiotique par rapport à la souris sont relativement similaires à ceux présentés par *S.cerevisiae*. Une telle approche nous permettra ainsi de savoir si des intermédiaires post-synaptiques de la recombinaison peuvent se former en absence des homologues de MEIOB et SPATA22, information que nous n'avons pas chez la souris à ce jour.

Il serait également intéressant de vérifier si les interactions entre les homologues de MEIOB, SPATA22 et RPA sont conservées chez *S.pombe*. Si ces interactions sont conservées, des mutations visant à perturber l'interaction entre les homologues de MEIOB-SPATA22 et RPA pourrions être réalisées chez *S.pombe* pour étudier le rôle de cette interaction au cours de la recombinaison méiotique.

## VIII. Le rôle de l'activité de liaison à l'ADNsb de MEIOB

La mutation MEIOB N64I a été associée à des cas d'azoospermies chez l'Homme (Gershoni et al., 2017). Cette mutation est située dans un domaine OB-fold de MEIOB, plus précisément dans une région de ce domaine qui serait potentiellement en contact avec l'ADNsb. Cette mutation est alors susceptible d'affecter la liaison à l'ADNsb de MEIOB. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons alors testé la capacité de la protéine mutante de lier l'ADNsb. Nous avons ainsi observé que la protéine mutante est toujours capable de lier l'ADNsb. Cependant, le test que nous avons utilisé ne permet pas de savoir si la mutation MEIOB N64I pourrait avoir réduit ou non l'affinité de MEIOB pour l'ADNsb. Pour comparer l'affinité de la protéine mutante avec celle de la protéine sauvage, nous proposons de refaire des expériences de pulldowns avec de l'ADNsb mais avec quelques modifications. Au lieu d'éluer la protéine MEIOB recombinante dans des conditions dénaturantes, nous proposons de l'éluer avec des concentrations salines croissantes. Si la mutation MEIOB N64I affecte l'affinité de MEIOB pour l'ADNsb, la protéine mutante devrait être éluée à des concentrations salines plus faibles que la protéine sauvage.

MEIOB interagit avec l'ADNsb mais aussi avec RPA et SPATA22. Nous devrions alors également vérifier si cette mutation n'affecte pas l'interaction avec SPATA22 et RPA. Ceci pourrait être testé grâce à notre modèle d'expression dans les cellules humaines.

Si la mutation N64I affecte spécifiquement la liaison à l'ADNsb de MEIOB, nous pourrions analyser le rôle de cette activité de MEIOB à la fois *in vitro* et *in vivo*, grâce à un tel mutant. Par exemple, nous pourrions tester si cette activité est nécessaire à la condensation du filament RPA-ADNsb par MEIOB-SPATA22. Ensuite, nous pourrions vérifier si l'activité de liaison à l'ADNsb de MEIOB est importante pour son rôle *in vivo*.

## IX. La potentielle activité nucléase de MEIOB : mythe ou vérité ?

L'équipe du Dr. J.P. Wang avait observé que le domaine OB-fold central de MEIOB présentait une activité exonucléase *in vitro* (Luo et al., 2013). Nous n'avons pas observé de dégradation de l'ADNsb dans nos retards sur gels. Contrairement à nos confrères, nous travaillons avec un complexe MEIOB-SPATA22 entier. Quatre hypothèses sont envisageables pour expliquer cette différence entre nos résultats et ceux de nos confrères : (1) les conditions expérimentales qui ne sont pas les mêmes entre nos expérimentations et celles de nos confrères pourraient être à l'origine de cette différence, (2) le complexe n'a pas d'activité nucléase et cette activité n'est qu'un artefact dû à la troncation de MEIOB, (3) SPATA22 inhibe l'activité nucléase de MEIOB et (4) l'activité exonucléase de MEIOB est due à une contamination. Nous pouvons envisager cette dernière hypothèse car aucune analyse par SDS-PAGE de la préparation de nos confrères n'a été présentée dans leur étude. Dans ces conditions, il est difficile de juger de la pureté de leur protéine. De plus, nos confrères nous ont communiqué que cette activité nucléase de MEIOB ne semble pas être reproductible *in vitro* et que cette activité pourrait provenir d'une contamination par une nucléase qui proviendrait de l'hôte qui a servi à produire le domaine OB-fold central de MEIOB (communication personnelle du Dr. J.P. Wang). Nos données et les dernières de nos confrères suggèrent que le complexe MEIOB-SPATA22 ne possède pas d'activité nucléase.

## X. Ouverture sur des partenaires de MEIOB-SPATA22 autres que RPA

RPA a de nombreux partenaires. Ces derniers peuvent être recrutés à l'ADNsb grâce à RPA et peuvent même réguler RPA. De plus, nous proposons que MEIOB-SPATA22 pourrait ressembler à RPA d'un point de vue structural. L'identification de nouveaux partenaires du complexe MEIOB-SPATA22 pourrait être une bonne approche pour déterminer de nouveaux rôles de ce complexe. Pour identifier de tels partenaires, MEIOB ou SPATA22 pourrait être immunoprécipitée à l'avenir à partir d'extraits testiculaires murins. Les protéines précipitées avec MEIOB-SPATA22 pourraient être ensuite analysées par spectrométrie de masse. Si nous identifions des partenaires de MEIOB et SPATA22 mais qu'ils sont faiblement enrichis dans ces précipitats, nous pourrions confirmer ces interactions par une transfection des cellules humaines suivie d'une étude des interactions par immunoprécipitations.

## XI. Le rôle de MEIOB et SPATA22 dans les cellules cancéreuses

MEIOB et SPATA22 sont toutes les deux des antigènes testiculaires exprimés dans les cellules tumorales. Comment l'expression de MEIOB et SPATA22 pourrait jouer un rôle dans la biologie de la cellule cancéreuse ? MEIOB et SPATA22 sont deux protéines essentielles à la recombinaison méiotique, un mécanisme de réparation des CDBs (Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Ces protéines pourraient lier des intermédiaires de différentes voies de réparation ou de différents mécanismes du métabolisme de l'ADN. MEIOB et SPATA22 pourraient ainsi (1) permettre la réparation de dommages à l'ADN par recombinaison homologue ou au contraire (2) constituer un poison pour la réparation de ces dommages ou pour le métabolisme de l'ADN. Par conséquent, l'expression de MEIOB et SPATA22 pourrait induire une résistance ou une sensibilité des cellules cancéreuses aux dommages à l'ADN.

L'expression de MEIOB et SPATA22 par les tumeurs pourrait servir de critère pour sélectionner les traitements anti-cancer à adopter. Si ces protéines induisent une résistance des cellules tumorales aux dommages à l'ADN, les traitements qui reposent sur l'induction de ces dommages devront être évités car ils seraient peu efficaces. En revanche, si MEIOB et SPATA22 sensibilisent les cellules aux dommages à l'ADN, ces traitements pourront se révéler efficaces.

## XII. Conclusion

La recombinaison méiotique est un mécanisme essentiel à la reproduction sexuée chez la plupart des organismes eucaryotes. Cette dernière est assurée grâce à la collaboration de facteurs impliqués au cours de la recombinaison mitotique avec d'autres spécifiques de la méiose. Ces travaux de thèse étaient dédiés à l'étude de deux de ces facteurs, MEIOB et son partenaire SPATA22. Ces deux protéines sont essentielles à la recombinaison méiotique, le mécanisme à l'origine de la formation des COs entre chromosomes homologues eux-mêmes essentiels au bon déroulement des divisions méiotiques.

MEIOB est un paralogue d'une sous-unité du complexe RPA, le complexe majeur de liaison à l'ADNsb dans les cellules eucaryotes. De manière curieuse, la similitude entre MEIOB et RPA ne s'arrête pas sur le fait que MEIOB soit un paralogue de RPA1. En effet, nous avons pu observer que MEIOB et SPATA22 forment un complexe partageant des similitudes structurelles avec RPA. Cette donnée est aujourd'hui originale car même si nous savions que MEIOB ressemble à RPA1 (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013), aucune donnée laissait suggérer que MEIOB puisse faire partie d'un complexe qui partage des similitudes structurelles avec RPA. Cependant, si MEIOB et SPATA22 forment un tel complexe, comment MEIOB se distingue-t-elle de son homologue pour garantir la progression de la recombinaison méiotique chez les mammifères ? De plus, comment MEIOB et SPATA22 interviennent-elles au cours de la recombinaison homologue pour lui apporter les spécificités propres à la méiose ? Ces questions étaient au coeur de nos travaux et pour y répondre, nous avons tenté de caractériser biochimiquement le complexe MEIOB-SPATA22 et tenté d'améliorer notre compréhension de son rôle *in vivo*.

L'étude *in vitro* du complexe MEIOB-SPATA22 nous a apporté des éléments qui nous permettent aujourd'hui de mieux appréhender le rôle de ce dernier. Nous avons pu observer que ce complexe est capable de se lier à un filament RPA-ADNsb et de condenser le filament RPA-ADNsb. Ces données modifient notre vision du recrutement de MEIOB-SPATA22 aux intermédiaires de recombinaison. Alors que le premier modèle proposé par notre équipe suggérait que MEIOB puisse être recrutée aux intermédiaires de recombinaison en liant directement l'ADNsb grâce à son affinité pour ce dernier (Souquet et al., 2013), nos données *in vitro* suggèrent que ce recrutement pourrait se faire via RPA associé à l'ADNsb. Cependant, nous n'excluons pas que l'affinité de MEIOB et SPATA22 pour l'ADNsb puisse aider au recrutement de ces protéines aux intermédiaires de recombinaison. Suite au recrutement de MEIOB-SPATA22 sur le filament RPA-ADNsb, le dimère condenserait le filament RPA-ADNsb. Cette condensation influence probablement une ou plusieurs étapes de la recombinaison méiotique qui font intervenir de l'ADNsb couvert par RPA. Par conséquent, MEIOB-SPATA22 pourrait réguler la recombinaison méiotique en modifiant la structure du filament RPA-ADNsb.

