



HAL
open science

Etude du rôle de MEIOB et SPATA22, protéines essentielles à la recombinaison méiotique

Cynthia Petrillo

► **To cite this version:**

Cynthia Petrillo. Etude du rôle de MEIOB et SPATA22, protéines essentielles à la recombinaison méiotique. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7154 . tel-03272596

HAL Id: tel-03272596

<https://theses.hal.science/tel-03272596>

Submitted on 28 Jun 2021

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

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

Université de Paris

Ecole doctorale BioSPC 562

Laboratoire de Développement des Gonades

Etude du rôle de MEIOB et SPATA22, protéines essentielles à la recombinaison méiotique

Par Cynthia PETRILLO

Thèse de doctorat de biologie

Dirigée par Gabriel LIVERA et Emmanuelle MARTINI

Présentée et soutenue publiquement le 14/10/2020

Devant un jury composé de :

Président du jury : **Grelon**, Mathilde / Dr. / Institut Jean-Pierre Bourgin

Rapporteur : **Zinn-Justin**, Sophie / Dr. / Institut de Biologie Intégrative de la cellule

Rapporteur : **Espagne**, Eric / Dr. / Institut de Biologie Intégrative de la cellule

Examineur : **Dupaigne**, Pauline / Dr. / Institut Gustave Roussy

Examineur : **De Muyt**, Arnaud / Dr. / Institut Curie Paris

Directeur de thèse : **Livera**, Gabriel / Pr. / Institut de Biologie François Jacob

Co-directeur de thèse : **Martini**, Emmanuelle / Dr. / Institut de Biologie François Jacob

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Développement des Gonades
(LDG)

Dirigé par Gabriel Livera

Unité mixte de recherche - Stabilité génétique, cellules souches et radiations
CEA- Université de Paris - Université Paris Sud
Dirigée par François Boussin

Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (IRCM)
Directeur Paul-Henri-Roméo

Direction de la Recherche Fondamentale, Institut de Biologie François Jacob
Centre CEA de Fontenay-aux-Roses
18, route du Panorama
BP6
92 265 Fontenay-aux-Roses, France

CEA/DRF/IBFJ/IRCM/LDG

« Vous oublier c'est s'oublier soi-même »

Pensée des morts, Lamartine

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 cette aventure.

Merci au Docteur **Mathilde Grelon** d'avoir consenti à présider mon jury de thèse.

Merci aux Docteurs **Sophie Zinn-Justin** et **Eric Espagne** pour avoir assumé la charge d'être mes rapporteurs de thèse.

Merci également aux Docteurs **Pauline Dupaigne** et **Arnaud De Muyt** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je remercie enfin le Docteur **Emmanuelle Martini** et le Professeur **Gabriel Livera** pour m'avoir co-encadrée et conseillée tout au long de ma thèse.

Remerciements

Merci **Gabriel**, pour ton accueil, tes conseils et ta bienveillance. Je n'oublierai pas le temps que tu m'as consacré pour m'aider et m'orienter au cours de ma thèse. J'ai eu plaisir à interagir avec toi, à apprendre de ton expérience et de ta sagesse. Sincèrement merci pour le soutien que tu m'as accordé, et surtout merci pour ton sens de l'humour que tu partages avec chacun d'entre nous dans ton équipe !

Merci **Emmanuelle**, de m'avoir permis de réaliser cette thèse à tes côtés. Tu as cru à mes capacités et tu m'as donné les meilleures chances pour que ces travaux de thèse aboutissent. J'ai énormément grandi sur le plan scientifique et humain grâce à tes conseils. J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi. Tu m'as consacré tellement de temps à m'expliquer et à me transmettre ton savoir, et pour ça je t'en suis très reconnaissante. Je te remercie aussi pour toutes les fois où tu m'as poussé à me dépasser, à m'améliorer et à ne pas lâcher dans les moments difficiles ! Merci, sincèrement.

Merci **Virginie**, pour ta gentillesse, ton soutien et tes mots si réconfortants. Tu incarnes la bienveillance, une bienveillance qui m'a beaucoup apporté dans les moments difficiles. Tu es la « maman » du LDG et de tous ses petits !

Merci **Justine**, pour tes conseils et tes encouragements ! Tu as toujours été très disponible, pédagogue et bienveillante envers moi. J'ai énormément appris à la fois sur le plan technique que théorique, sincèrement merci !

Merci **Laura**, j'ai rencontré bien plus qu'une amie, une véritable sœur. Sei sempre stata presente nei momenti difficili. Grazie della tua pazienza, dei tuoi consigli e di tutto il sopporto che mi hai dimostrato durante questa tesi. Grazie per tutte le nostre discussioni e le risate insieme. Ti sarò sempre vicina a te e la piccola Sélénie. Ma thèse se termine, mais notre amitié continue.

Merci **Sébastien**, pour toutes nos discussions en pause-café et à nos moments de rigolade ! Merci pour ton soutien, sincèrement. J'ai eu beaucoup d'épreuves à traverser au cours de cette thèse et tu m'as souvent remotivé, tu as su voir le positif pour me redonner le sourire. Je te remercie aussi énormément pour ton travail avec moi en cytométrie, ton implication et tes conseils ! Sei un vero amico, grazie di tutto.

Merci à **Delphine** et **Cécile**, mes super collègues de bureau ! Merci Delphine de m'avoir accueillie et de m'avoir supporté pendant mes instants « karaokés » ou de « rallages ». Merci Cécile pour toutes nos discussions scientifiques et humaines, pour ta vision de la vie que j'apprécie tant. Merci à vous deux pour votre soutien et votre gentillesse.

Merci **Jonathan**, tu m'as tant appris et avec énormément de patience. Tu es quelqu'un que j'apprécie énormément. Merci d'avoir été un mentor et d'avoir été présent pour les joies et les peines. J'espère que nos chemins se croiseront à nouveau.

Merci à **Morgane** et **Pauline**, vous m'avez apporté beaucoup ces derniers mois. Une très belle rencontre avec vous ! Vous êtes: belles, intelligentes, tellement cool, humaines ! De beaux instants de papotage entre filles et dégustation de cocktails. Je suis certaine que malgré mon départ on continuera nos moments entre filles.

Merci **Muriel**, pour la pertinence de tes remarques et ta sympathie.

Vincent et **Gabi**, bon courage à vous pour vos publications et pour la fin de thèse ! Vincent, félicitations pour la naissance de ton enfant. Gabi, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Merci à **Cathy** et **Amandine**, pour votre joie de vivre ! A vous de reprendre le flambeau pour l'organisation du journal club !

Merci à **Vilma** et à **Didier**, pour votre implication dans les différents projets.

Merci à **Aurélie** et **Arielle** pour leur soutien dans les nombreux soucis administratifs.

Merci à tous les anciens **Sonia**, **Nour**, **Juliette**, **Leïla**, **Andrea**.

Merci à **Quentin** et **Brahim**. Quentin, une superbe rencontre et un vrai ami ! Brahim, plein de moments de joies et de conseils perso et scientifiques, ne change pas !

Merci à ma **famille**, ma lumière dans le noir. Je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui sans vous, sans votre amour. Maman, mon héroïne. Papa, mon lien profond. Ma sœur, mon soutien et mon exemple. Au petit dernier de la famille, Alessandro, qui commence à faire ses premiers pas. A mon beau-frère, toujours souriant.

Merci à mes meilleures amies **Fanny, Maud et Elise** pour tous nos beaux moments d'amitié et surtout de votre soutien en toutes circonstances.

Merci à celui qui me supporte au quotidien, qui me redonne le sourire et qui me traite comme une princesse. Merci d'avoir été si compréhensif ces derniers mois.

Etude du rôle de MEIOB et SPATA22, protéines essentielles à la recombinaison méiotique

Conservé chez les eucaryotes, la recombinaison homologue est essentielle à la formation des cross-overs indispensables à l'appariement et à la ségrégation des chromosomes au cours de la méiose. La recombinaison méiotique est régulée par l'action combinée de facteurs ubiquitaires et méiotiques spécifiques. SPATA22 et son partenaire MEIOB, tous deux méiotiques spécifiques, sont essentielles à la réparation des cassures doubles brins (CDB) de l'ADN au cours de la recombinaison méiotique. Ils interagissent avec RPA, le complexe ubiquitaire majeur de liaison à l'ADN simple brin, dans la progression et spécialisation de la recombinaison en méiose. Ils s'expriment aussi anormalement dans certains cancers chez l'Homme et sont ainsi désignés gènes Cancer Testis Antigens (CTA).

D'une part, nous avons cherché à spécifier le rôle de SPATA22 à travers l'étude d'un nouveau mutant ponctuel (*shani*) de *Spata22* chez la souris. Le mutant *shani* arbore un phénotype similaire aux souris nulles *Spata22*^{-/-} ou *Meiob*^{-/-} : la réparation incomplète des CDBs induit un arrêt des cellules germinales en prophase I induisant de l'apoptose et la stérilité. La mutation *shani* se situe sur un exon codant de *Spata22* et aboutit à l'épissage incorrect du transcrite et une absence de détection protéique. Nous proposons que la mutation *shani* altère une séquence exonique activatrice de l'épissage, un ESE (Exonic Splicing Enhancer), du transcrite de *Spata22*. A notre connaissance, il s'agit de la première description d'un élément ESE d'un gène méiotique murin.

D'autre part, nous avons cherché à déterminer l'influence potentielle de l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 dans les cancers. A partir des données transcriptomiques en libre accès, nous avons pu observer que certaines tumeurs et lignées cellulaires expriment conjointement MEIOB et SPATA22 suggérant une possible fonctionnalité du complexe. Nos données préliminaires indiquent que MEIOB et SPATA22 semblent impacter la reprise de prolifération des cellules qui les expriment transitoirement. Des lignées cellulaires stables inductibles pour l'expression de MEIOB et SPATA22 sont en cours de réalisation afin d'étudier par la suite la survie/prolifération, la réparation de l'ADN et l'instabilité génétique en présence de MEIOB et SPATA22 dans ce contexte.

Mots clés : SPATA22, MEIOB, recombinaison homologue, méiose, cancer

Roles of MEIOB and SPATA22, two essential proteins for meiotic recombination

Conserved among eukaryotes, homologous recombination is essential for the formation of cross-overs that are mandatory for pairing and chromosomes segregation during meiosis. Meiotic recombination is regulated by the combined action of ubiquitous and meiotic specific factors. SPATA22 and its meiotic-specific partner MEIOB are essential for the repair of DNA double strand breaks (DSB) during meiotic recombination. They interact with RPA, the major ubiquitous single-stranded DNA binding complex, in the progression and specialization of meiotic recombination. They are also expressed ectopically in some human cancers and are thus referred as Cancer Testis Antigens (CTA).

First, we sought to specify the role of SPATA22 through the study of a novel point mutant (*shani*) of *Spata22* in mice. *shani* mutant mice phenocopy *Spata22*-null and *Meiob*-null mice: unrepaired DSBs lead to meiotic prophase arrest, apoptosis and sterility. The *shani* mutation lies within a *Spata22* coding exon and leads to incorrect splicing of *Spata22* mRNA resulting in no detectable protein. We propose that the *shani* mutation alters an exonic splicing enhancer element (ESE) within the *Spata22* transcript. To our knowledge, this is the first description of an ESE element in a meiotic murine gene.

Then, we sought to determine the putative role of the ectopic expression of MEIOB and SPATA22 in some cancers. We analysed open access transcriptomic data and observed that MEIOB and SPATA22 are co-expressed in some tumors and cancer cell lines, suggesting a potential functionality of MEIOB-SPATA22. Our preliminary results suggest that MEIOB and SPATA22 modify cell proliferation when expressed transiently. We are developing stable inducible cell lines for the expression of MEIOB and SPATA22 in order to further study cell proliferation, DNA repair and genetic instability.

Keywords: SPATA22, MEIOB, homologous recombination, meiosis, cancer

Liste des abréviations

5

53BP1 - p53 Binding Protein 1

A

ADN - acide désoxyribonucléique
ADNdb - ADN double brin
ADNsb - *ADN simple brin*
ALT - Alternative Lengthening of Telomeres
ARN - acide ribonucléique
ATM - Ataxia-Telangiectasia Mutated
ATP - *adénosine triphosphate*
ATRIP - *ATR-interacting protein*

B

BER - *réparation par excision de base*
BIR - *Break Induced Repair*
BLM - *Bloom syndrome protein*
bp - *paire de base*
BRCA - *Breast Cancer*
BTR - *BLM-TOPIII α -RMI1/2*

C

CDB - *cassure double brin*
CDK - *Cycline dependante des kinases*
CHEK1, 2 - *Checkpoint Kinase 1, 2*
CMG - *complexe Cdc45-MCM-GINS*
CO - *cross-over*
CS - *complexe synaptonémal*
CTA - *Cancer Testis Antigens*
CtIP - *C-terminal Binding Protein (CtBP) Interacting Protein*
CXXC1 - *CXXC Finger Protein 1*

D

DBD - *DNA binding domain*
DDR - *DNA Damage Response*
dJH - *double jonction de Holliday*
D-loop - *Displacement Loop*
DNA2 - *DNA replication helicase/nuclease 2*
DSS1 - *deleted in spilt hand/spilt foot protein*

E

EA - *élément axial*
EC - *élément central*
EL - *élément latéral*
EME1 - *Essential Meiotic structure-specific Endonuclease 1*
ENU - *N-ethyl-N-nitrosourea*
ET - *élément transverse*
EXO1 - *exonucléase 1*

F

FANCI - *Fanconi anemia group I protein*
FANCM - *Fanconi anemia group M protein*
FANCN - *Fanconi anemia group N protein*
FBH1 - *F-box DNA helicase 1*
FIGL1 - *FIDGETIN-LIKE-1*
FIGNL - *Fidgetin-like protein 1*
FLIP - *FIDGETIN-LIKE-1 INTERACTING PROTEIN*

G

GEN1 - *Gen Endonuclease Homolog 1*
GFP - *Green Fluorescent Protein*

H

H2A.X - *variant X de l'histone H2A*
HEI10 - *Human Enhancer of Invasion clone 10*
HELQ - *Helicase POLQ-like*
HFM1 - *Helicase Family Member 1*
HOP2 - *Homologous-pairing protein 2 homolog*
HORMAD 1, 2 - *HORMA Domain containing 1, 2*
HROB - *Homologous Recombination factor with OB domain*
HSF2BP - *Heat Shock Factor 2 Binding Protein*
HUS1 - *Checkpoint protein HUS1*

I

IHO1 - *Interactor of HORMAD1 protein 1*
IOP - *insuffisance ovarienne prématurée*

M

MAGE - *Melanoma Antigen*
MCM8 - *Minichromosome maintenance 8*
MCM9 - *Minichromosome maintenance 9*
MDC1 - *Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*
MEI4 - *MEiosis-specific 4*
MEILB2 - *Meiotic Localizer of BRCA2*

MEIOB · *Meiosis specific with OB domains*
Mer3 · *MEiotic Recombination 3*
MLH · *MutL Homolog*
MMR · *mismatch repair*
MND1 · *Meiotic nuclear division protein 1 homolog*
MRE11 · *Meiotic Recombination 11*
MRN · *MRE11-RAD50-NBS1*
MSH · *MutS Homolog*
MUS81 · *MMS and UV Sensitive 81*
MutL γ · *MLH1-MLH3*
MutLa · *MLH1-PMS2*
MutL β · *MLH1-PMS1*
MutS γ · *MSH4-MSH5*
MutSa · *MSH2-MSH6*
MutS β · *MSH2-MSH3*

N

NBS1 · *Nibrin, Nijmegen Breakage Syndrome 1*
NCO · *Non Cross-Over*
NER · *nucleotide excision repair, réparation par excision de nucléotides*
NHEJ · *non homologous end-joining*
nt · *nucléotide*

P

PALB2 · *Partner and localizer of BRCA2*
PCNA · *Proliferating Cell Antigen A*
PIKK · *Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases*
PLK1 · *Polo Like Kinase 1*
PMS1, 2 · *Postmeiotic Segregation Increased 1, 2*
PRDM9 · *PR domain-containing protein 9*

R

RAD · *RADiation sensitive*
RAD21L · *Radiation sensitive 21-like*
RAD51 · *RADiation sensitive 51*
RAD51B, C, D · *RAD51 Paralog B, C, D*
REC114 · *RECombination 114*
REC8 · *Recombination 8*
RECQ1, 5 · *DNA helicase RecQ-like 1, 5*
RFC · *Replication Factor C*
RH · *recombinaison homologue*
RMI1, 2 · *RecQ-mediated genome instability protein 1, 2*
RNF · *Ring Finger Protein*
RPA · *Replication Protein A*

S

SA · *stromalines*

SA1 · *Stromal Antigen 1*
SA2 · *Stromal Antigen 2*
SDSA · *Synthesis-Dependent Strand Annealing*
SEC · *second-end capture*
SHOC1 · *Shortage in chiasmata 1*
SIX6OS1 · *SIX6 Opposite Strand Transcript 1*
SLX · *Synthetic Lethal of unknown (X) function*
SMARCAL1 · *SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1*
SMC · *Structural Maintenance of Chromosomes*
SPATA22 · *Spermatogenesis associated 22*
SPO11 · *SPOrulation 11*
Spo16 · *SPOrulation 16*
SSB · *Single Strand Binding protein*
SV40 · *virus simien 40*
SVF · *sérum de veau foetal*
SWS1 · *SWIM domain-containing and Srs2-interacting protein 1 homolog*
SWSAP · *SWS1-associated protein 1*
SYCE1, 2, 3 · *Synaptonemal Complex Central Element protein 1, 2, 3*
SYCP1, 2, 3 · *Synaptonemal Complex Protein 1, 2, 3*

T

TA · *température ambiante*
Tel1 · *Telomere length regulation protein 1*
TEX · *Testis Expressed*
tm · *tremor*
TOPBP1 · *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*
TOPIII α · *DNA topoisomerase 3-alpha*
TOPVIBL · *TopoVIB-like*
TPM · *Transcripts Par Million*

W

WRN · *Werner syndrome helicase*
WT · *Wild Type*

X

XRCC2, 3 · *X-Ray Repair Cross Complementing 2, 3*

Z

Zip 1, 2, 3, 4 · *molecular ZIPper 1, 2, 3, 4*

Table des matières

Avant-propos	1
Introduction	2
I) La méiose	2
A) Généralités	2
1) La méiose et la gamétogenèse.....	2
2) Les divisions méiotiques et l'importance de la prophase I	6
B) La formation d'une structure chromatinienne spécifique de la méiose	9
1) Les cohésines et l'appariement des chromatides sœurs	9
1.1) Les cohésines	9
1.2) Les rôles des cohésines en méiose	11
a) La ségrégation des chromosomes	11
b) La structure des chromosomes méiotiques.....	11
c) La progression de la RH méiotique	12
2) Le complexe synaptonémal et le synapsis des chromosomes homologues	12
2.1) La formation du complexe synaptonémal	12
a) Les éléments axiaux	14
b) Les éléments centraux.....	14
c) Les éléments transversaux	15
2.2) L'interdépendance du complexe synaptonémal et de la progression de la RH méiotique	15
II) La recombinaison homologue méiotique et sa régulation	17
A) La recombinaison homologue	17
1) La recombinaison homologue et la réparation des cassures double brins de l'ADN	17
1.1) Les cassures double brins de l'ADN.....	17
1.2) La réparation des CDB: NHEJ ou RH ?	18
2) Les étapes de la recombinaison homologue	21
2.1) La résection.....	23
2.2) L'invasion	24
2.3) L'extension de la D-Loop et la synthèse d'ADN	29
2.4) Démantèlement de la D-Loop.....	31

2.6) La capture de la seconde extrémité de la CDB de l'ADN	31
2.7) La dissolution et la résolution de la dJH	32
B) La recombinaison méiotique.....	35
1) La formation des CDB méiotiques programmées	35
1.1) La formation des CDB méiotiques	35
1.2) La localisation des CDB méiotiques	37
2) La résection en méiose.....	40
3) L'invasion.....	41
4) La synthèse d'ADN au sein de la D-Loop en méiose	45
5) La répression des CO en méiose	48
6) La promotion des CO en méiose	49
7) La dissolution ou la résolution de la dJH en méiose	55
III) Un exemple de coopération de facteurs ubiquitaires et méiotiques spécifiques durant la recombinaison méiotique : les protéines de liaisons à l'ADNsb RPA, MEIOB et SPATA22.....	58
A) Le complexe ubiquitaire essentiel de liaison à l'ADNsb : le complexe RPA ..	58
1) Structure et modalités d'interaction des sous-unités de RPA	58
2) RPA et sa capacité de liaison à l'ADNsb	60
3) Les rôles essentiels de RPA dans le métabolisme de l'ADN	62
3.1) Le rôle de RPA dans la réplication de l'ADN et l'activation des points de contrôles cellulaires	63
a) Le rôle de RPA dans la synthèse d'ADN aux fourches de réplication ..	63
b) Le rôle de RPA dans l'activation des points de contrôles cellulaires liés au stress réplicatif et aux dommages de l'ADN	64
3.2) Le rôle de RPA en recombinaison homologue	68
a) RPA et la formation de la D-Loop	68
b) RPA et la régulation de la formation des CO	69
B) Le complexe méiotique spécifique essentiel de liaison à l'ADNsb : le complexe MEIOB-SPATA22.....	72
1) La découverte et les modèles d'étude de MEIOB et SPATA22	72
2) La conservation de MEIOB et SPATA22	72
3) MEIOB et SPATA22, deux facteurs essentiels à la RH méiotique.....	73
3.1) La localisation de MEIOB et SPATA22 aux intermédiaires de recombinaison	73

3.2) MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la réparation des CDB méiotiques	74
4) Les propriétés de MEIOB et SPATA22.....	75
4.1) La structure de MEIOB et SPATA22	75
4.2) L'interaction de MEIOB et SPATA22 et leur interdépendance	76
4.3) MEIOB et sa capacité à lier l'ADNsb	76
4.4) L'interaction de MEIOB et SPATA22 avec RPA.....	77
5) MEIOB et SPATA22 chez l'Homme.....	79
IV) MEIOB et SPATA22 et leur expression dans les cancers: un rôle potentiel de dérégulation ?	80
A) Les Cancer Testis Antigens.....	80
1) La découverte des Cancer Testis Antigens	80
2) La classification des Cancer Testis Antigens.....	81
3) L'expression des Cancer Testis Antigens.....	81
3.1) L'expression hétérogène des Cancer Testis Antigens	81
3.2) L'activation des Cancer Testis Antigens.....	82
4) La mise en évidence de fonctionnalités des Cancer Testis Antigens	83
B) MEIOB et SPATA22 sont des Cancer Testis Antigens.....	84
1) L'expression de MEIOB et SPATA22 dans les cancers	84
2) MEIOB et SPATA22 dans les cancers: dérégulation des fonctionnalités de RPA ?	85
Objectifs de thèse	86
Résultats.....	87
Article 1: shani mutation in mouse affects splicing of Spata22 and leads to impaired meiotic recombination	90
Article 2: The meiosis-specific MEIOB–SPATA22 complex cooperates with RPA to condense single-stranded DNA	91
Article 3: A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks	92
Résultats supplémentaires : étude de l'influence potentielle de l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 dans certains cancers.....	93
I) Matériels et méthodes des résultats supplémentaires	93
A) Analyse bioinformatique de l'expression transcriptionnelle de MEIOB et SPATA22.....	93