La régulation du filament RPA-ADNsb par MEIOB-SPATA22 pourrait contribuer à une ou plusieurs étapes de la recombinaison méiotique. Notre étude génétique du rôle de MEIOB au cours de la recombinaison méiotique chez la souris nous a apporté une piste potentielle concernant la contribution de

MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique. Nous avons en effet pu observer que la polymérisation de la recombinaison DMC1 est dérégulée en absence de MEIOB. Pour expliquer ce phénomène, nous avons proposé que (1) la condensation du filament RPA-ADNsb par MEIOB-SPATA22 régule la polymérisation de DMC1 sur l'ADNsb ou que (2) les interactions entre MEIOB-SPATA22 et RPA permettent de stabiliser la D-loop catalysée par DMC1 au cours de la recombinaison méiotique. La première hypothèse suggère une nouvelle voie de répression de la polymérisation de DMC1, en amont de RAD54 et peut-être en parallèle des hélicases comme BLM chez la souris. Tandis que la seconde hypothèse classe MEIOB et SPATA22 comme des protéines auxiliaires des recombinaisons au cours de l'invasion, à l'image de HOP2-MND1 chez la souris et *S.cerevisiae*.

Ces hypothèses devront être testées à l'avenir pour affiner encore plus notre compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent la recombinaison méiotique. Cependant, les données produites au cours de ces travaux nous offrent également une nouvelle vision de la régulation de RPA chez les eucaryotes. Alors que la régulation de RPA par ses partenaires passe principalement par une déstabilisation de son interaction avec l'ADNsb, nous proposons ici une régulation originale de l'état de compactage d'un filament RPA-ADNsb, par un de ses partenaires, MEIOB-SPATA22. MEIOB-SPATA22 pourrait interagir avec plusieurs molécules de RPA qui sont normalement éloignées dans un filament. Ces ponts moléculaires permettraient la condensation du filament RPA-ADNsb. Ce modèle a été initialement proposé chez la bactérie suite à l'observation de la condensation du filament SSB-ADNsb (*Single-Strand Binding protein*) par RecO-RecR (*Recombination protein O et R*) (Bell et al., 2015). La conservation d'un tel mécanisme de la bactérie aux mammifères suggère l'importance de la condensation de l'ADNsb au cours du métabolisme de l'ADN en général, à l'image de la condensation de l'ADN par les protéines histones.

Outre la compréhension des mécanismes fondamentaux qui régissent la recombinaison méiotique, ces travaux de thèse pourraient aussi servir de base à des applications translationnelles comme la contraception et le traitement du cancer. En effet, nos travaux sur les interactions entre ces deux protéines pourraient servir au développement d'inhibiteurs spécifiques des interactions entre MEIOB et SPATA22. Ces inhibiteurs devront être spécifiques de l'interaction entre MEIOB et SPATA22 et ne devront pas affecter la formation du trimère RPA pour ne pas porter atteinte à la survie des cellules non ciblées par les traitements que nous allons présenter. MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la fertilité des rongeurs et MEIOB est essentielle à la fertilité chez l'Homme (Gershoni et al., 2017; Hays et al., 2017; Ishishita et al., 2013; Luo et al., 2013; La Salle et al., 2012; Souquet et al., 2013). Les inhibiteurs de l'interaction entre MEIOB et SPATA22 pourraient alors être utilisés comme molécules contraceptives pour les hommes. Ce type de contraceptifs seraient réversibles et auraient probablement très peu d'effets secondaires car ils ne cibleraient que les cellules méiotiques qui sont constamment produites dans les testicules. Ils pourraient constituer de bons substituts pour les couples ayant recours aux contraceptifs hormonaux féminins qui sont aujourd'hui efficaces mais peuvent aussi provoquer de nombreux effets secondaires chez certaines femmes. Enfin, MEIOB et SPATA22 sont co-exprimées par certaines cellules cancéreuses (Wang et al., 2016a). Si l'expression de MEIOB et SPATA22 confère à ces cellules une résistance aux dommages à l'ADN, les inhibiteurs des interactions entre MEIOB et SPATA22 pourraient être utilisés à l'avenir pour tenter de sensibiliser les cellules tumorales aux traitements anti-cancers, qui reposent souvent sur la formation de dommages à l'ADN, et ainsi augmenter l'efficacité de ces traitements.

# **Bibliographie**



- Abby, E., Tourpin, S., Ribeiro, J., Daniel, K., Messiaen, S., Moison, D., Guerin, J., Gaillard, J.-C., Armengaud, J., Langa, F., et al. (2016). Implementation of meiosis prophase I programme requires a conserved retinoid-independent stabilizer of meiotic transcripts. *Nat. Commun.* *7*, 10324.
- Aboussekhra, A., Chanet, R., Zgaga, Z., Cassier-Chauvat, C., Heude, M., and Fabre, F. (1989). RADH, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of radH mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res.* *17*, 7211–7219.
- Aboussekhra, a, Chanet, R., Adjiri, A., and Fabre, F. (1992). Semidominant suppressors of Srs2 helicase mutations of *Saccharomyces cerevisiae* map in the RAD51 gene, whose sequence predicts a protein with similarities to procaryotic RecA proteins. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3224–3234.
- Acquaviva, L., Székvölgyi, L., Dichtl, B., Dichtl, B.S., de La Roche Saint André, C., Nicolas, A., and Géli, V. (2013). The COMPASS subunit Spp1 links histone methylation to initiation of meiotic recombination. *Science* *339*, 215–218.
- Adelman, C.A., and Petrini, J.H.J. (2008). ZIP4H (TEX11) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over. *PLoS Genet.* *4*.
- Agarwal, S., and Roeder, G.S. (2000). Zip3 provides a link between recombination enzymes and synaptonemal complex proteins. *Cell* *102*, 245–255.
- Aguilera, A., and Gaillard, H. (2014). Transcription and Recombination: When RNA Meets DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*.
- Aklilu, B.B., Soderquist, R.S., and Culligan, K.M. (2014). Genetic analysis of the Replication Protein A large subunit family in *Arabidopsis* reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* *42*, 3104–3118.
- Alexeev, A., Mazin, A., and Kowalczykowski, S.C. (2003). Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 182–186.
- Alexiadis, V., and Kadonaga, J.T. (2002). Strand pairing by Rad54 and Rad51 is enhanced by chromatin. *Genes Dev.* *16*, 2767–2771.
- Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* *152*, 417–429.
- Antony, E., Tomko, E.J., Xiao, Q., Krejci, L., Lohman, T.M., and Ellenberger, T. (2009). Article Srs2 Disassembles Rad51 Filaments by a Protein-Protein Interaction Triggering ATP Turnover and Dissociation of Rad51 from DNA. *Mol. Cell* *35*, 105–115.
- Argunhan, B., Murayama, Y., and Iwasaki, H. (2017). The differentiated and conserved roles of Swi5-Sfr1 in homologous recombination. *FEBS Lett.* 1–13.
- Ashton, T.M., Mankouri, H.W., Heidenblut, A., McHugh, P.J., and Hickson, I.D. (2011). Pathways for Holliday junction processing during homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1921–1933.
- Attikum, H. Van, Fritsch, O., Hohn, B., Gasser, S.M., Ansermet, Q.E., and Geneva, C.- (2004). Recruitment of the INO80 Complex by H2A Phosphorylation Links ATP-Dependent Chromatin Remodeling with DNA Double-Strand Break Repair NCCR Frontiers in Genetics Program. *Cell* *119*, 777–788.
- Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell. *EMBO J.* *23*, 4868–4875.
- Bachrati, C.Z., Borts, R.H., and Hickson, I.D. (2006). Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2269–2279.
- Baker, S.M., Plug, A.W., Prolla, T.A., Bronner, C.E., Harris, A.C., Yao, X., Christie, D.-M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., et al. (1996). Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nat. Genet.* *13*, 336–342.

- Bannister, L. a, Reinholdt, L.G., Munroe, R.J., and Schimenti, J.C. (2004). Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. *Genesis* *40*, 184–194.
- Bastin-Shanower, S.A., Fricke, W.M., Mullen, J.R., and Brill, S.J. (2003). The mechanism of *Mus81-Mms4* cleavage site selection distinguishes it from the homologous endonuclease *Rad1-Rad10*. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3487–3496.
- Baudat, F., and Nicolas, A. (1997). Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5213–5218.
- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J.P., Jasin, M., and Keeney, S. (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking *Spo11*. *Mol Cell* *6*, 989–998.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and de Massy, B. (2010). *PRDM9* is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* *327*, 836–840.
- Baudat, F., Imai, Y., and de Massy, B. (2013). Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 794–806.
- Baumann, P., Benson, F.E., and West, S.C. (1996). Human *Rad51* protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* *87*, 757–766.
- Bebenek, K., and Kunkel, T.A. (2004). Functions of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* *69*, 137–165.
- Bell, J.C., Liu, B., and Kowalczykowski, S.C. (2015). Imaging and energetics of single SSB-ssDNA molecules reveal intramolecular condensation and insight into *RecOR* function. *Elife* *4*, 1–21.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994). Purification and characterization of the human *Rad51* protein, an analogue of *E.coli RecA*. *EMBO J.* *13*, 5764–5771.
- Bergerat, A., Gadelle, D., and Forterre, P. (1994). Purification of a DNA Topoisomerase-Ii from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus-Shibatae* - a Thermostable Enzyme with Both Bacterial and Eucaryal Features. *J. Biol. Chem.* *269*, 27663–27669.
- Bergerat, a, de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, a, and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* *386*, 414–417.
- Bishop, D.K. (2012). *Rad51*, the lead in mitotic recombinational DNA repair, plays a supporting role in budding yeast meiosis. *Cell Cycle* *11*, 4105–4106.
- Bishop, K. (1994). *RecA* Homologs *Dmcl* and *RacEI* Interact to Form Multiple Nuclear Complexes prior to Meiotic Chromosome Synapsis. *Cell* *79*, 1081–1092.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N. (1992). *DMC1*: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli recA* required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* *69*, 439–456.
- Bochkarev, A., Pfuetzner, R.A., Edwards, A.M., and Frappier, L. (1997). Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA. *Nature* *385*, 176–181.
- Bochkarev, A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A. (1999). The crystal structure of the complex of replication protein A subunits *RPA32* and *RPA14* reveals a mechanism for single-stranded DNA binding. *EMBO J.* *18*, 4498–4504.
- Bochkareva, E., Korolev, S., Lees-Miller, S.P., and Bochkarev, A. (2002). Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J.* *21*, 1855–1863.
- Bochkareva, E., Kaustov, L., Ayed, A., Yi, G.-S., Lu, Y., Pineda-Lucena, A., Liao, J.C.C., Okorokov, A.L., Milner, J., Arrowsmith, C.H., et al. (2005). Single-stranded DNA mimicry in the p53 transactivation domain interaction with replication protein A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 15412–15417.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H.L., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., and Russell, P. (2001). *Mus81-Eme1* are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* *107*, 537–548.