B) Culture cellulaire et transfection de plasmides	98
C) Comptage au Bleu Trypan	98
D) Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	99
D) Construction de plasmides pour l'établissement d'une lignée cellulaire stable inductible pour MEIOB et SPATA22.....	100
II) Résultats supplémentaires.....	103
A) Expression ectopique de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> dans les cellules cancéreuses	103
B) Etude de l'influence de l'expression ectopique de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> sur le cycle cellulaire.....	109
C) Etablissement de lignées cellulaires stables inductibles pour l'expression de MEIOB et SPATA22	116
Discussion.....	121
I) MEIOB, SPATA22 et RPA en recombinaison méiotique	121
A) MEIOB et SPATA22 interagissent avec RPA	121
B) MEIOB et SPATA22, une collaboration avec RPA en recombinaison méiotique ?	123
II) Le mutant <i>shani</i>.....	127
A) L'étude du mutant <i>shani</i>	127
B) La découverte d'un élément régulateur de l'épissage de <i>Spata22</i>	127
III) MEIOB et SPATA22 dans les cancers	129
A) L'expression ectopique de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> dans les cellules cancéreuses	129
B) Les rôles potentiels de l'expression ectopique de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> dans les cellules cancéreuses	130
Conclusion	133
Annexes	134
Bibliographie	136

Table des figures

Figure 1 : Méiose et gamétogenèse chez les mammifères	5
Figure 2 : La recombinaison méiotique et l'appariement des chromosomes homologues (ou synapsis) au cours de la prophase I	8
Figure 3 : Schéma des complexes de cohésines et de leur rôle en division de méiose I	10
Figure 4 : Schéma de l'assemblage du complexe synaptonémal.....	13
Figure 5 : Les voies de réparation des CDB en fonction du cycle cellulaire.....	20
Figure 6 : La réparation des CDB par recombinaison homologue.....	22
Figure 7 : Modèle de la résection bidirectionnelle chez les mammifères	24
Figure 8 : Modèle de formation du filament RAD51 par BRCA2	26
Figure 9 : Modèle du déplacement de RPA par BRCA2 et DSS1	27
Figure 10 : Modèle des rôles de HELQ et du complexe HROB-MCM8-MCM9 en recombinaison	30
Figure 11 : La dissolution ou la résolution de la double jonction de Holliday	34
Figure 12 : La formation de la CDB en méiose	39
Figure 13 : Schéma de réparation d'un mésappariement de l'ADN	47
Figure 14 : Modèle de régulation des intermédiaires de recombinaison méiotique par Mer3	51
Figure 15 : Modèle de régulation des intermédiaires de recombinaison par HEI10 et RNF212	54
Figure 16 : Modèle de la résolution de la dJH en méiose	56
Figure 17 : La structure du complexe RPA.....	60
Figure 18 : Modèle de liaison à l'ADNsb du complexe RPA.....	62
Figure 19 : L'activation d'ATM et d'ATR en réponse au stress réplicatif et aux dommages de l'ADN	66
Figure 20 : Modèle du déplacement de RPA à l'ADNsb par des protéines mimant l'ADNsb	69
Figure 21 : Modèle du rôle de RPA lors de la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop en recombinaison	71
Figure 22 : Expression de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> dans les tissus sains et tumoraux humains	104

Figure 23 : Corrélation d'expression de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> dans les tissus sains (normaux) et tumoraux humains.....	106
Figure 24 : <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> sont exprimés dans les lignées cancéreuses humaines	108
Figure 25 : <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> induisent un retard de prolifération des cellules HEK293	110
Figure 26 : Distribution au sein du cycle cellulaire en présence de GFP ou de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> des cellules HEK293 par cytométrie en flux.....	113
Figure 27 : Analyse de l'expression de la GFP ou de <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> dans les cellules HEK293 par cytométrie en flux	115
Figure 28 : Cartes des vecteurs d'expression plasmidique pour l'établissement de lignées stables inductibles pour <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i>	117
Figure 29 : Systèmes d'expression inductible et d'insertion plasmidique utilisés pour l'établissement de la lignée cellulaire stable inductible pour <i>MEIOB</i> et <i>SPATA22</i> ..	119
Figure 30: Modèle du rôle de <i>MEIOB-SPATA22</i> au cours de la recombinaison méiotique	126

Introduction

Avant-propos

Dans les cellules eucaryotes, la recombinaison homologue (RH) est un des mécanismes essentiels de réparation de l'ADN qui prévient l'apparition de mutations et participe au maintien de la stabilité génomique. La recombinaison homologue est aussi essentielle en méiose lors de l'établissement des cellules sexuelles. La recombinaison méiotique est assurée par l'action commune de facteurs ubiquitaires et de facteurs spécifiques de la méiose. La découverte et la description des fonctionnalités de ces facteurs méiotiques chez divers organismes ont fortement contribuées à caractériser la spécialisation de la RH en méiose. L'étude des acteurs de la recombinaison méiotique a aussi fortement contribué à déterminer les causes génétiques d'infertilité chez l'Homme. *MEIOB* (*Meiosis specific with OB domains*) et son partenaire *SPATA22* (*Spermatogenesis associated 22*) ont récemment été découverts et sont essentiels à la RH méiotique. Leurs fonctionnalités et spécificités d'action restent néanmoins mal comprises au cours de la recombinaison méiotique. De nombreux facteurs spécifiques de la méiose, dont *MEIOB* et *SPATA22*, sont aussi exprimés ectopiquement dans des tumeurs cancéreuses et sont alors désignés comme des Cancer Testis Antigens (CTA). De nombreuses études suggèrent que l'expression des CTA est impliquée dans le comportement cancéreux des cellules, notamment, en favorisant l'instabilité génétique. L'expression de CTA permettrait ainsi de sensibiliser les cellules aux agents génotoxiques couramment utilisés lors de traitements anti-cancéreux. Une meilleure compréhension de cette expression des CTA et de leurs fonctionnalités apporterait de nouvelles possibilités aux traitements des cancers par thérapies ciblées.

Introduction

I) La méiose

La méiose est un processus central de la reproduction sexuée. Son importance dans la génération de gamètes viables, et donc dans la pérennité du cycle de la vie, dépend de la mise en place d'évènements méiotiques clés dont l'appariement complet des chromosomes homologues et la recombinaison méiotique.

A) Généralités

1) La méiose et la gamétogenèse

Très conservée au cours de l'évolution, la méiose (qui signifie « amoindrissement, diminution ») permet de générer des gamètes haploïdes (1N) à partir de cellules diploïdes (2N). Chez les mammifères, elle est intimement liée à la gamétogenèse en constituant une de ses étapes essentielles (mitose, méiose et maturation des gamètes) qui aboutissent au développement des cellules germinales en gamètes viables (Handel et Schimenti, 2010). Elle se compose de deux divisions successives, sexuellement dimorphiques entre la gamétogenèse mâle et femelle. Elles diffèrent par leur timing d'exécution et par les produits de méiose résultants entre le mâle et la femelle ; et sont identiques par leur capacité de brassage génétique.

- *Le timing méiotique au sein de la gamétogenèse mâle et femelle*

Durant la vie fœtale chez la souris, les cellules germinales primordiales (pré-spermatogonies chez le mâle et ovogonies chez la femelle après différenciation sexuelle) prolifèrent activement dans les gonades (Saitou et Miyauchi, 2016). L'environnement somatique des cellules germinales dans les gonades influence le devenir mâle ou femelle des cellules germinales primordiales (détaillés dans (Bowles et Spiller, 2015; Spiller et al., 2017)). Chez la femelle, l'entière population d'ovogonies entre en méiose de façon synchrone dans l'ovaire fœtal et s'arrête en fin de prophase de première division avant la naissance. Cette entrée précoce en méiose est caractéristique de la voie de différenciation femelle des cellules germinales (Spiller et al., 2017). La reprise de méiose ne se fait qu'à partir de la puberté. La stimulation hormonale via l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades induit

la croissance et la maturation d'une sélection d'ovocytes dont un seul achève sa première division lors de l'ovulation (MacLennan et al., 2015). Cette maturation ovocytaire est intimement liée au développement folliculaire (follicules primordiaux, primaires, secondaires et tertiaires), durant lequel les ovocytes acquièrent la compétence à répondre à la stimulation hormonale ovulatoire pour achever la première division (Saitou et Miyauchi, 2016). Cette reprise de méiose I s'effectuera de façon cyclique au cours de la vie des femelles jusqu'à épuisement du pool d'ovocytes primordiaux arrêtés en prophase I. La deuxième division de l'ovocyte sélectionné (ou ovulé) est elle aussi bloquée (en métaphase II) et ne s'achève que si l'ovocyte est fécondé par un gamète mâle. Chez le mâle, les pré-spermatogonies entrent en quiescence durant la vie fœtale. A l'inverse de la femelle, la répression d'entrée en méiose est caractéristique de la voie de différenciation mâle des cellules germinales. Après la naissance seulement, une partie des spermatogonies souches se différencie pour initier la méiose à partir de la puberté et une partie se multiplie pour renouveler le pool de cellules souches nécessaires à la spermatogenèse tout au long de la vie de l'individu (Saitou et Miyauchi, 2016). La deuxième division de méiose succède sans interruption à la première. Les cellules post-méiotiques mâles subissent une ultime phase de maturation appelée spermiogenèse. Au cours de cette phase, elles subissent des modifications morphologiques et moléculaires qui permettront l'obtention de gamètes mobiles matures, les spermatozoïdes.

- *Les produits des deux divisions méiotiques chez le mâle et la femelle*

La méiose est caractérisée par sa capacité à « réduire » le contenu génétique. Elle diffère de la mitose qui « réduit » la quantité d'ADN tout en conservant la même information génétique. La première division de méiose réduit l'information génétique et est dite réductionnelle. La seconde division répartit la même information génétique en deux cellules et est dite équationnelle. La méiose est précédée d'une phase de réplication de l'ADN, la phase S pré-méiotique, qui dure plus longtemps qu'une phase S mitotique. A ce stade, les cellules contiennent alors des paires de chromosomes homologues (2N) d'origine maternelle et paternelle à deux chromatides (2C) (figure 1). La première division sépare (ou ségrège) les chromosomes homologues. Les cellules résultantes contiennent alors un seul exemplaire de chacun des chromosomes homologues (1N) possédant encore ses deux chromatides sœurs (2C) (**Figure 1**). Chez le mâle, il en résulte la formation de

deux spermatocytes II identiques en taille et contenu alors que chez la femelle il en résulte un ovocyte I et un premier globule polaire, différents par la taille et le contenu cytoplasmique (**Figure 1**). Cette stratégie de division inégale du cytoplasme chez la femelle assure le contenu énergétique nécessaire au développement d'un embryon après fécondation (Bolcun-filas et Handel, 2018). La seconde division sépare les chromatides sœurs. Après l'achèvement de ces deux divisions méiotiques, les gamètes ne contiennent plus qu'un exemplaire chromosomique à une seule chromatide (1N1C) (**Figure 1**). Cette seconde division est dimorphique à la fois sur sa réalisation dans le temps que sur le nombre de gamètes produits. Chez le mâle, elle s'effectue directement après la première division et elles aboutissent à l'obtention de quatre spermatides. Chez la femelle mammifère, la seconde division ne s'effectue que lors de la fécondation et produit un deuxième globule polaire et un ovocyte II désormais fécondé (ou zygote) (Bolcun-filas et Handel, 2018; Handel et Schimenti, 2010).