- Bolcun-Filas, E., and Schimenti, J.C. (2012). *Genetics of Meiosis and Recombination in Mice* (Elsevier Inc.).
- Borde, V., and de Massy, B. (2013). Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis: Setting up communication between DNA and the chromosome structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *23*, 147–155.
- Borde, V., Goldman, a S., and Lichten, M. (2000). Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* *290*, 806–809.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Géli, V., and Nicolas, A. (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J.* *28*, 99–111.
- Börner, G.V., Kleckner, N., and Hunter, N. (2004). Crossover / Noncrossover Differentiation , Synaptonemal Complex Formation , and Regulatory Surveillance at the Leptotene / Zygotene Transition of Meiosis. *Cell* *117*, 29–45.
- Le Bouffant, R., Souquet, B., Duval, N., Duquenne, C., Herve, R., Frydman, N., Robert, B., Habert, R., and Livera, G. (2011). Msx1 and Msx2 promote meiosis initiation. *Development* *138*, 5393–5402.
- Brill, S.J., and Stillman, B. (1991). Replication Factor-A from *Saccharomyces-Cerevisiae* Is Encoded by Three Essential Genes Coordinately Expressed at S-Phase. *Gene Dev.* *5*, 1589–1600.
- Brooker, A.S., and Berkowitz, K.M. (2014). The roles of cohesins in mitosis, meiosis, and human health and disease. *Methods Mol. Biol.* 229–266.
- Brown, M.S., and Bishop, D.K. (2014). DNA Strand Exchange and RecA Homologs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–30.
- Brown, M.S., Grubb, J., Zhang, A., Rust, M.J., and Bishop, D.K. (2015). Small Rad51 and Dmc1 Complexes Often Co-occupy Both Ends of a Meiotic DNA Double Strand Break. *PLoS Genet.* *11*, 1–22.
- Budd, M.E., Wittrup, K.D., Bailey, J.E., and Campbell, J.L. (1989). DNA polymerase I is required for premeiotic DNA replication and sporulation but not for X-ray repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *9*, 365–376.
- Bugreev, D. V., Yu, X., Egelman, E.H., and Mazin, A. V. (2007). Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom’s syndrome helicase. *Genes Dev.* *21*, 3085–3094.
- Buhler, C., Gabelle, D., Forterre, P., Wang, J.C., and Bergerat, A. (1998). Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* *26*, 5157–5162.
- Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., Sekiguchi, J.M., Chang, S., and Ferguson, D.O. (2008). Mre11 Nuclease Activity Has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation. *Cell* 85–96.
- Bullard, S. a, Kim, S., Galbraith, a M., and Malone, R.E. (1996). Double strand breaks at the HIS2 recombination hot spot in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13054–13059.
- Burgoyne, P.S., Mahadevaiah, S.K., and Turner, J.M. a (2009). The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 207–216.
- Busygina, V., Sehorn, M.G., Shi, I.Y., Tsubouchi, H., Roeder, G.S., and Sung, P. (2008). Hed1 regulates Rad51-mediated recombination via a novel mechanism. *Genes Dev.* *22*, 786–795.
- Caburet, S., Arboleda, V.A., Llano, E., Overbeek, P.A., Barbero, J.L., Oka, K., Harrison, W., Vaiman, D., Ben-Neriah, Z., García-Tuñón, I., et al. (2014). Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N. Engl. J. Med.* *370*, 943–949.
- Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11-Rad50-Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* *514*, 122–125.

- Cao, L., Alani, E., and Kleckner, N. (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* *61*, 1089–1101.
- Carballo, J.A., Panizza, S., Serrentino, M.E., Johnson, A.L., Geymonat, M., Borde, V., Klein, F., and Cha, R.S. (2013). Budding Yeast ATM/ATR Control Meiotic Double-Strand Break (DSB) Levels by Down-Regulating Rec114, an Essential Component of the DSB-machinery. *PLoS Genet.* *9*.
- Castor, D., Nair, N., Déclais, A.C., Lachaud, C., Toth, R., Macartney, T.J., Lilley, D.M.J., Arthur, J.S.C., and Rouse, J. (2013). Cooperative control of holliday junction resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 nucleases. *Mol. Cell* *52*, 221–233.
- Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C., and White, R.L. (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* *305*, 779–784.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* *26*, 52–64.
- Cejka, P., Plank, J.L., Bachrati, C.Z., Hickson, I.D., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Rmi1 stimulates decatenation of double Holliday junctions during dissolution by Sgs1-Top3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1377–1382.
- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: *Nat. Publ. Gr.* *11*, 319–330.
- Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., Rothstein, R., Freyer, G.A., Boone, C., and Brown, G.W. (2005). RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J.* *24*, 2024–2033.
- Chen, X., Cui, D., Papusha, A., Zhang, X., Chu, C.-D., Tang, J., Chen, K., Pan, X., and Ira, G. (2012). The Fun30 nucleosome remodeller promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature* *489*, 576–580.
- Chen, X.B., Melchionna, R., Denis, C.M., Gaillard, P.H.L., Blasina, A., Van de Weyer, I., Boddy, M.N., Russell, P., Vialard, J., and McGowan, C.H. (2001). Human Mus81-associated endonuclease cleaves Holliday junctions in vitro. *Mol. Cell* *8*, 1117–1127.
- Chen, Y.K., Leng, C.H., Olivares, H., Lee, M.H., Chang, Y.C., Kung, W.M., Ti, S.C., Lo, Y.H., Wang, A.H., Chang, C.S., et al. (2004). Heterodimeric complexes of Hop2 and Mnd1 function with Dmc1 to promote meiotic homolog juxtaposition and strand assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10572–10577.
- Chikashige, Y., Tsutsumi, C., Yamane, M., Okamasa, K., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2006). Meiotic Proteins Bqt1 and Bqt2 Tether Telomeres to Form the Bouquet Arrangement of Chromosomes. *Cell* *125*, 59–69.
- Ciccia, A., Constantinou, A., and West, S.C. (2003). Identification and Characterization of the Human Mus81-Emel Endonuclease. *J. Biol. Chem.* *278*, 25172–25178.
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., and Bishop, D.K. (2012). Rad51 Is an Accessory Factor for Dmc1-Mediated Joint Molecule Formation During Meiosis. *Science* (80-. ). *337*, 1222–1225.
- Cole, F., Baudat, F., Grey, C., Keeney, S., de Massy, B., and Jasin, M. (2014). Mouse tetrad analysis provides insights into recombination mechanisms and hotspot evolutionary dynamics. *Nat. Genet.* *46*, 1072–1080.
- Costelloe, T., Louge, R., Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Chen, X., Cui, D., Papusha, A., Zhang, X., Chu, C., Chen, K., et al. (2012). The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodelers promote DNA end resection. *Nature* *489*, 576–580.
- Costes, A., and Lambert, S.A.E. (2013). Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery. *Biomolecules* *39*–71.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D., and Doutriaux, M.P. (1999). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* *11*, 1623–1634.

- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R. (2012). FANCM Limits Meiotic Crossovers. *Science* (80-. ). *336*, 1588–1590.
- Daniel, K., Tränkner, D., Wojtasz, L., Shibuya, H., Watanabe, Y., Alsheimer, M., and Tóth, A. (2014). Mouse CCDC79 (TERB1) is a meiosis-specific telomere associated protein. *BMC Cell Biol.* *15*, 17.
- Darlington, C. (1930). Chromosome Studies in *Fritillaria*, III Chiasma Formation and Chromosome Pairing in *Fritillaria imperialis*. *Cytologia* (Tokyo).
- Daughdrill, G.W., Ackerman, J., Isern, N.G., Botuyan, M. V, Arrowsmith, C., Wold, M.S., and Lowry, D.F. (2001). The weak interdomain coupling observed in the 70 kDa subunit of human replication protein A is unaffected by ssDNA binding. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3270–3276.
- Deans, A.J., Khanna, K.K., Mcnees, C.J., Mercurio, C., and McArthur, G.A. (2006). Cyclin-Dependent Kinase 2 Functions in Normal DNA Repair and Is a Therapeutic Target in BRCA1-Deficient Cancers. *Cancer Res.* 8219–8227.
- Dehé, P.-M., Coulon, S., Scaglione, S., Shanahan, P., Takedachi, A., Wohlschlegel, J.A., Yates, J.R., Llorente, B., Russell, P., and Gaillard, P.-H.L. (2013). Regulation of Mus81–Eme1 Holliday junction resolvase in response to DNA damage. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 598–603.
- Dexheimer, T.S. (2013). DNA Repair Pathways and Mechanisms.
- Ding, X., Xu, R., Yu, J., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2007). SUN1 Is Required for Telomere Attachment to Nuclear Envelope and Gametogenesis in Mice. *Dev. Cell* *12*, 863–872.
- Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D., and Gasser, S.M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat. Cell Biol.* *14*, 502–509.
- Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G.J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V.E., Liu, D., Tsai, M.-S., et al. (2010). Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1255–1259.
- Dupaigne, P., Le Breton, C., Fabre, F., Gangloff, S., Le Cam, E., and Veaute, X. (2008). The Srs2 Helicase Activity Is Stimulated by Rad51 Filaments on dsDNA: Implications for Crossover Incidence during Mitotic Recombination. *Mol. Cell* *29*, 243–254.
- Duroc, Y., Kumar, R., Ranjha, L., Adam, C., Guérois, R., Muntaz, K.M., Marsolier-Kergoat, M.C., Dingli, F., Laureau, R., Loew, D., et al. (2017). Concerted action of the MutL $\beta$  heterodimer and Mer3 helicase regulates the global extent of meiotic gene conversion. *Elife* *6*, 1–24.
- Dutta, A., Ruppert, J.M., Aster, J.C., and Winchester, E. (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53 [see comments]. *Nature* *365*, 79–82.
- Eapen, V. V., Sugawara, N., Tsabar, M., Wu, W.-H., and Haber, J.E. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* Chromatin Remodeler Fun30 Regulates DNA End Resection and Checkpoint Deactivation. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4727–4740.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., et al. (1996). Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* *85*, 1125–1134.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kneitz, B., Winand, N., Lia, M., Heyer, J., Kolodner, R., Pollard, J.W., and Kucherlapati, R. (1999). Mammalian MutS homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis. *Nat. Genet.* *21*, 123–127.
- Eggler, A.L., Inman, R.B., and Cox, M.M. (2002). The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J. Biol. Chem.* *277*, 39280–39288.
- Eisen, G. (1900). The Spermatogenesis of Batrachoseps. Polymorphous spermatogonia, auxocytes, and spermatocytes. *J. Morphol.* *17*, 1–117.
- Fabre, F., Boulet, A., and Faye, G. (1991). Possible involvement of the yeast POLIII DNA polymerase in induced gene conversion. *MGG Mol. Gen. Genet.* *229*, 353–356.