- *Le brassage du matériel génétique au cours des deux divisions méiotiques*

En plus de son importance lors de la gamétogénèse, la méiose induit de la diversité génétique au sein du cycle de reproduction sexuée car elle génère un important brassage du matériel génétique. En effet, la première division induit un brassage inter-chromosomique de par l'échange d'information génétique entre bras de chromosomes homologues (appelés aussi cross-overs, CO), et, un brassage chromosomique de par la ségrégation aléatoire des chromosomes homologues. La fusion aléatoire d'un gamète mâle avec un gamète femelle engendre l'ultime brassage de l'information génétique porteur de diversité au cours de la reproduction sexuée.

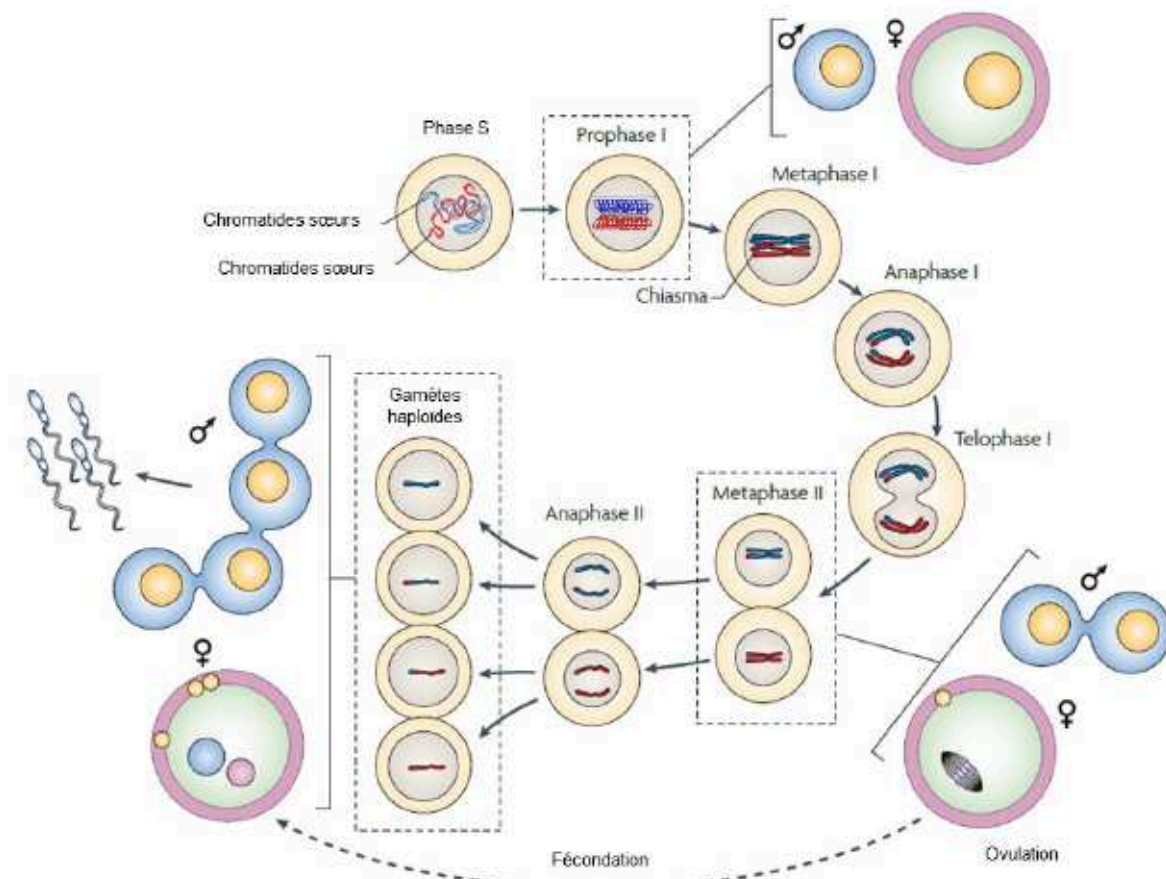


Figure 1 : Méiose et gamétogenèse chez les mammifères

Après la phase S pré-méiotique, les cellules germinales (en beige) contiennent des paires de chromosomes homologues à deux chromatides ($2N2C$). La méiose s'initie par une longue prophase I durant laquelle les chromosomes homologues s'apparient (ou se synapsent) et recombinent. Le chiasma résulte de l'échange de brins (ou CO) entre chromosomes homologues (rouge ou bleu) formés par recombinaison méiotique. En métaphase I, les chromosomes homologues sont maintenus ensemble par les cohésines et alignés grâce à leur chiasma sur la plaque métaphasique. En anaphase I et télophase I, les chromosomes homologues se ségrègent aux pôles opposés. Chez le mâle, deux spermatocytes II identiques en taille et contenu cytotologique sont formés alors que chez la femelle, un ovocyte I et un premier globule polaire différents en taille et contenu sont formés. Chez la femelle, la première division s'initie en vie fœtale et ne s'achève qu'à partir de la puberté à chaque ovulation. En absence de prophase, la seconde division de méiose permet de séparer les chromatides sœurs formant ainsi des cellules haploïdes ($1N$). A partir de la puberté chez le mâle, cette seconde division survient après la première sans interruption et aboutit à la formation de quatre spermatides. Chez la femelle, elle n'est achevée qu'après fécondation par un spermatozoïde et aboutit à la formation d'un ovocyte II fécondé, le zygote, et d'un second globule polaire. Les cellules de la lignée germinale mâle et femelle sont représentées en bleu et rose, respectivement. (adaptée de (Handel et Schimenti, 2010))

2) Les divisions méiotiques et l'importance de la prophase I

La première division de méiose commence par une longue prophase I suivie des autres étapes de divisions cellulaires (métaphase, anaphase et télophase). La prophase I est particulièrement importante au processus de division méiotique puisqu'elle est l'étape durant laquelle se déroule l'appariement complet des chromosomes homologues par la formation du complexe synaptonémal (CS) (structure supra-chromosomique multiprotéique) et la recombinaison homologue (RH) méiotique (mécanisme de réparation de l'ADN). Ces deux processus sont intriqués au cours de la prophase I et mettent en place des éléments nécessaires à la ségrégation des chromosomes homologues.

- La RH méiotique s'initie par la formation de cassures doubles brins (CDB) de l'ADN. Une des extrémités de la CDB va envahir une séquence d'ADN située sur le chromosome homologue. La CDB est ensuite réparée par néosynthèse d'ADN en utilisant comme matrice modèle cette séquence provenant du chromosome homologue. La RH méiotique aboutit à un échange réciproque de bras de chromosomes, ou cross-over (CO), qui induit la formation d'un lien physique entre les chromosomes homologues appelé chiasmas. Ces derniers génèrent la tension nécessaire à la correcte ségrégation des homologues lors de leur alignement sur la plaque métaphasique.
- De façon concomitante à la RH méiotique, les chromosomes homologues se condensent et s'apparient grâce à la formation d'une structure chromatinienne spécifique, composée de cohésines et des éléments du complexe synaptonémal (CS). Dès la phase S pré-méiotique, les chromatides sœurs sont répliquées et maintenues ensemble par les cohésines dont certaines sont spécifiques de la méiose. Au cours de la prophase I, les chromosomes méiotiques s'apparient par déposition des différents éléments du CS. Ce rapprochement physique entre les homologues favorise l'échange d'information génétique (CO) durant la RH méiotique. En fin de prophase, seules les cohésines localisées au centromère des chromatides sœurs sont maintenues pour permettre la séparation des chromosomes homologues.

Les chiasmas qui génèrent la tension des homologues alignés sur la plaque métaphasique et le maintien des cohésines au centromère des chromatides sœurs sont deux éléments essentiels à la ségrégation des homologues lors de la première division (MacLennan et al., 2015). Les chromatides sœurs d'un homologue migrent alors vers le même pôle : elles sont mono-orientées au cours de cette première division (Touati et Wassmann, 2016). Plus courte que la première, la deuxième division méiotique s'initie en absence de prophase et les chromatides sœurs se ségrégent de façon similaire à une division mitotique c'est-à-dire avec une bi-orientation (Handel et Schimenti, 2010).

La prophase I se sub-divise en stades leptotène, zygotène, pachytène et diplotène en fonction de l'état d'appariement des chromosomes et de la progression de la RH méiotique. Dès le leptotène, la chromatine se condense et forme des boucles qui se structurent autour d'axes des chromatides sœurs formés par déposition des éléments axiaux (ou latéraux) du CS et des cohésines; et, la formation de CDB de la RH s'initie également (**Figure 2**). En zygotène, les chromosomes homologues se rapprochent et s'apparient par déposition des éléments centraux du CS le long des axes des chromatides sœurs : on parle alors de synapsis des homologues qui sera complet en pachytène (**Figure 2**). Dans le même temps, les CDB méiotiques vont être prises en charge par les différents acteurs de la recombinaison méiotique et complètement réparées en pachytène en formant au moins un CO par paire d'homologues (ou bivalents) qui les lie physiquement (chiasma) (**Figure 2**). En diplotène, les homologues se désynapsent par enlèvement des éléments centraux du CS et restent liés par leur chiasma pour permettre leur ségrégation par la suite (**Figure 2**) (Bolcun-filas et Handel, 2018; Handel et Schimenti, 2010).

Le bon déroulement des événements de recombinaison et d'appariement/synapsis chromosomique de prophase I est crucial dans la prévention des erreurs du nombre de chromosomes ou aneuploïdies (Bolcun-filas et Handel, 2018). Chez la femme, il est estimé entre 20 et 25% d'ovocytes aneuploïdes dont la majorité ne permet pas le développement d'un embryon et aboutit à un avortement spontané (Hassold et Hunt, 2001). L'aneuploïdie viable la plus fréquente est la trisomie 21, liée à la mauvaise ségrégation du chromosome 21 dans l'ovocyte (Hassold et Hunt, 2001). Les trisomies sont principalement liées aux erreurs de

première division maternelle. Et, des défauts de recombinaison sont fortement mis en cause dans la mauvaise disjonction des chromosomes maternels (détailés dans (Hassold et Hunt, 2001)). Les erreurs de ploïdie sont aussi présentes dans les spermatozoïdes humains avec une estimation à 2% (Vera et al., 2012). L'appariement des chromosomes sexuels durant la prophase I, qui chez le mâle ne se synapsent que partiellement, sont particulièrement sensibles à la mauvaise ségrégation (Touati et Wassmann, 2016; Vera et al., 2012).