- Fan, J., and Pavletich, N.P. (2012). Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA. *Genes Dev.* *26*, 2337–2347.
- Fanning, E., and Zhao, K. (2009). SV40 DNA replication: From the A gene to a nanomachine. *Virology* *384*, 352–359.
- Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res.* *34*, 4126–4137.
- Fasching, C.L., Cejka, P., Kowalczykowski, S.C., and Heyer, W.D. (2015). Top3-Rmi1 dissolve Rad51-mediated D loops by a topoisomerase-based mechanism. *Mol. Cell* *57*, 595–606.
- Fawcett, D.W. (1956). The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *2*, 403–406.
- Fazlieva, R., Spittle, C.S., Morrissey, D., Hayashi, H., Yan, H., and Matsumoto, Y. (2009). Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase  $\delta$  and its effects on lesion-bypass DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* *37*, 2854–2866.
- Fekairi, S., Scaglione, S., Chahwan, C., Taylor, E.R., Tissier, A., Coulon, S., Dong, M.Q., Ruse, C., Yates, J.R., Russell, P., et al. (2009). Human SLX4 Is a Holliday Junction Resolvase Subunit that Binds Multiple DNA Repair/Recombination Endonucleases. *Cell* *138*, 78–89.
- Ferrari, S.R., Grubb, J., and Bishop, D.K. (2009). The Mei5-Sae3 protein complex mediates Dmc1 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *284*, 11766–11770.
- Ferretti, L.P., Lafranchi, L., and Sartori, A.A. (2013). Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. *Front. Genet.* *4*, 1–7.
- Flaus, A., Martin, D.M.A., Barton, G.J., and Owen-Hughes, T. (2006). Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.* *34*, 2887–2905.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., and Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 360–374.
- Fraune, J., Alsheimer, M., Volff, J., Busch, K., and Fraune, S. (2012a). Hydra meiosis reveals unexpected conservation of structural synaptonemal complex proteins across metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* *2–7*.
- Fraune, J., Schramm, S., Alsheimer, M., and Benavente, R. (2012b). The mammalian synaptonemal complex: Protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp. Cell Res.* *318*, 1340–1346.
- Fricke, W.M., and Brill, S.J. (2003). Slx1 - Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1 - Top3. *Genes Dev.* *17*, 1768–1778.
- Fukuda, T., Fukuda, N., Agostinho, A., Hernández-Hernández, A., Kouznetsova, A., and Höög, C. (2014). STAG3-mediated stabilization of REC8 cohesin complexes promotes chromosome synapsis during meiosis. *EMBO J.* *33*, 1243–1255.
- Fukushima, K., Tanaka, Y., Nabeshima, K., Yoneki, T., Tougan, T., Tanaka, S., and Nojima, H. (2000). Dmc1 of *Schizosaccharomyces pombe* plays a role in meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2709–2716.
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* *479*, 241–244.
- Garcia, V., Gray, S., Allison, R.M., Cooper, T.J., and Neale, M.J. (2015). Tel1(ATM)-mediated interference suppresses clustered meiotic double-strand-break formation. *Nature* *520*, 114–118.
- Gasior, S.L., Wong, A.K., Kora, Y., Shinohara, A., and Bishop, D.K. (1998). Rad52 associates with RPA and functions with Rad55 and Rad57 to assemble meiotic recombination complexes. *Genes Dev.* *12*, 2208–2221.
- Gasior, S.L., Olivares, H., Ear, U., Hari, D.M., Weichselbaum, R., and Bishop, D.K. (2001). Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8411–8418.

- Gershoni, M., Hauser, R., Yogev, L., Lehavi, O., Azem, F., Yavetz, H., Pietrokovski, S., and Kleiman, S.E. (2017). A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet. Med.*
- Gibb, B., Ye, L.F., Gergoudis, S.C., Kwon, Y., Niu, H., Sung, P., and Greene, E.C. (2014a). Concentration-dependent exchange of replication protein A on single-stranded DNA revealed by single-molecule imaging. *PLoS One* *9*.
- Gibb, B., Ye, L.F., Kwon, Y., Niu, H., Sung, P., and Greene, E.C. (2014b). Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 893–900.
- Girard, C., Chelysheva, L., Choinard, S., Froger, N., Macaisne, N., Lehmendi, A., Mazel, J., Crismani, W., and Mercier, R. (2015). AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genet.* *11*, 1–22.
- Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S., and Radding, C.M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res.* *26*, 5388–5393.
- Gomes, X. V., and Wold, M.S. (1995). Structural Analysis of Human Replication Protein A: MAPPING FUNCTIONAL DOMAINS OF THE 70-kDa SUBUNIT. *J. Biol. Chem.* *270*, 4534–4543.
- Gomes, X. V., and Wold, M.S. (1996). Functional domains of the 70-kilodalton subunit of human replication protein A. *Biochemistry* *35*, 10558–10568.
- Gómez-H, L., Felipe-Medina, N., Sánchez-Martín, M., Davies, O.R., Ramos, I., García-Tuñón, I., de Rooij, D.G., Dereli, I., Tóth, A., Barbero, J.L., et al. (2016). C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat. Commun.* *7*, 13298.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev.* *22*, 2767–2772.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* *20*, 589–600.
- Grey, C., Sommermeyer, V., Borde, V., and de Massy, B. (2011). De La Carte Génétique Méiotique [What defines the genetic map? The specification of meiotic recombination sites]. *Med. Sci. (Paris)*. *27*, 63–69.
- Grimme, J.M., Honda, M., Wright, R., Okuno, Y., Rothenberg, E., Mazin, A. V., Ha, T., and Spies, M. (2010). Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. *Nucleic Acids Res.* *38*, 2917–2930.
- Guiraldelli, M.F., Eyster, C., Wilkerson, J.L., Dresser, M.E., and Pezza, R.J. (2013). Mouse HFM1/Mer3 Is Required for Crossover Formation and Complete Synapsis of Homologous Chromosomes during Meiosis. *PLoS Genet.* *9*.
- Haber, J.E. (2012). Mating-Type Genes and MAT Switching. In *Yeastbook, Cell Signaling and Development*, pp. 33–64.
- Haldenby, S., White, M.F., and Allers, T. (2009). RecA family proteins in archaea: RadA and its cousins. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 102–107.
- Hamoir, G. (1992). The discovery of meiosis by E. Van Beneden, a breakthrough in the morphological phase of heredity. *Int. J. Dev. Biol.* *36*, 9–15.
- Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (2010). Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 124–136.
- Hartung, F., Wurz-wildersinn, R., Fuchs, J., Schubert, I., Suer, S., and Puchta, H. (2007). The Catalytically Active Tyrosine Residues of Both SPO11-1 and SPO11-2 Are Required for Meiotic Double-Strand Break Induction in Arabidopsis. *Plant Cell* *19*, 3090–3099.

- Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2004). A protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific RecA homolog Dmc1. *Cell* *119*, 927–940.
- Hayashi, K., Yoshida, K., and Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* *438*, 374–378.
- Hays, E., Majchrzak, N., Daniel, V., Ferguson, Z., Brown, S., Hathorne, K., and La Salle, S. (2017). Spermatogenesis associated 22 is required for DNA repair and synapsis of homologous chromosomes in mouse germ cells. *Andrology* *5*, 299–312.
- He, Z., Henricksen, L.A., Wold, M.S., and Ingles, C.J. (1995). RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair. *Nature* *374*, 566–569.
- Henricksen, L. a, Umbricht, C.B., and Wold, M.S. (1994). Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. *J. Biol. Chem.* *269*, 11121–11132.
- Herrán, Y., Gutiérrez-Caballero, C., Sánchez-Martín, M., Hernández, T., Viera, A., Barbero, J.L., De Álava, E., de Rooij, D.G., Suja, J.Á., Llano, E., et al. (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J.* *30*, 3091–3105.
- Heyer, W.D., Rao, M.R., Erdile, L.F., Kelly, T.J., and Kolodner, R.D. (1990). An essential *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA binding protein is homologous to the large subunit of human RP-A. *EMBO J.* *9*, 2321–2329.
- Holliday, R. (1964). A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet. Res.* *5*, 282–304.
- Hollingsworth, N.M., Goetsch, L., and Byers, B. (1990). The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* *61*, 73–84.
- Hollingsworth, N.M., Ponte, L., and Halsey, C. (1995). MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev.* *9*, 1728–1739.
- Holloway, J.K., Booth, J., Edelmann, W., McGowan, C.H., and Cohen, P.E. (2008). MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genet.* *4*.
- Holloway, J.K., Morelli, M.A., Borst, P.L., and Cohen, P.E. (2010). Mammalian BLM helicase is critical for integrating multiple pathways of meiotic recombination. *J. Cell Biol.* *188*, 779–789.
- Hopkins, J., Hwang, G., Jacob, J., Sapp, N., Bedigian, R., Oka, K., Overbeek, P., Murray, S., and Jordan, P.W. (2014). Meiosis-Specific Cohesin Component, Stag3 Is Essential for Maintaining Centromere Chromatid Cohesion, and Required for DNA Repair and Synapsis between Homologous Chromosomes. *PLoS Genet.* *10*.
- Horn, H.F., Kim, D.I., Wright, G.D., Wong, E.S.M., Stewart, C.L., Burke, B., and Roux, K.J. (2013). A mammalian KASH domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* *202*, 1023–1039.
- Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M.G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J.M., Barnes, E.L., Chi, P., Janscak, P., et al. (2007). RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes Dev.* *21*, 3073–3084.
- Hunter, N. (2015). Meiotic recombination: The essence of heredity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*.
- Hunter, N., and Borts, R.H. (1997). Mlh1 is unique among mismatch repair proteins in its ability to promote crossing-over during meiosis. *Genes Dev.* *11*, 1573–1582.
- Imai, Y., Baudat, F., Taillepierre, M., Stanzione, M., Toth, A., and de Massy, B. (2017). The PRDM9 KRAB domain is required for meiosis and involved in protein interactions. *Chromosoma*.
- Inagaki, A., Roset, R., and Petrini, J.H.J. (2016). Functions of the MRE11 complex in the development and maintenance of oocytes. *Chromosoma* *125*, 151–162.

- Da Ines, O., Degroote, F., Goubely, C., Amiard, S., Gallego, M.E., and White, C.I. (2013). Meiotic Recombination in Arabidopsis Is Catalysed by DMC1, with RAD51 Playing a Supporting Role. *PLoS Genet.* 9.
- Ip, S.C.Y., Rass, U., Blanco, M.G., Flynn, H.R., Skehel, J.M., and West, S.C. (2008). Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* 456, 357–361.
- Ira, G., Malkova, A., Liberi, G., Foiani, M., and Haber, J.E. (2003). Srs2 and Sgs1-Top3 Suppress Crossovers during Double-Strand Break Repair in Yeast. *Cell* 115, 401–411.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011–1017.
- Ishishita, S., Inui, T., Matsuda, Y., Serikawa, T., and Kitada, K. (2013). Infertility Associated with Meiotic Failure in the tremor Rat (tm/tm) is Caused by the Deletion of Spermatogenesis Associated 22. *Exp Anim* 62, 219–227.
- Ishishita, S., Matsuda, Y., and Kitada, K. (2014). Genetic evidence suggests that Spata22 is required for the maintenance of Rad51 foci in mammalian meiosis. *Sci. Rep.* 4, 6148.
- Ivanov, E.L., Korolev, V.G., and Fabre, F. (1992). XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics* 132, 651–664.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8.
- Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C. (2010). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467, 678–683.
- Jin, Y.H., Jin, Y.H., Al-refai, H., Al-refai, H., Sterling, J.F., Sterling, J.F., Murray, L.J.W., Murray, L.J.W., Resnick, M. a, Resnick, M. a, et al. (2005). The multiple biological roles of the 3'→5' exonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase delta require switching between the polymerase and exonuclease domains. *Society* 25, 461–471.
- Johzuka, K., and Ogawa, H. (1995). Interaction of Mre11 and Rad50: Two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 1521–1532.
- Joyce, E.F., Tanneti, S.N., and McKim, K.S. (2009). *Drosophila* hold'em is required for a subset of meiotic crossovers and interacts with the DNA repair endonuclease complex subunits MEI-9 and ERCC1. *Genetics* 181, 335–340.
- Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., and Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* 7, 1511–1522.
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). Short Article Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell* 47, 320–329.
- Kaur, H., DeMuyt, A., and Lichten, M. (2015). Top3-Rmi1 DNA single-strand decatenase is integral to the formation and resolution of meiotic recombination intermediates. *Mol. Cell* 57, 583–594.
- Keeney, S. (2007). Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome Dyn. Stab.* 11, 27–68.
- Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375–384.
- Kidane, D., Jonason, A.S., Gorton, T.S., Mihaylov, I., Pan, J., Keeney, S., de Rooij, D.G., Ashley, T., Keh, A., Liu, Y., et al. (2010). DNA polymerase  $\beta$  is critical for mouse meiotic synapsis. *EMBO J.* 29, 410–423.
- Kim, D., Stigger, E., and Lee, S. (1996). Role of the 70-kDa Subunit of Human Replication Protein A ( I ). *J. Biol. Chem.* 271, 15124–15129.

- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., and Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* *36*, 5678–5694.
- Klein, H.L. (1997). RDH54, a RAD54 homologue in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for mitotic diploid-specific recombination and repair and for meiosis. *Genetics* *147*, 1533–1543.
- Kneitz, B., Cohen, P.E., Avdievich, E., Zhu, L., Kane, M.F., Hou, H., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R., Pollard, J.W., and Edlmann, W. (2000). MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev.* *14*, 1085–1097.
- Komori, K., and Ishino, Y. (2001). Replication Protein A in *Pyrococcus furiosus* is Involved in Homologous DNA Recombination. *J. Biol. Chem.* *276*, 25654–25660.
- Koumandou, V.L., Wickstead, B., Ginger, M.L., van der Giezen, M., Dacks, J.B., and Field, M.C. (2013). Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *48*, 373–396.
- Kowalczykowski, S.C. (2015). An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*.
- Krakhmal, N. V, Zavyalova, M. V, Denisov, E. V, Vtorushin, S. V, and Perelmuter, V.M. (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae* *7*, 17–28.
- Krejci, L., Van Komen, S., Li, Y., Villemain, J., Reddy, M.S., Klein, H., Ellenberger, T., and Sung, P. (2003). DNA helicase Srs2 disrupts the Rad51 presynaptic filament. *Nature* *423*, 305–309.
- Kumar, R., Bourbon, H.M., and De Massy, B. (2010). Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes Dev.* *24*, 1266–1280.
- L'Hôte, D., Vatin, M., Auer, J., Castille, J., Passet, B., Montagutelli, X., Serres, C., and Vaiman, D. (2011). Fidgetin-like1 is a strong candidate for a dynamic impairment of male meiosis leading to reduced testis weight in mice. *PLoS One* *6*, 1–12.
- Lai, J.S., and Herr, W. (1992). Ethidium bromide provides a simple tool for identifying genuine DNA-independent protein associations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 6958–6962.
- Lam, I., and Keeney, S. (2015). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *52*, 1–53.
- Lambert, S., and Lopez, B.S. (2000). Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J.* *19*, 3090–3099.
- Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M.P., Jasin, M., and Keeney, S. (2011). ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* *479*, 237–240.
- Längst, G., and Manelyte, L. (2015). Chromatin Remodelers: From Function to Dysfunction. *Genes (Basel)*. 299–324.
- Langston, L.D., and Donnell, M.O. (2008). DNA Polymerase  $\epsilon$  Is Highly Processive with Proliferating Cell Nuclear Antigen and Undergoes Collision Release upon Completing DNA \*  $\square$ . *J. Biol. Chem.* *283*, 29522–29531.
- Lao, J.P., Oh, S.D., Shinohara, M., Shinohara, A., and Hunter, N. (2008). Rad52 Promotes Postinvasion Steps of Meiotic Double-Strand-Break Repair. *Mol. Cell* *29*, 517–524.
- LaRocque, J.R., Stark, J.M., Oh, J., Bojilova, E., Yusa, K., Horie, K., Takeda, J., and Jasin, M. (2011). Interhomolog recombination and loss of heterozygosity in wild-type and Bloom syndrome helicase (BLM)-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11971–11976.
- Lee, J.Y., Terakawa, T., Qi, Z., Steinfeld, J.B., Redding, S., Kwon, Y., Gaines, W.A., Zhao, W., Sung, P., and Greene, E.C. (2015). Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases. *Science (80-. )*. *349*, 977–981.

- Li, X., and Heyer, W.D. (2009). RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *37*, 638–646.
- Li, J., Holzschu, D.L., and Sugiyama, T. (2013). PCNA is efficiently loaded on the DNA recombination intermediate to modulate polymerase  $\delta$ ,  $\eta$ , and  $\zeta$  activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 7672–7677.
- Li, X., Stith, C.M., Burgers, P.M., and Heyer, W.D. (2009). PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase  $\delta$ . *Mol. Cell* *36*, 704–713.
- Libby, B.J., De La Fuente, R., O'Brien, M.J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., Eaker, S., Handel, M.A., Eppig, J.J., and Schimenti, J.C. (2002). The mouse meiotic mutation *mei1* disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev. Biol.* *242*, 174–187.
- Lin, Y.-L., Chen, C., Keshav, K.F., Winchester, E., and Dutta, A. (1996). Dissection of Functional Domains of the Human DNA Replication Protein Complex Replication Protein A. *J. Biol. Chem.* *271*, 17190–17198.
- Lipkin, S.M., Moens, P.B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J.W., Green, E.D., et al. (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat. Genet.* *31*, 385–390.
- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: Spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* *118*, 699–713.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., and Heyer, W.-D. (2010). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1260–1262.
- Liu, J., Renault, L., Veaute, X., Fabre, F., Stahlberg, H., and Heyer, W.-D. (2011). Rad51 paralogues Rad55–Rad57 balance the antirecombinase Srs2 in Rad51 filament formation. *Nature* *479*, 245–248.
- Longhese, M.P., Plevani, P., and Lucchini, G. (1994). Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7884–7890.
- Lorenz, A., Osman, F., Sun, W., Nandi, S., Steinacher, R., and Whitby, M.C. (2012). The Fission Yeast FANCM Ortholog Directs Non-Crossover Recombination During Meiosis. *Science* (80-. ). *336*, 1585–1588.
- Lovett, S.T., and Mortimer, R.K. (1987). Characterization of null mutants of the RAD55 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: effects of temperature, osmotic strength and mating type. *Genetics* *116*, 547–553.
- Luo, M., Yang, F., Leu, N.A., Landaiche, J., Handel, M.A., Benavente, R., La Salle, S., and Wang, P.J. (2013). MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nat. Commun.* *4*, 1–12.
- Lynn, A., Soucek, R., and Börner, G.V. (2007). ZMM proteins during meiosis: Crossover artists at work. *Chromosom. Res.* *15*, 591–605.
- Maloisel, L., Bhargava, J., and Roeder, G. (2004). A Role for DNA Polymerase in Gene Conversion and Crossing Over During Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *167*, 1133–1142.
- Maloisel, L., Fabre, F., and Gangloff, S. (2008). DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 1373–1382.
- Malone, R.E., and Esposito, R.E. (1980). The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *77*, 503–507.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* *30*.
- Manhart, C.M., Ni, X., White, M.A., Ortega, J., Surtees, J.A., and Alani, E. (2017). The mismatch repair and meiotic recombination endonuclease Mlh1-Mlh3 is activated by polymer formation and can cleave DNA substrates in trans.
- Maréchal, A., and Zou, L. (2013a). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, 1–17.