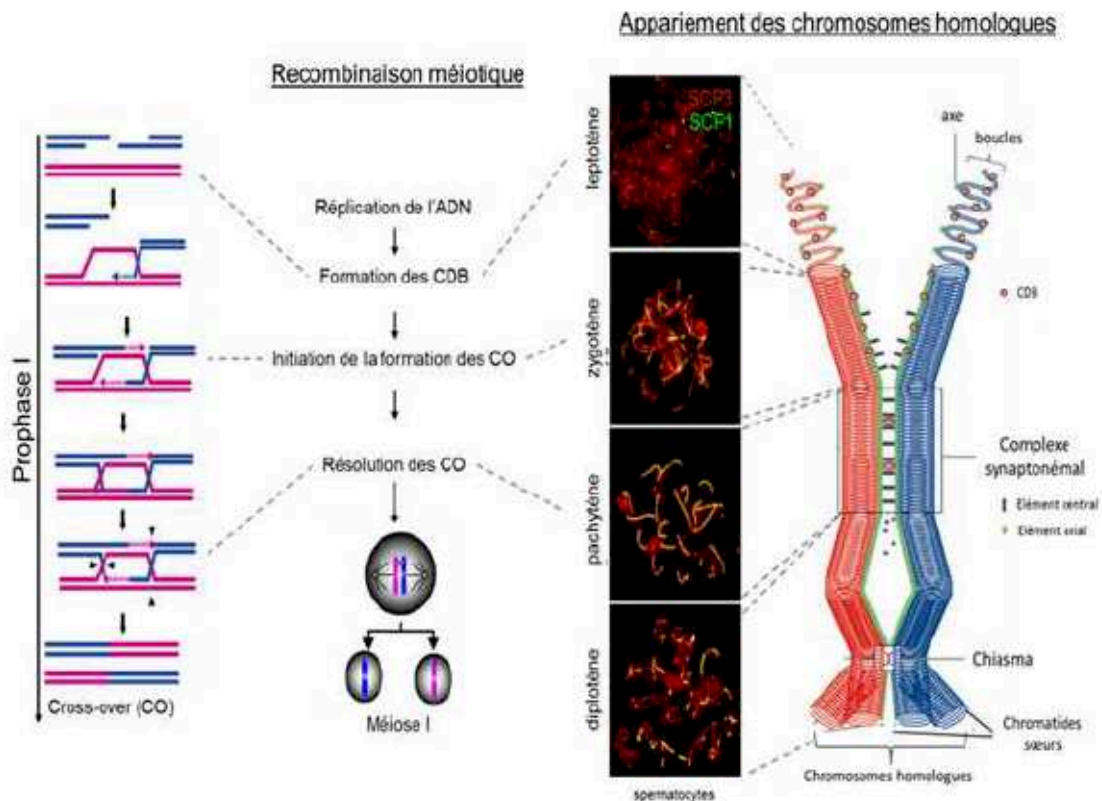


Figure 2 : La recombinaison méiotique et l'appariement des chromosomes homologues (ou synapsis) au cours de la prophase I

Les représentations schématiques de la progression de la recombinaison méiotique et de l'état d'appariement des chromosomes homologues au cours de la prophase de méiose I sont associées à des images d'étalements de chromosomes méiotiques de souris (schéma d'appariement des chromosomes adapté de (Burgoyne et al., 2009)). L'immunolocalisation de l'élément axial SCP3 (ou SYCP3) (en rouge) et de l'élément central SCP1 (ou SYCP1) (en rouge) permet de suivre l'appariement des chromosomes homologues des cellules méiotiques (images du Dr Martini).

B) La formation d'une structure chromatinienne spécifique de la méiose

Durant la prophase I, les chromosomes méiotiques adoptent une structure chromatinienne spécifique permettant *in fine* le synapsis des chromosomes homologues. Ils s'organisent en boucles de chromatine le long des axes des chromosomes méiotiques composés de cohésines et d'éléments du complexe synaptonémal.

1) Les cohésines et l'appariement des chromatides sœurs

1.1) Les cohésines

Que ce soit en mitose ou en méiose, les cohésines forment des anneaux structuraux qui viennent entourer les chromatides sœurs afin de les maintenir entre-elles (Bolcun-Filas and Schimenti, 2012; Ishiguro, 2019). Ces anneaux sont composés d'un hétérodimère de protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) et d'un hétérodimère de protéines non-SMC, les α -kleisines et les stromalines (SA) (Nasmyth et Haering, 2009). Dans les cellules somatiques, SMC1 α et SMC3 encerclent les chromatides sœurs et interagissent avec la kléisine RAD21 afin de fermer l'anneau de SMC. Les stromalines SA1 et SA2 (ou STAG1 et STAG2, Stromal Antigen 1 et 2) interagissent avec la kléisine pour maintenir cette structure en anneau (Figure 3). Dans les cellules germinales, des sous-unités méiotiques spécifiques coexistent avec des sous-unités canoniques et sont capables de former plusieurs complexes (Figure 3) (Ishiguro et al., 2011). Les kléisines méiotiques spécifiques REC8 (Recombination 8) et RAD21L (Radiation sensitive 21-like) s'expriment en plus de RAD21 (Eijpe et al., 2003; Ishiguro et al., 2011; Lee et al., 2003; Parra et al., 2004). La stromaline STAG3 (stromal antigen 3) et SMC1 β remplacent largement SA1/2 et SMC1 α , respectivement (Bayés et al., 2001; Prieto et al., 2001; Revenkova et al., 2004). Chez la souris, l'absence d'une de ces cohésines méiotiques spécifiques induit une infertilité associée à un phénotype structurel des chromosomes montrant leurs importances (Ishiguro, 2019; Revenkova et al., 2004). REC8 est exprimée et se localise aux chromosomes dès la phase S pré-méiotique dans les spermatocytes murins (Eijpe et al., 2003). Quant à SMC1 β et STAG3, elles sont enrichies à partir du stade leptotène (Eijpe et al., 2003; Prieto et al., 2001), bien

qu'une faible quantité de STAG3 serait présente avant l'initiation méiotique dans les spermatogonies (Prieto et al., 2002). Ces différences d'expression spatiotemporelle suggèrent des rôles distincts des différents complexes de cohésines au cours de la méiose.

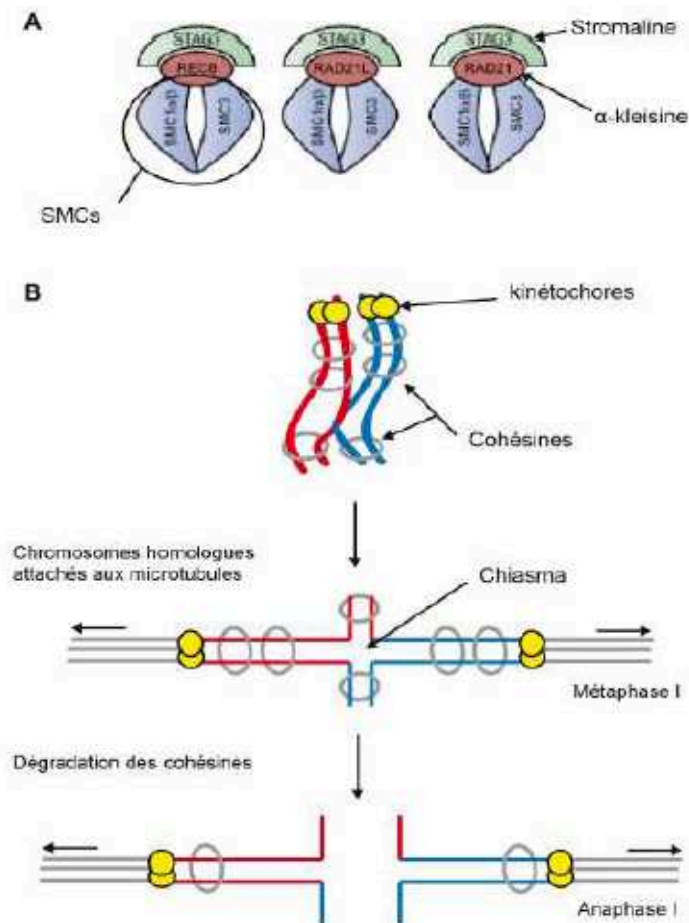


Figure 3 : Schéma des complexes de cohésines et de leur rôle en division de méiose I

A) Représentation des différents complexes de cohésines en méiose (adapté de (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012)) B) Les cohésines et les chiasmats maintiennent les chromosomes homologues en métaphase I. Les chiasmats et les cohésines déposées le long des bras chromosomiques permettent de maintenir une connexion entre les chromosomes homologues. Cette connexion génère la tension nécessaire à l'alignement des chromosomes homologues sur la plaque métaphasique pour permettre le passage en anaphase I. Les chromosomes sont attachés au fuseau de microtubules par leurs kinétochores centromériques. En anaphase I, les cohésines sont dégradées le long des bras chromosomiques pour permettre la ségrégation des chromosomes homologues et maintenues aux régions centromériques pour garder les chromatides sœurs ensemble. Les chromatides sœurs d'un chromosome homologue se ségrègent vers le même pôle : la ségrégation est mono-orientée. (Schéma extrait de la thèse du Dr Ribeiro)

1.2) Les rôles des cohésines en méiose

a) La ségrégation des chromosomes

Les cohésines sont essentielles à la correcte ségrégation des chromosomes au cours des divisions méiotiques. Elles se déposent le long des chromatides sœurs dès la phase S pré-méiotique. En métaphase I, les chromosomes homologues sont liés par leur chiasma et les chromatides sœurs sont maintenues ensemble par les cohésines (**Figure 3**). Les chromosomes homologues sont alignés et maintenus sur la plaque métaphasique par l'attachement des microtubules aux kinétochores centromériques et les chiasmata. Lors de la transition métaphase/anaphase I, la cohésion des chromatides sœurs est dissoute par enlèvement des cohésines sauf au niveau des régions centromériques (Figure 3). Cet enlèvement des cohésines uniquement aux bras chromosomiques permet la ségrégation des homologues aux pôles opposés de la cellule. Les chromatides sœurs d'un chromosome homologue sont donc mono-orientées. La cohésion aux centromères des chromatides sœurs est maintenue jusqu'en anaphase II. Les cohésines sont alors enlevées des centromères et les chromatides sœurs se ségrègent aux pôles opposés. Leur séparation est bi-orientée comme pour une division mitotique classique. Si l'enlèvement des cohésines aux centromères se fait dès la première division, des anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdies) peuvent survenir d'où l'importance de l'enlèvement séquentiel des cohésines (Brooker et Berkowitz, 2014; MacLennan et al., 2015; Touati et Wassmann, 2016).

b) La structure des chromosomes méiotiques

Les cohésines sont impliquées dans l'organisation de la structure axe/boucle de chromatine des chromosomes méiotiques, formée par déposition des éléments du CS (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012). Comme exemple, les souris *Smc1 β ^{-/-}* possèdent une taille anormalement supérieure des boucles de chromatine et la longueur des axes des chromosomes méiotiques sont réduits de moitié (Novak et al., 2008). Un postulat de Zickler et Kleckner propose que la longueur du CS et la taille des boucles de chromatine sont réciproquement corrélées (Zickler et Kleckner, 1999). Le ratio longueur du CS/taille des boucles chromatiniennes des divers mutants murins de cohésines supporte cette idée (Caburet et al., 2014; Herrán et al.,

2011; Hopkins et al., 2014; Llano et al., 2012; Novak et al., 2008; Revenkova et al., 2004; Winters et al., 2014; Xu, Huiling et al., 2005). De plus, des ovocytes murins doublement déficients pour SMC1 β et SYCP3 (élément du CS) ont une taille supérieure des boucles chromatiniennes comparée à de simples mutants SYCP3 ou des souris sauvages (Novak et al., 2008). Et, l'absence de REC8 chez la souris montre un synapsis anormal et discontinu qui s'effectue entre les chromatides sœurs et non pas entre chromosomes homologues (Xu, Huiling et al., 2005). L'ensemble de ces résultats montrent bien le lien entre les cohésines et les éléments du CS dans l'établissement de l'architecture des chromosomes méiotiques.

c) La progression de la RH méiotique

L'étude des nombreux mutants murins déficients pour des cohésines a permis de montrer que les cohésines jouent aussi un rôle dans la progression de la recombinaison méiotique (Caburet et al., 2014; Herrán et al., 2011; Hopkins et al., 2014; Llano et al., 2012; Novak et al., 2008; Revenkova et al., 2004; Winters et al., 2014; Xu, Huiling et al., 2005). Comme exemple, les souris *Stag3*^{-/-} possèdent un synapsis aberrant des chromosomes méiotiques accompagné de défauts de progression de la recombinaison méiotique caractérisés par une absence de réparation des CDB (Caburet et al., 2014; Hopkins et al., 2014; Winters et al., 2014). Bien que le rôle précis des cohésines n'ait pas été clairement défini dans la progression de la recombinaison méiotique, ces dernières pourraient participer à la localisation de facteurs nécessaires à la réparation des CDB le long des axes des chromosomes méiotiques.

2) Le complexe synaptonémal et le synapsis des chromosomes homologues

2.1) La formation du complexe synaptonémal

Décrit pour la première fois par Moses et Fawcett en 1956 par microscopie électronique, le CS est une structure tripartite relativement bien conservée chez les eucaryotes bien que ses protéines spécifiques diffèrent suivant les organismes. L'étude de différents mutants nuls allant de la levure à la souris a permis de décrire et mieux comprendre le rôle du CS durant la prophase I (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012; Costa et Cooke, 2007; Handel et Schimenti, 2010; Yang, F. et Wang, 2009).

Le CS se compose de deux axes parallèles formés par les éléments axiaux (EA) (ou éléments latéraux (EL)) reliés aux éléments centraux (EC) par des éléments (ou filaments) transverses (ET) (**Figure 4**). Les EA se déposent progressivement au niveau des cohésines à la base des boucles pour former un axe le long des chromatides sœurs des chromosomes. Les EA sont ensuite considérés comme les EL du CS une fois complet. Ils sont ensuite connectés aux EC par les ET qui eux s'ancrent de chaque côté d'un EL et d'un EC (**Figure 4**). Chez la souris, les protéines connues des axes latéraux sont SYCP2 et SYCP3 (Synaptonemal Complex Protein 2 et 3). Les éléments connus au centre (EC et ET) sont SYCE1 à SYCE3 (Synaptonemal Complex Central Element protein 1, 2 et 3), SYCP1 (Synaptonemal Complex Protein 1), TEX12 (Testis Expressed 12) et SIX6OS1 (SIX6 Opposite Strand Transcript 1) (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012).

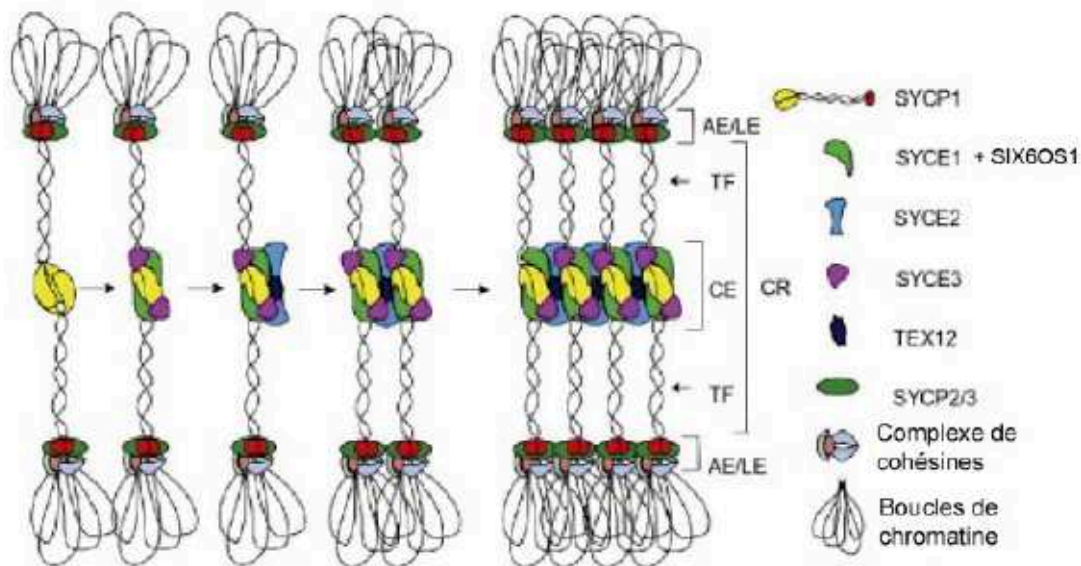


Figure 4 : Schéma de l'assemblage du complexe synaptonémal

L'assemblage complet du CS forme une structure tripartite qui joint les chromosomes homologues. Les filaments transverses SYCP1 relient les éléments axiaux SYCP2/3 déposés le long des axes des boucles de chromatides sœurs de chacun des chromosomes homologues. Les éléments centraux SYCE2/3, SYCE1, TEX12 et SIX6OS1 se déposent progressivement pour former l'élément central (CE) qui stabilise l'appariement (ou synapse) des chromosomes homologues. AE/LE : éléments axiaux / éléments latéraux ; CR : région centrale ; TF : filament transverse. (adapté de (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012))

a) Les éléments axiaux

Les protéines des EA SYCP2 et SYCP3 interagissent ensemble via leur domaine coiled-coil situé en région C-terminale et sont chargées aux axes du CS au niveau des cohésines (**Figure 4**) (Xu, Huizhong et al., 2019; Yang, F. et Wang, 2009). Contrairement à SYCP3, SYCP2 est désigné depuis longtemps comme étant la protéine reliant les EA et les ET. Plusieurs modèles proposent que SYCP2 interagisse via son domaine C-terminal avec SYCP3 situé aux axes et via son domaine N-terminal avec SYCP1 situé au centre du CS (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012; Xu, Huizhong et al., 2019; Yang, F. et Wang, 2009). De plus, SYCP2 est aussi proposé comme étant un intermédiaire entre les EA et les protéines chromatinienne. La structure N-terminale de SYCP2 contient un motif conservé capable de lier les protéines HORMAD1 et HORMAD2 (HORMA Domain containing 1 et 2) qui interagissent avec la chromatine (West, A. M. et al., 2019). De récents travaux sur l'organisation *in vivo* des axes du CS dans des spermatocytes murins observés par microscopie à haute résolution suggèrent que SYCP2 avec SYCP3 forment un cœur protéique autour duquel les cohésines et les protéines HORMAD s'organisent potentiellement via la liaison avec le domaine N-terminal de SYCP2 (Xu, Huizhong et al., 2019). Pourtant chez la souris, la formation complète du CS est intimement liée au désassemblage des protéines HORMAD au niveau des axes au fur et à mesure de sa complétion (Shin et al., 2010; Wojtasz et al., 2009). L'absence de ces dernières induit une stérilité avec un synapsis incomplet des chromosomes méiotiques montrant ainsi leur importance dans l'établissement correct du CS (Shin et al., 2010). Une meilleure compréhension des interactions entre SYCP2/3 et les protéines HORMAD pourrait aboutir à un modèle davantage en accord avec la dynamique *in vivo* des HORMAD et de la structure précise du CS.

b) Les éléments centraux

Des études d'interaction ont révélés d'une part que SYCE1 et SYCE2 lient le domaine N-terminal de SYCP1; d'autre part, SYCE3 lie SYCE1 et SYCE2; et enfin, SYCE2 interagit avec TEX12. En accord avec la localisation protéique dans les différents mutants des EC chez la souris, SYCE1/3 (complexe d'initiation du synapsis) permettrait le contact avec les ET et SYCE2/TEX12 (complexe d'élongation du synapsis) induirait la propagation du synapsis le long des axes

chromosomiques (**Figure 4**) (Bolcun-Filas et Schimenti, 2012; Davies et al., 2012; Fraune et al., 2016; Hamer et al., 2006). Découverte récemment, SIX6OS1 colocalise avec les autres EC dans des spermatocytes murins. Des expériences de double-hybride chez la levure ont révélé qu'elle peut interagir avec SYCE1 (Gómez-H et al., 2016). Son rôle précis dans la formation du CS reste à être défini.

c) Les éléments transversaux

Le constituant majeur des ET est SYCP1. Possédant une structure coiled-coil centrale et des régions terminales globulaires, les extrémités N-terminales de SYCP1 contactent l'EC et les extrémités C-terminales contactent les EA/EL (**Figure 4**). Des homodimères parallèles de SYCP1 viennent progressivement se déposer au centre du CS reliant ainsi les EA/EL et les EC afin de fermer une structure en « fermeture éclair » (Zip-like structure) qui joint les chromosomes homologues ensemble (Fraune et al., 2016; Yang, F. et Wang, 2009).

2.2) L'interdépendance du complexe synaptonémal et de la progression de la RH méiotique

Le lien entre l'établissement du CS et la progression de la RH méiotique au cours de la prophase I suggère que la structure chromosomique méiotique participe au déroulement de la RH méiotique, et vice-versa.

D'une part, la déplétion d'un des constituants du CS chez la souris entraîne des défauts de progression méiotique en plus d'un synapsis aberrant et incomplet. Le maintien du signal γ H2A.X (marque de CDB non réparées) et la dynamique anormale des protéines de recombinaison (tels que RPA, RAD51, DMC1, MSH4, MLH1) sont caractéristiques de ces défauts de recombinaison (Bolcun-Filas et al., 2007, 2009; De Vries et al., 2005; Gómez-H et al., 2016; Hamer et al., 2006; Kogo et al., 2012; Schramm et al., 2011; Shin et al., 2010; Yang, Fang et al., 2006). Inversement, l'absence de formation ou de réparation des CDB induit un synapsis fortement altéré des chromosomes (déposition aberrante de SYCP1, notamment) (Baudat et al., 2000; Romanienko et Camerini-Otero, 2000; Souquet et al., 2013). Il existe donc un lien fonctionnel entre la formation du CS et la dynamique des CDB méiotiques.

D'autre part, les sites d'assemblage des EA (SYCP2 et SYCP3) corrélerent avec les sites des CDB aux axes des chromosomes. Le lien fonctionnel CS/RH méiotique pourraient être médié par des interactions directes entre des protéines de recombinaison (RAD51 et DMC1) et des éléments du CS (SYCP1 et SYCP3) chez les mammifères (Tarsounas et al., 1999). RAD51 et son homologue méiotique spécifique DMC1 sont deux facteurs essentiels à la RH méiotique qui assurent la recherche et l'envahissement d'une séquence homologue pour réparer la CDB. Par approches biochimiques, les interactions de SYCP3 avec RAD51 (fortes) et DMC1 (faibles) suggèrent que l'interaction SYCP3-RAD51 inhibe l'activité d'invasion de RAD51 pour favoriser celle de DMC1 (Kobayashi et al., 2017). Ainsi, les éléments de CS seraient capables de réguler des facteurs de recombinaison via des interactions directes.

II) La recombinaison homologue méiotique et sa régulation

En prophase I, la recombinaison homologue (RH) méiotique est un mécanisme spécialisé de réparation de l'ADN. Elle est nécessaire à la formation de CO entre les chromosomes homologues et permet de générer de la diversité génétique. Elle est spécialisée par la présence et la participation de facteurs spécifiques de la méiose ; qui viennent moduler les différentes étapes de la RH mitotique pour lui conférer des caractéristiques et des fonctionnalités propres. Les grandes étapes et les acteurs/régulateurs de la RH seront présentés avant de détailler les spécificités méiotiques.