- Maréchal, A., and Zou, L. (2013b). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Martinez, J.S., von Nicolai, C., Kim, T., Ehlén, Å., Mazin, A. V., Kowalczykowski, S.C., and Carreira, A. (2016). BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3515–3520.
- Mason, J.M., Dusad, K., Wright, W.D., Grubb, J., Budke, B., Heyer, W.D., Connell, P.P., Weichselbaum, R.R., and Bishop, D.K. (2015). RAD54 family translocases counter genotoxic effects of RAD51 in human tumor cells. *Nucleic Acids Res.* 43, 3180–3196.
- Mathiasen, D.P., and Lisby, M. (2014). Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 172–184.
- Matos, J., and West, S.C. (2014). Holliday junction resolution: Regulation in space and time. *DNA Repair (Amst)*. 19, 176–181.
- Mazin, A. V., Mazina, O.M., Bugreev, D. V., and Rossi, M.J. (2010). Rad54, the motor of homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. 9, 286–302.
- Mazina, O.M., Mazin, A. V., Nakagawa, T., Kolodner, R.D., and Kowalczykowski, S.C. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51: Implications for crossover control in meiotic recombination. *Cell* 117, 47–56.
- McIlwraith, M.J., and West, S.C. (2008). DNA Repair Synthesis Facilitates RAD52-Mediated Second-End Capture during DSB Repair. *Mol. Cell* 29, 510–516.
- McVey, M., Khodaverdian, V.Y., Meyer, D., Cerqueira, P.G., and Heyer, W.-D. (2016). Eukaryotic DNA Polymerases in Homologous Recombination. *Annu. Rev. Genet.* 50, 393–421.
- Mehta, A., and Haber, J.E. (2014). Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6.
- Mer, G., Bochkarev, A., Gupta, R., Bochkareva, E., Frappier, L., Ingles, C.J., Edwards, A.M., and Chazin, W.J. (2000). Structural Basis for the Recognition of DNA Repair Proteins UNG2, XPA, and RAD52 by Replication Factor RPA. *Cell* 103, 449–456.
- Mercier, R., Jolivet, S., Vezon, D., Huppe, E., Chelysheva, L., Giovanni, M., Nogué, F., Doutriaux, M.P., Horlow, C., Grelon, M., et al. (2005). Two meiotic crossover classes cohabit in *Arabidopsis*: One is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Curr. Biol.* 15, 692–701.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 1–13.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J.* 29, 3358–3369.
- Mimitou, E.P., Yamada, S., and Keeney, S. (2016). A global view of meiotic double-strand break end resection. *Science* (80- ).
- Mine-Hattab, J., and Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat Cell Biol* 14, 510–517.
- Moens, P.B., Kolas, N.K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P.E., and Spyropoulos, B. (2002). The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 115, 1611–1622.
- Moldovan, G.L., Dejsuphong, D., Petalcorin, M.I.R., Hofmann, K., Takeda, S., Boulton, S.J., and D'Andrea, A.D. (2012). Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI. *Mol. Cell* 45, 75–86.
- Morgan (1915). Mechanism of Mendelian Heredity.

- Morgan, D.O. (1997). CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines , Clocks , and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- Morimoto, A., Shibuya, H., Zhu, X., Kim, J., Ishiguro, K.I., Han, M., and Watanabe, Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J. Cell Biol.* *198*, 165–172.
- Morriscal, S.W. (2016). DNA-Pairing and Annealing Processes HR HDR. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, 1–20.
- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., and Rothstein, R. (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 10729–10734.
- Moses, M.J. (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *2*, 215–218.
- Moynahan, M.E., and Jasin, M. (2010). Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 196–207.
- Mullen, J.R., Nallaseth, F.S., Lan, Y.Q., Slagle, E., Brill, S.J., and Slagle, C.E. (2005). Yeast Rmi1 / Nce4 Controls Genome Stability as a Subunit of the Sgs1-Top3 Complex Yeast Rmi1 / Nce4 Controls Genome Stability as a Subunit of the Sgs1-Top3 Complex. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 4476–4487.
- Muris, D.F.R., Vreeken, K., Schmidt, H., Ostermann, K., Clever, B., Lohman, P.H.M., and Pastink, A. (1997). Homologous recombination in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Different requirements for the rhp51+, rhp54+ and rad22+ genes. *Curr. Genet.* *31*, 248–254.
- Murzin, a G. (1993). OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences. *EMBO J.* *12*, 861–867.
- De Muyt, A., Vezon, D., Gendrot, G., Gallois, J.-L., Stevens, R., and Grelon, M. (2007). AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* *26*, 4126–4137.
- De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., and Lichten, M. (2012). BLM Helicase Ortholog Sgs1 Is a Central Regulator of Meiotic Recombination Intermediate Metabolism. *Mol. Cell* *46*, 43–53.
- Nakagawa, T., and Kolodner, R.D. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 Is a DNA Helicase Involved in Meiotic Crossing Over. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3281–3291.
- Nakagawa, T., and Ogawa, H. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene , encoding a novel helicase-like protein , is required for crossover control in meiosis. *EMBO J.* *18*, 5714–5723.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* *43*, 525–558.
- New, J., Sugiyama, T., Zaitseva, E.M., and Kowalczykowski, S.C. (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* *391*.
- Newton, W.C.F., and Darlington, C.D. (1929). Meiosis in polyploids. *J. Genet.* *21*, 1–15.
- Nimonkar, A. V, Sica, R.A., and Kowalczykowski, S.C. (2009). Rad52 promotes second-end DNA capture in double-stranded break repair to form complement-stabilized joint molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 3077–3082.
- Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* *25*, 350–362.
- Ogawa, T., Yu, X., Shinohara, a, and Egelman, E.H. (1993). Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science* *259*, 1896–1899.
- Öğrünç, M., and Sancar, A. (2003). Identification and characterization of human MUS81-MMS4 structure-specific endonuclease. *J. Biol. Chem.* *278*, 21715–21720.

- Oh, S.D., Lao, J.P., Taylor, A.F., Smith, G.R., and Hunter, N. (2008). RecQ Helicase, Sgs1, and XPF Family Endonuclease, Mus81-Mms4, Resolve Aberrant Joint Molecules during Meiotic Recombination. *Mol. Cell* *31*, 324–336.
- Oliver-Bonet, M., Campillo, M., Turek, P.J., Ko, E., and Martin, R.H. (2007). Analysis of replication protein A (RPA) in human spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* *13*, 837–844.
- Olson, E., Nievera, C.J., Klimovich, V., Fanning, E., and Wu, X. (2006). RPA2 is a direct downstream target for ATR to regulate the S-phase checkpoint. *J. Biol. Chem.* *281*, 39517–39533.
- Osman, F., Dixon, J., Doe, C.L., and Whitby, M.C. (2003). Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: A role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol. Cell* *12*, 761–774.
- Osman, K., Sanchez-moran, E., Mann, S.C., Jones, G.H., and Franklin, F.C.H. (2009). Replication protein A (AtRPA1a) is required for class I crossover formation but is dispensable for meiotic DNA break repair. *EMBO J.* *28*, 394–404.
- Page, S.L., and Hawley, R.S. (2004). THE GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY OF THE SYNAPTONEMAL COMPLEX. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
- Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., and Lee, S.H. (1996). Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 18996–19000.
- Parvanov, E., H, T., Billings, T., Saxl, R., Spruce, C., Aithal, R., Krejci, L., Paigen, K., and Petkov, P. (2017). PRDM9 interactions with other proteins provide a link between recombination hotspots and the chromosomal axis in meiosis. *Mol. Biol. Cell* 1–26.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* *1*, 969–979.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* *25*, 1605–1612.
- Petukhova, G. V, Pezza, R.J., Vanevski, F., Ploquin, M., Masson, J.-Y., and Camerini-Otero, R.D. (2005). The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 449–453.
- Pezza, R.J., Voloshin, O.N., Volodin, A.A., Boateng, K.A., Bellani, M.A., Mazin, A. V., and Camerini-Otero, R.D. (2014). The dual role of HOP2 in mammalian meiotic homologous recombination. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2346–2357.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell* *1*, 697–705.
- Plug, A.W., Peters, A.H., Keegan, K.S., Hoekstra, M.F., de Boer, P., and Ashley, T. (1998). Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J. Cell Sci.* *111*, 413–423.
- Poulain, M., Frydman, N., Tourpin, S., Muczynski, V., Souquet, B., Benachi, A., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., and Livera, G. (2015). Corrigendum to Involvement of doublesex and mab-3- related transcription factors in human female germ cell development demonstrated by xenograft and interference RNA strategies [*Mol Hum Reprod.* *20*, (2014), 960-971]. *Mol. Hum. Reprod.* *21*, 615.
- Prakash, L., and Taillon-Miller, P. (1981). Effects of the rad52 gene on sister chromatid recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *3*, 247–250.
- Prakash, R., Satory, D., Dray, E., Papusha, A., Scheller, J., Kramer, W., Krejci, L., Klein, H., Haber, J.E., Sung, P., et al. (2009). Yeast Mph1 helicase dissociates Rad51-made D-loops: Implications for crossover control in mitotic recombination. *Genes Dev.* *23*, 67–79.