A) La recombinaison homologue

1) La recombinaison homologue et la réparation des cassures doubles brins de l'ADN

1.1) Les cassures double brins de l'ADN

Dans les cellules, l'ADN est constamment exposé à des stress exogènes et endogènes pouvant entraîner des dommages (ou lésions) des molécules d'ADN. Chaque cellule du corps humain en subit jusqu'à des dizaines de milliers par jour. Ces dommages peuvent induire des modifications de bases de l'ADN, la formation de liaison covalente entre bases (liaison inter- et intra-bases), la formation d'adduits à l'ADN (fixation covalente d'une molécule à l'ADN) et la formation de cassure simple ou double brin de l'ADN. Ils sont les principales causes de mutations au sein du génome, favorisant l'instabilité génétique et le développement de cancers. Les fonctions essentielles de la cellule, telles que la réplication ou encore la transcription, peuvent en être perturbées allant jusqu'à compromettre la viabilité de la cellule. Afin de préserver l'intégrité de leur génome, les cellules ont mis en place divers mécanismes de réparation de l'ADN en fonction du type de lésion (détaillés dans (Chatterjee et Walker, 2017; Dexheimer, 2013; Mehta et Haber, 2014)).

Parmi les dommages de l'ADN, les CDB sont considérées comme les plus cytotoxiques d'où l'enjeu majeur de les réparer efficacement pour la cellule (Chatterjee et Walker, 2017; Dexheimer, 2013). Les CDB « accidentelles » peuvent résulter d'une exposition à un agent chimique ou physique (stress exogènes tels que

les irradiations et les médicaments anti-cancéreux) ou bien, après passage de la machinerie de réplication ou de transcription sur de l'ADN endommagé (ou lésé) (stress endogènes). Les CDB « naturelles » sont, elles, programmées et nécessaires à des processus physiologiques comme lors de la recombinaison méiotique et l'établissement du répertoire antigénique des cellules de l'immunité acquise (recombinaison V(D)J) (Mehta et Haber, 2014).

1.2) La réparation des CDB: NHEJ ou RH ?

Dans les cellules somatiques eucaryotes, deux systèmes de réparation des CDB de l'ADN peuvent être employés: la jonction d'extrémités cassées par non homologous end-joining (NHEJ) ou l'utilisation d'une séquence d'ADN homologue non lésée par recombinaison homologue (RH) (**Figure 5**) (Ceccaldi et al., 2016).

La prise en charge des CDB par la voie du NHEJ ou de la RH est principalement régulée en fonction du cycle cellulaire (**Figure 5**) (Ceccaldi et al., 2016; Chatterjee et Walker, 2017; Her et Bunting, 2018; Mehta et Haber, 2014; Prakash et al., 2015). Ainsi, les cellules privilégient le NHEJ en phases pré- et post-répliques, G1 et G2 ; alors que la RH est favorisée en phase réplique S et en moindre mesure en post-réplique G2. En effet, uniquement durant les phases S et G2, la chromatide sœur est présente pour servir de modèle afin de réparer la CDB par RH.

La RH peut alors intervenir durant ces phases S/G2 : lors d'un blocage de la fourche suite à la présence d'une cassure de l'ADN (ADN simple brin « cassé ») ou à l'effondrement (ou « collapse ») de la fourche de réplication. Elle intervient aussi pour réparer des brins d'ADNsb formés suite au passage de la fourche (« gaps » ou « trous » d'ADNsb après réplication) (Costes et Lambert, 2013; Mehta et Haber, 2014). Néanmoins, d'autres situations nécessitent la présence d'une séquence homologue lors d'une réparation par RH, comme pour les CDB méiotiques dans les cellules germinales en méiose et le maintien de la taille des télomères (mécanisme d'Alternative Lengthening of Telomeres, ALT) dans les cellules cancéreuses (Cho et al., 2014; Hunter, 2015; Tarsounas et West, 2005).

La CDB est signalée par la voie de réponse aux dommages de l'ADN (appelé DDR, DNA Damage Response) qui coordonne les voies de réparation, l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoints) et la réorganisation de la

structure chromatinienne (Panier et Boulton, 2014). Un des premiers évènements de signalisation de la CDB correspond à la phosphorylation de la serine 139 du variant d'histone H2A.X (γ H2A.X) par la kinase ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) au niveau de la CDB. Ce signal γ H2A.X est largement utilisé comme marqueur des CDB. Durant la phase G1, la cascade de signalisation initiée par ATM aboutit au recrutement stable de 53BP1 (p53 Binding Protein 1) à la CDB. Elle protège les extrémités contre leur résection inhibant ainsi la progression vers la voie de la RH et induit le recrutement d'acteurs du NHEJ. Durant la phase S/G2, BRCA1 (Breast Cancer 1) inhibe la liaison de 53BP1 et induit l'activation d'acteurs de la résection pour favoriser la voie de la RH (Bunting et al., 2010). La balance entre le recrutement de 53BP1/BRCA1 aux CDB semble dépendre en partie d'un remodelage chromatinien spécifique local de la CDB. Notamment, la déposition de marques d'histones par des remodeleurs activés par la cascade ATM tels que RNF8-RNF168 favoriserait le recrutement de 53BP1 à la CDB (Her et Bunting, 2018; Panier et Boulton, 2014). De plus, les acteurs de la résection sont eux-mêmes fortement régulés au cours du cycle notamment par les CDK (Cycline dépendante des kinases) (Ceccaldi et al., 2016; Chatterjee et Walker, 2017; Prakash et al., 2015).

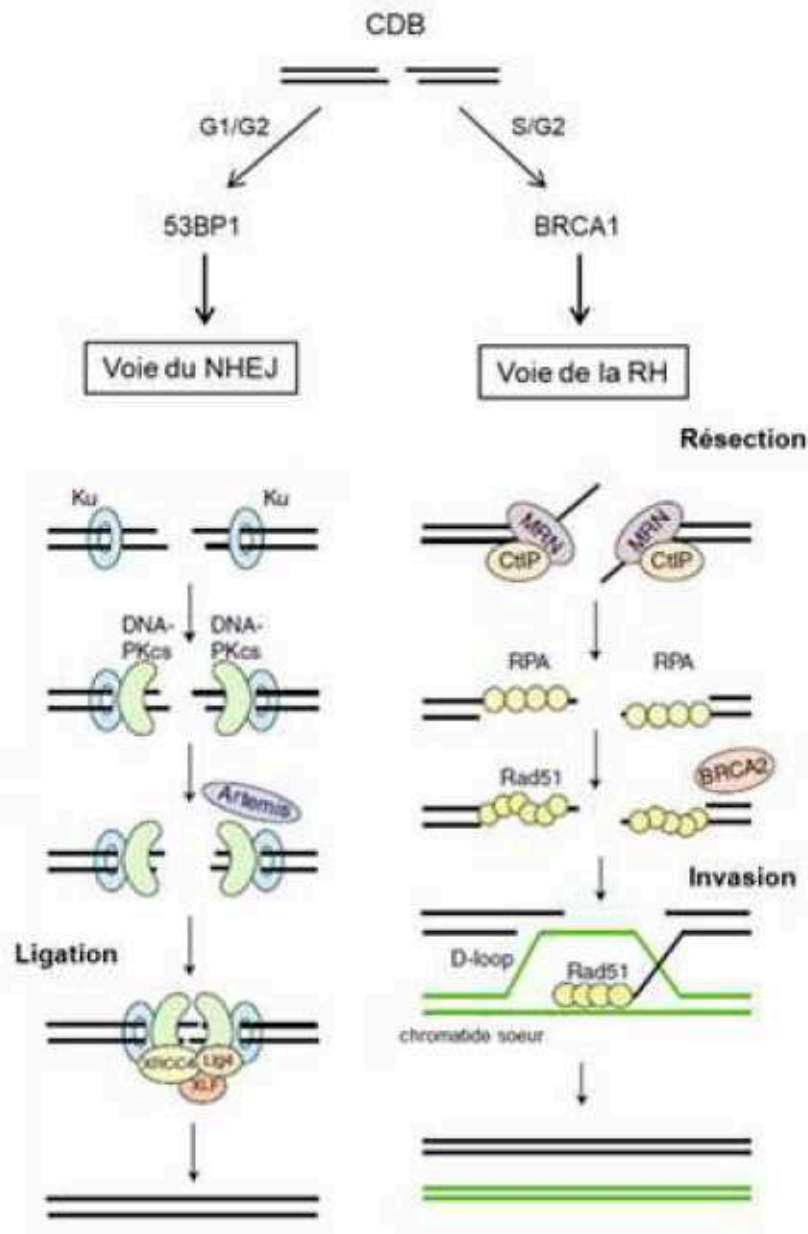


Figure 5 : Les voies de réparation des CDB en fonction du cycle cellulaire.

Après formation d'une CDB, le choix de réparation de la cassure dépend en grande partie du cycle cellulaire. En phase S ou G2, BRCA1 facilite la réparation de la CDB par RH en favorisant l'activation de MRN/CtIP, acteurs de la résection des extrémités de la CDB. Après résection, les extrémités d'ADNsb sont protégées par RPA avant d'être liées par RAD51 à l'aide de BRCA2. La CDB est réparée par néosynthèse d'ADN après invasion du filament RAD51 qui utilise la chromatide sœur comme matrice. En phase G1 ou G2, 53BP1 est recrutée à la CDB et empêche la résection des extrémités de la CDB. La réparation par la voie du NHEJ s'initie par le recrutement des protéines Ku/DNA-Pkcs. Si nécessaire, la nucléase Artemis peut rogner les extrémités de la CDB pour faciliter la ligation des extrémités. Le complexe de ligation XRCC4-XLF-Ligase 4 relie les extrémités franches de la CDB. (adapté de (Brandsma et Gent, 2012a))

2) Les étapes de la recombinaison homologue

La RH s'initie par la résection (ou dégradation) des extrémités 5' de la CDB pour former des extrémités 3' sortantes (résection de 5' vers 3') qui recherchent et envahissent un brin d'ADN homologue en formant une D-Loop (Displacement Loop) (**Figure 6**). Le brin d'ADN envahissant commence une synthèse d'ADN en utilisant comme matrice le brin intact. A ce stade, la D-loop peut être maintenue ou dissoute. Lorsqu'elle est dissoute, le brin d'ADN lésé néosynthétisé vient s'hybrider à l'autre extrémité de la CDB et répare son ADN manquant par synthèse d'ADN via le mécanisme de SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) (**Figure 6**). Dans ce cas, la réparation de la CDB ne donne pas lieu à un échange réciproque de matériel génétique, c'est-à-dire à un CO. Des produits de Non Cross-Over (NCO) sont alors formés. Lorsque la D-Loop est maintenue, la synthèse d'ADN peut continuer. L'autre extrémité de la CDB (celle qui n'a pas « envahit ») s'hybride alors avec le brin d'ADN déplacé de la chromatide sœur. Cette nouvelle étape d'hybridation est appelée « second-end capture » (**Figure 6**). La synthèse d'ADN se fait maintenant sur l'autre extrémité de la CDB (celle qui n'a pas « envahit »). Les deux molécules d'ADN finissent par s'entrecroiser et forme une structure de molécules jointes d'ADN appelée double jonction de Holliday (dJH) (**Figure 6**). Cette forme branchée de molécules d'ADN peut se dissoudre par l'action d'hélicases et de topoisomérases sans former de CO (NCO) ou se résoudre par action nucléolytique en formant (CO) ou non des CO (NCO) en fonction de où sont clivées les molécules d'ADN (**Figure 6**) (Kowalczykowski, 2015; San Filippo et al., 2008).