- Qiao, H., Prasada Rao, H.B.D., Yang, Y., Fong, J.H., Cloutier, J.M., Deacon, D.C., Nagel, K.E., Swartz, R.K., Strong, E., Holloway, J.K., et al. (2014). Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nat. Genet.* *46*, 194–199.
- Raderschall, E., Stout, K., Freier, S., Suckow, V., Schweiger, S., and Haaf, T. (2002). Elevated Levels of Rad51 Recombination Protein in Tumor Cells 1. *Cancer Res.* 219–225.
- Ranjha, L., Anand, R., and Cejka, P. (2014). The *Saccharomyces cerevisiae* Mlh1-Mlh3 heterodimer is an endonuclease that preferentially binds to holliday junctions. *J. Biol. Chem.* *289*, 5674–5686.
- Raynard, S., Bussen, W., and Sung, P. (2006). A double holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase III $\beta$ , and BLAP75. *J. Biol. Chem.* *281*, 13861–13864.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C.A., Hunt, P.A., Liebe, B., Scherthan, H., and Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* *6*, 555–562.
- Reynolds, A., Qiao, H., Yang, Y., Chen, J.K., Jackson, N., Biswas, K., Holloway, J.K., Baudat, F., de Massy, B., Wang, J., et al. (2013). RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. *Nat. Genet.* *45*, 269–278.
- Ribeiro, J., Abby, E., Livera, G., and Martini, E. (2016). RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* *125*, 265–276.
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A.G., Baarends, W.M., Van Sloun, P.P.H., Lohman, P.H.M., and Pastink, A. (1998). Targeted Inactivation of Mouse *RAD52* Reduces Homologous Recombination but Not Resistance to Ionizing Radiation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6423–6429.
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Guichard, V., Bourbon, H.-M., and de Massy, B. (2016a). The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* (80-. ). *351*, 943–949.
- Robert, T., Vrielynck, N., Mézard, C., de Massy, B., and Grelon, M. (2016b). A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* *54*, 165–176.
- Rogacheva, M. V., Manhart, C.M., Chen, G., Guarne, A., Surtees, J., and Alani, E. (2014). Mlh1-Mlh3, a meiotic crossover and DNA mismatch repair factor, is a Msh2-Msh3-stimulated endonuclease. *J. Biol. Chem.* *289*, 5664–5673.
- Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D.D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol. Cell* *6*, 975–987.
- Romanova, L.Y., Willers, H., Blagosklonny, M. V., and Powell, S.N. (2004). The interaction of p53 with replication protein A mediates suppression of homologous recombination. *Oncogene* *23*, 9025–9033.
- Ross-Macdonald, P., and Roeder, G.S. (1994). Mutation of a meiosis-specific MutS homolog decreases crossing over but not mismatch correction. *Cell* *79*, 1069–1080.
- La Salle, S., Palmer, K., O'Brien, M., Schimenti, J.C., Eppig, J., and Handel, M.A. (2012). Spata22, a Novel Vertebrate-Specific Gene, Is Required for Meiotic Progress in Mouse Germ Cells. *Biol. Reprod.* *86*, 45–45.
- Santocanale, C., Neecke, H., Longhese, M.P., Lucchini, G., and Plevani, P. (1995). Mutations in the gene encoding the 34 kDa subunit of yeast replication protein A cause defective S phase progression. *J. Mol. Biol.* *254*, 595–607.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.
- Schaetzlein, S., Chahwan, R., Avdievich, E., Roa, S., Wei, K., Eoff, R.L., Sellers, R.S., Clark, A.B., Kunkel, T.A., Scharff, M.D., et al. (2013). Mammalian Exo1 encodes both structural and catalytic functions that play distinct roles in essential biological processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E2470–E2479.
- Scherthan, H. (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 621–627.

- Schild, D., and Byers, B. (1978). Meiotic effects of DNA-defective cell division cycle mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* *70*, 109–130.
- Schwacha, A., and Kleckner, N. (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: Meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* *90*, 1123–1135.
- Séguéla-Arnaud, M., Crismani, W., Larchevêque, C., Mazel, J., Froger, N., Choinard, S., Lemhemdi, A., Macaisne, N., Van Leene, J., Gevaert, K., et al. (2015). Multiple mechanisms limit meiotic crossovers: TOP3 $\alpha$  and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 4713–4718.
- Shah, P.P., Zheng, X., Epshtein, A., Carey, J.N., Bishop, D.K., and Klein, H.L. (2010). Swi2/Snf2-related translocases prevent accumulation of toxic Rad51 complexes during mitotic growth. *Mol. Cell* *39*, 862–872.
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.-S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* *386*, 804–810.
- Sharan, S.K., Pyle, A., Coppola, V., Babus, J., Swaminathan, S., Benedict, J., Swing, D., Martin, B., Tessarollo, L., Evan, J., et al. (2004). BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* *131*, 131–142.
- Shi, W., Feng, Z., Zhang, J., Gonzalez-Suarez, I., Vanderwaal, R.P., Wu, X., Powell, S.N., Roti Roti, J.L., Gonzalo, S., and Zhang, J. (2010). The role of RPA2 phosphorylation in homologous recombination in response to replication arrest. *Carcinogenesis* *31*, 994–1002.
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genoio, M.M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., et al. (2014). DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. *Mol. Cell* *53*, 7–18.
- Shibuya, H., and Watanabe, Y. (2014). The meiosis specific modification of mammalian telomeres. *Cell Cycle* *13*, 2024–2028.
- Shibuya, H., Ishiguro, K., and Watanabe, Y. (2014). The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis. *Nat. Cell Biol.* *16*, 145–156.
- Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* *69*, 457–470.
- Shinohara, A., Shinohara, M., Ohta, T., Matsuda, S., and Ogawa, T. (1998). Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes to Cells* *3*, 145–156.
- Shinohara, M., Shita-Yamaguchi, E., Buerstedde, J.M., Shinagawa, H., Ogawa, H., and Shinohara, A. (1997). Characterization of the roles of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 gene and a homologue of RAD54, RDH54/TID1, in mitosis and meiosis. *Genetics* *147*, 1545–1556.
- Shiohama, Y., Ohtake, J., Ohkuri, T., Noguchi, D., Togashi, Y., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2014). Identification of a meiosis-specific protein, MEIOB, as a novel cancer/testis antigen and its augmented expression in demethylated cancer cells. *Immunol. Lett.* *158*, 175–182.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., et al. (2014). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* *7*, 539–539.
- Simandlova, J., Zagelbaum, J., Payne, M.J., Chu, W.K., Shevelev, I., Hanada, K., Chatterjee, S., Reid, D.A., Liu, Y., Janscak, P., et al. (2013). FBH1 helicase disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 34168–34180.
- Simchen, G., Idar, D., and Kassir, Y. (1976). Recombination and hydroxyurea inhibition of DNA synthesis in yeast meiosis. *MGG Mol. Gen. Genet.* *144*, 21–27.

- Singh, T.R., Ali, A.M., Busygina, V., Raynard, S., Fan, Q., Du, C., Andreassen, P.R., Sung, P., and Meetei, A.R. (2008). OB-fold-containing protein , is an essential component of the Bloom helicase – double Holliday junction dissolvasome. *Genes Dev.* *22*, 2856–2868.
- Smith, A. V., and Roeder, G.S. (1997). The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes. *J. Cell Biol.* *136*, 957–967.
- Sneeden, J.L., Grossi, S.M., Tappin, I., Hurwitz, J., and Heyer, W.D. (2013). Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4913–4925.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., and Fishel, R. (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes holliday junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol. Cell* *15*, 437–451.
- Sobol, R.W., and Wilson, S.H. (2001). Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *68*, 57–74.
- Solinger, J.A., Kiiianitsa, K., and Heyer, W.D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol. Cell* *10*, 1175–1188.
- Sommermeier, V., Béneut, C., Chaplais, E., Serrentino, M.E., and Borde, V. (2013). Spp1, a Member of the Set1 Complex, Promotes Meiotic DSB Formation in Promoters by Tethering Histone H3K4 Methylation Sites to Chromosome Axes. *Mol. Cell* *49*, 43–54.
- Sommers, J.A., Rawtani, N., Gupta, R., Bugreev, D. V., Mazin, A. V., Cantor, S.B., and Brosh, R.M. (2009). FANCI uses its motor ATPase to destabilize protein-DNA complexes, unwind triplexes, and inhibit RAD51 strand exchange. *J. Biol. Chem.* *284*, 7505–7517.
- Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., and Livera, G. (2012). Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology* *153*, 2466–2473.
- Souquet, B., Abby, E., Hervé, R., Finsterbusch, F., Tourpin, S., Le Bouffant, R., Duquenne, C., Messiaen, S., Martini, E., Bernardino-Sgherri, J., et al. (2013). MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination. *PLoS Genet.* *9*.
- Soustelle, C., Vedel, M., Kolodner, R., and Nicolas, a (2002). Replication protein A is required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *161*, 535–547.
- Spies, M., and Fishel, R. (2015). Mismatch Repair during Homologous and Homeologous Recombination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1–22.
- Spies, J., Waizenegger, A., Barton, O., Su, M., Wright, W.D., Heyer, W., Lo, M., Spies, J., Waizenegger, A., Barton, O., et al. (2016). Nek1 Regulates Rad54 to Orchestrate Homologous Recombination and Replication Fork Stability Article Nek1 Regulates Rad54 to Orchestrate Homologous Recombination and Replication Fork Stability. *Mol. Cell* 903–917.
- Spiller, C.M., Bowles, J., and Koopman, P. (2012). Regulation of germ cell meiosis in the fetal ovary. *Int. J. Dev. Biol.* *787*, 779–787.
- Stanzione, M., Baumann, M., Papanikos, F., Dereli, I., Lange, J., Ramlal, A., Tränkner, D., Shibuya, H., de Massy, B., Watanabe, Y., et al. (2016). Meiotic DNA break formation requires the unsynapsed chromosome axis-binding protein IHO1 (CCDC36) in mice. *Nat. Cell Biol.* *18*, 1208–1220.
- Stauffer, M.E., and Chazin, W.J. (2004). Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* *279*, 25638–25645.
- Stavnezer, J., Guikema, J.E., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 1–31.
- Sugiyama, T., Zaitseva, E.M., and Kowalczykowski, S.C. (1997). A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J. Biol. Chem.* *272*, 7940–7945.

- Sugiyama, T., New, J.H., and Kowalczykowski, S.C. (1998). DNA annealing by Rad52 Protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 6049–6054.
- Sun, J., Lee, K., Davis, A.J., and Chen, D.J. (2012). Human Ku70 / 80 Protein Blocks Exonuclease 1-mediated DNA Resection in the Presence of Human Mre11 or Mre11 / Rad50 Protein Complex \* □. *J. Biol. Chem.* *287*, 4936–4945.
- Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* (80-. ). *265*, 1241–1243.
- Sung, P. (1997a). Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.* *11*, 1111–1121.
- Sung, P. (1997b). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J. Biol. Chem.* *272*, 28194–28197.
- Sung, P., and Robberson, D.L. (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* *82*, 453–461.
- Suwaki, N., Klare, K., and Tarsounas, M. (2011). RAD51 paralogs: Roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 898–905.
- Suzuki, T., Yasu, M., and Honma, M. (2016). Mutator Phenotype and DNA Double-Strand Break Repair in BLM Helicase-Deficient Human Cells. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 2877–2889.
- Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O’Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. *Cell* *138*, 63–77.
- Sym, M., Engebrecht, J., and Roeder, G.S. (1993). ZIP1 is a synaptonemal complex protein required for meiotic chromosome synapsis. *Cell* *72*.
- Symington, L.S. (2014). End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *52*, 291–315.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S. (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 2858–2866.
- Tang, S., Wu, M.K.Y., Zhang, R., and Hunter, N. (2015). Pervasive and essential roles of the top3-rmi1 decatenase orchestrate recombination and facilitate chromosome segregation in meiosis. *Mol. Cell* *57*, 607–621.
- Toledo, L.I., Altmeyer, M., Rask, M.B., Lukas, C., Larsen, D.H., Povlsen, L.K., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Bartek, J., and Lukas, J. (2014). ATR prohibits replication catastrophe by preventing global exhaustion of RPA. *Cell* *156*, 374.
- Touati, S.A., and Wassmann, K. (2016). How oocytes try to get it right: spindle checkpoint control in meiosis. *Chromosoma* *125*, 321–335.
- Tsubouchi, H., and Roeder, G.S. (2002). The Mnd1 Protein Forms a Complex with Hop2 To Promote Homologous Chromosome Pairing and Meiotic Double-Strand Break Repair The Mnd1 Protein Forms a Complex with Hop2 To Promote Homologous Chromosome Pairing and Meiotic Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3078–3088.
- Tsubouchi, H., and Roeder, G.S. (2004). The budding yeast Mei5 and Sae3 proteins act together with Dmc1 during meiotic recombination. *Genetics* *168*, 1219–1230.
- Tsubouchi, H., and Roeder, G.S. (2006). Budding yeast Hed1 down-regulates the mitotic recombination machinery when meiotic recombination is impaired. *Genes Dev.* *20*, 1766–1775.
- Umez, K., Sugawara, N., Chen, C., Haber, J.E., and Kolodner, R.D. (1998). Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. *Genetics* *148*, 989–1005.

- Vassin, V.M., Anantha, R.W., Sokolova, E., Kanner, S., and Borowiec, J.A. (2009). Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. *J. Cell Sci.* *122*, 4070–4080.
- Veaute, X., Jeusset, J., Soustelle, C., Kowalczykowski, S.C., Le Cam, E., and Fabre, F. (2003). The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* *423*, 309–312.
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., Mézard, C., Mayer, C., Grelon, M., Massy, B. de, et al. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* *351*, 939–943.
- Vries, F.A.T. De, Boer, E. De, Bosch, M. Van Den, Baarends, W.M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J., Zeeland, A. a Van, Heyting, C., Pastink, A., et al. (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev.* *1376–1389*.
- De Vries, S.S., Baart, E.B., Dekker, M., Siezen, A., De Rooij, D.G., De Boer, P., and Te Riele, H. (1999). Mouse MutS-like protein Msh5 is required for proper chromosome synapsis in male and female meiosis. *Genes Dev.* *13*, 523–531.
- Wang, X., and Haber, J.E. (2004). Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair. *PLoS Biol.* *2*, 104–112.
- Wang, C., Gu, Y., Zhang, K., Xie, K., Zhu, M., Dai, N., Jiang, Y., Guo, X., Liu, M., Dai, J., et al. (2016a). Systematic identification of genes with a cancer-testis expression pattern in 19 cancer types. *Nat. Commun.* *7*, 10499.
- Wang, T.-F., Kleckner, N., and Hunter, N. (1999). Functional specificity of MutL homologs in yeast: Evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 13914–13919.
- Wang, X., Wang, H., Guo, B., Zhang, Y., Gong, Y., Zhang, C., Xu, H., and Wu, X. (2016b). *Gen1* and *Eme1* Play Redundant Roles in DNA Repair and Meiotic Recombination in Mice. *DNA Cell Biol.* *35*, 585–590.
- Wang, Y., Putnam, C.D., Kane, M.F., Zhang, W., Edelman, L., Russell, R., Carrión, D. V, Chin, L., Kucherlapati, R., Kolodner, R.D., et al. (2005). Mutation in Rpa1 results in defective DNA double-strand break repair, chromosomal instability and cancer in mice. *Nat. Genet.* *37*, 750–755.
- Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* *400*, 461–464.
- Watanabe, Y., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Nurse, P. (2001). Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature* *409*, 359–363.
- Wei, K., Clark, A.B., Wong, E., Kane, M.F., Mazur, D., Parris, T., Kolas, N., Russell, R., Kneitz, R.B., Kunkel, T. a, et al. (2003). Mutation of Exonuclease 1 results in DNA mismatch repair defects, male and female sterility and increased cancer susceptibility in older mice. *Genes Dev* *17*, 603–614.
- Wesoly, J., Agarwal, S., Sigurdsson, S., Bussen, W., Komen, S. Van, Qin, J., Steeg, H. Van, Benthem, J. Van, Wassenaar, E., Baarends, W.M., et al. (2006). Differential contributions of mammalian Rad54 paralogs to recombination, DNA damage repair, and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 976–989.
- Whitehurst, A.W. (2014). Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *54*, 251–272.
- Winters, T., McNicoll, F., and Jessberger, R. (2014). Meiotic cohesin STAG3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *EMBO J.* *33*, 1256–1270.
- Wold, M.S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* *66*, 61–92.
- Wold, M.S., and Kelly, T. (1988). Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 2523–2527.

- Wong, N., Chen, H., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Bunting, S.F., Calle, E., Feldhahn, N., Fernandez-capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1 -Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* 243–254.
- Wu, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426, 870–874.
- Wu, L., Bachrati, C.Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G.W., and Hickson, I.D. (2006). BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4068–4073.
- Wyatt, H.D.M., Sarbajna, S., Matos, J., and West, S.C. (2013). Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for holliday junction resolution in human cells. *Mol. Cell* 52, 234–247.
- Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F.J., and Livingston, D.M. (2006). Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. *Mol. Cell* 22, 719–729.
- Xu, D., Guo, R., Sobock, A., Bachrati, C.Z., Yang, J., Enomoto, T., Brown, G.W., Hoatlin, M.E., Hickson, I.D., and Wang, W. (2008). RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev.* 22, 2843–2855.
- Xu, Y., Greenberg, R.A., Schonbrunn, E., and Wang, P.J. (2017). Meiosis-specific Proteins MEIOB and SPATA22 Cooperatively Associate with the ssDNA-binding RPA Complex and DNA Double-strand Breaks†. *Biol. Reprod.*
- Yamada-inagawa, T., Klar, A.J.S., and Dalgaard, J.Z. (2007). *Schizosaccharomyces pombe* Switches Mating Type by the Synthesis-Dependent Strand-Annealing Mechanism. *Genetics* 265, 255–265.
- Yang, F., De La Fuente, R., Leu, N.A., Baumann, C., McLaughlin, K.J., and Wang, P.J. (2006). Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *J. Cell Biol.* 173, 497–507.
- Yang, F., Gell, K., Heijden, G.W. Van Der, Eckardt, S., Leu, N.A., Page, D.C., Benavente, R., Her, C., Höög, C., McLaughlin, K.J., et al. (2008). Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. 682–691.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., and Morita, T. (1998). The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1, 707–718.
- Yoshida, M., Katsuyama, S., Tateho, K., Nakamura, H., Miyoshi, J., Ohba, T., Matsuhara, H., Miki, F., Okazaki, K., Haraguchi, T., et al. (2013). Microtubule-organizing center formation at telomeres induces meiotic telomere clustering. *J. Cell Biol.* 200, 385–395.
- Yuan, J., and Chen, J. (2013). FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 10640–10645.
- Yuan, L., Liu, J.-G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., and Höög, C. (2000). The Murine SCP3 Gene Is Required for Synaptonemal Complex Assembly, Chromosome Synapsis, and Male Fertility. *Mol. Cell* 5, 73–83.
- Yuan, S.S.F., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E., and Lee, E.Y.H.P. (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* 59, 3547–3551.
- Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P.Y.H., Boiteux, S., and Hunter, N. (2010). Temporally and Biochemically Distinct Activities of Exo1 during Meiosis: Double-Strand Break Resection and Resolution of Double Holliday Junctions. *Mol. Cell* 40, 1001–1015.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., and Hunter, N. (2012). Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell* 149, 334–347.

Zhao, W., Vaithiyalingam, S., San Filippo, J., Maranon, D.G., Jimenez-Sainz, J., Fontenay, G. V., Kwon, Y., Leung, S.G., Lu, L., Jensen, R.B., et al. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Mol. Cell* *59*, 176–187.

Zhu, Z., Chung, W.H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 Helicase and Two Nucleases Dna2 and Exo1 Resect DNA Double-Strand Break Ends. *Cell* *134*, 981–994.

Zou, L., and Elledge, S. (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* (80-. ). *300*, 1542–1548.