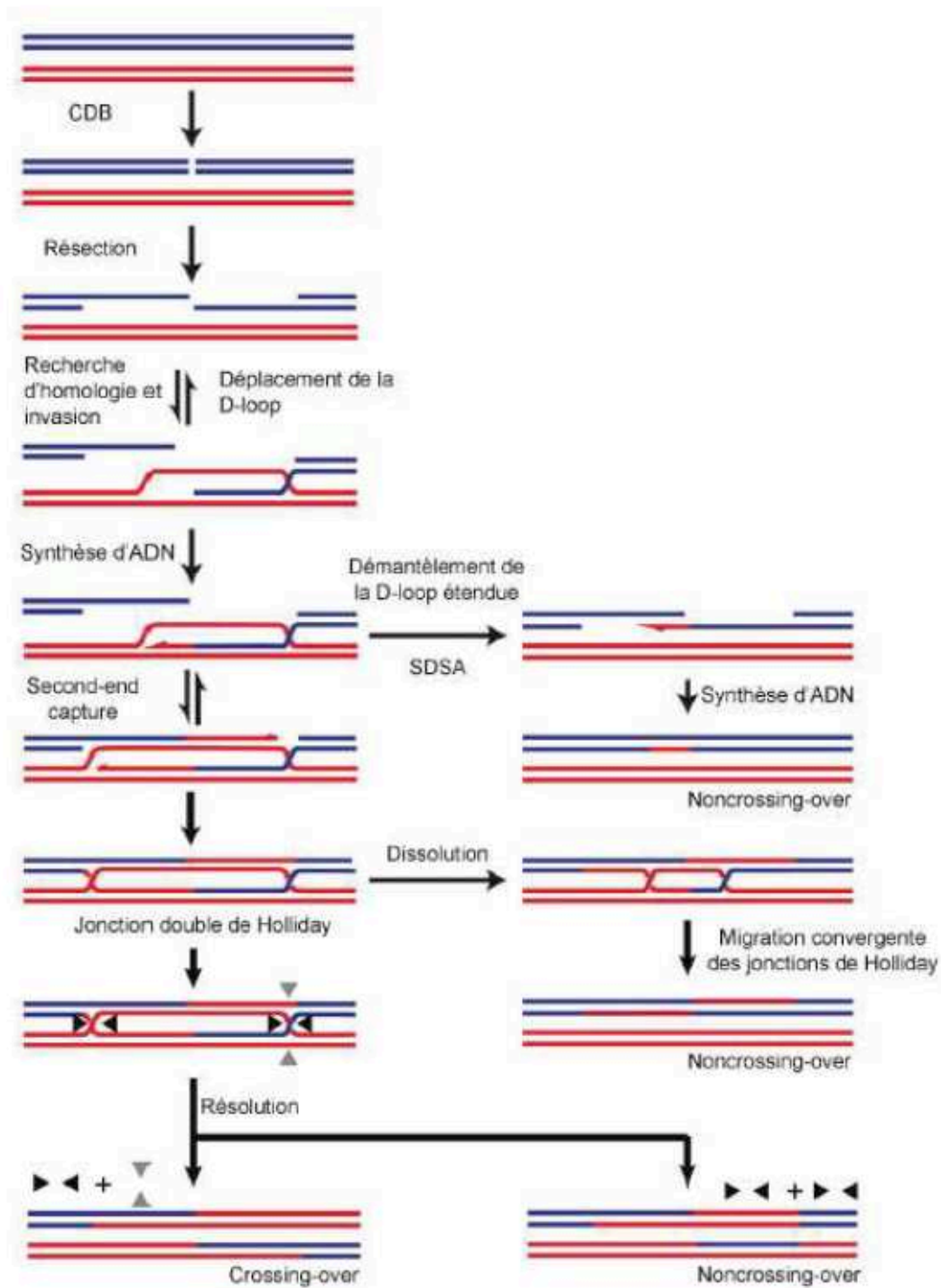


Figure 6 : La réparation des CDB par recombinaison homologue

Les flèches simples et doubles représentent des étapes irréversibles et réversibles, respectivement. Les têtes fléchées représentent le sens de la coupure faite par les endonucléases lors de la résolution (adapté de (Kowalczykowski, 2015)).

2.1) La résection

Recruté aux CDB avec CtIP (C-terminal Binding Protein (CtBP) Interacting Protein), le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1 : Meiotic Recombination 11-RADiation sensitive 50-Nibrin) commence par cliver l'ADN à proximité de la CDB grâce à l'activité endonucléase de MRE11 (**Figure 7**). Deux activités nucléasiques vont alors dégrader l'ADN de façon bidirectionnelle à partir de cette entaille à proximité de la CDB. Une première phase de résection courte s'effectue par l'activité exonucléase 3'>5' de MRE11 qui dégrade l'ADN de l'extrémité 3' vers 5' (**Figure 7**). Puis, une seconde phase de résection par les exonucléases 5'>3' de EXO1 (Exonucléase 1) et DNA2 (DNA replication helicase/nuclease 2) qui dégrade l'ADN de l'extrémité 5' vers 3' sur plusieurs centaines de paires de bases (bp) avec l'aide de l'hélicase BLM (Bloom syndrome protein) (**Figure 7**). Cette phase de résection « étendue » permet de générer de longs bras d'ADNsb essentiels à l'étape d'invasion. La régulation de la résection se fait essentiellement par l'activation et le recrutement de MRN qui dépend de la phosphorylation de CtIP par des CDK régulées au cours du cycle cellulaire (Dexheimer, 2013; Kowalczykowski, 2015; Syed et Tainer, 2018). L'interaction du domaine C-terminal de BRCA1 avec CtIP est requis pour l'activation de CtIP, suggérant que BRCA1 via son interaction avec CtIP participe à l'activation du complexe MRN, et donc à l'activation de l'activité de résection (Prakash et al., 2015; Sartori et al., 2007).

Le complexe trimérique majeur de liaison à l'ADNsb, le complexe RPA (Replication Protein A), vient se charger sur l'ADNsb formé après résection afin de le protéger contre la dégradation et la formation de structures secondaires. La structure et les fonctionnalités essentielles de RPA dans le métabolisme de l'ADN, et en particulier en RH, seront décrites de façon détaillées ultérieurement.

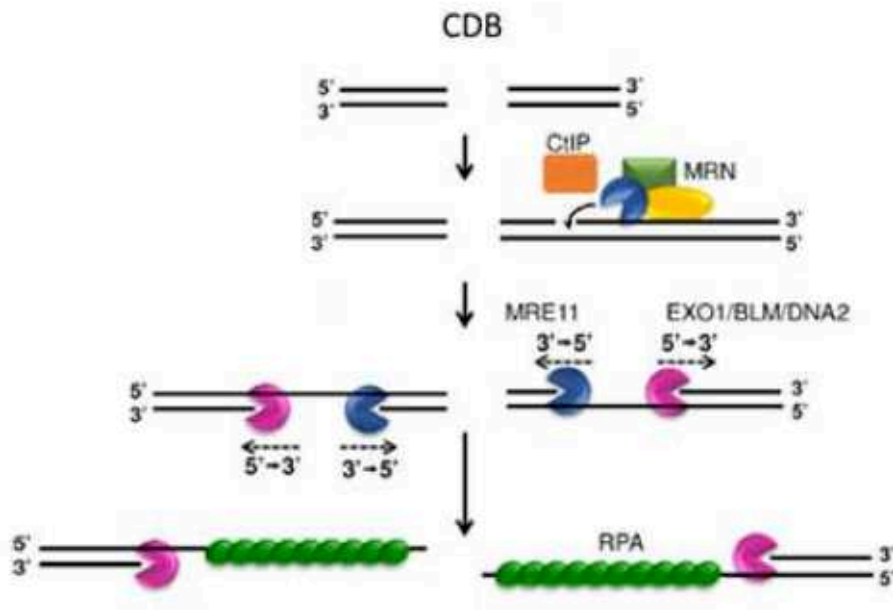


Figure 7 : Modèle de la résection bidirectionnelle chez les mammifères

Le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) avec CtIP reconnaît la CDB et induit une cassure à proximité de la CDB grâce à son activité endonucléase. A partir de cette incision, l'activité exonucléase de MRE11 permet de dégrader l'ADN de 3' vers 5' et celles d'EXO1/DNA2 avec l'aide de BLM de 5' vers 3'. EXO1-DNA2-BLM dégrade jusqu'à des centaines de paires de base générant de longs bras d'ADNsb recouverts par RPA. (adapté de (Shibata et al., 2018))

2.2) L'invasion

L'étape d'invasion se fait grâce au chargement et à l'activité de la recombinaise RAD51 sur l'ADNsb. Elle permet la recherche d'homologie et l'échange des brins d'ADN. Des régulateurs (ou médiateurs) permettent de passer d'un filament d'ADNsb protégé par RPA à un filament d'ADNsb recouvert par les recombinaises (on parle de filament présynaptique) capable d'effectuer l'invasion.

Très conservée entre les archéobactéries, les procaryotes et les eucaryotes, RAD51 fait partie de la famille des orthologues des protéines RecA chez les bactéries. Tout comme RecA, elle forme des filaments nucléoprotéiques en se liant à l'ADNsb. *In vitro*, un monomère de RAD51 lie trois nucléotides et tous les six monomères un tour d'hélice est généré sur le filament RAD51. Son activité ATPasique est importante pour sa régulation et sa capacité à former des filaments. Sa fixation à l'ADN induit l'hydrolyse de l'ATP : la forme inactive ADP-RAD51 rend le filament RAD51 instable (Bhat et Cortez, 2018). La régulation du filament RAD51 au cours de la RH peut passer par la modulation (1) du chargement de RAD51, (2) de la

stabilité de RAD51 à l'ADNsb ou encore (3) de l'activité recombinaise de RAD51 (Kowalczykowski, 2015; Prakash et al., 2015; San Filippo et al., 2008).

Chez différentes espèces allant de la levure à l'Homme, les modulateurs de l'assemblage et désassemblage du filament présynaptique, et donc du chargement de RAD51, possèdent des caractéristiques communes conservées. Ils possèdent tous une capacité de liaison préférentielle à l'ADNsb et d'interaction avec RAD51 (Kowalczykowski, 2015; San Filippo et al., 2008).

- Le chargement de RAD51 :

Chez l'Homme, le régulateur crucial du chargement de RAD51 est BRCA2 (Breast Cancer 2). Le modèle qui prévaut aujourd'hui est que BRCA2 déplace RPA pour y déposer RAD51 grâce à sa haute affinité avec l'ADNsb (Jensen et al., 2010; Liu, J. et al., 2010). BRCA2 possèdent deux modes d'interaction distincts avec RAD51 (Carreira et Kowalczykowski, 2011). Les domaines BRC répétés 1 à 4 de BRCA2 interagissent préférentiellement avec RAD51 libres (ou non liées à de l'ADNsb) et les domaines BRC 5 à 8 interagissent préférentiellement avec RAD51 liées à l'ADNsb (Carreira et al., 2009; Carreira et Kowalczykowski, 2011). Et, les domaines BRC 1 à 4 bloquent l'hydrolyse de l'ATP par RAD51 empêchant sa dissociation de l'ADNsb et conservant sa forme structurale active. Les domaines BRC 1 à 4 faciliteraient le chargement de RAD51 à l'ADNsb et sa nucléation (**Figure 8**). Les domaines BRC 5 à 8 lieraient RAD51 déjà chargées sur l'ADNsb pour favoriser son extension sur l'ADNsb en stabilisant le filament RAD51 (**Figure 8**). Ainsi, BRCA2 permettrait à la fois la nucléation de RAD51 à l'ADNsb et la stabilisation de RAD51 au fur et à mesure de leur ajout sur le filament d'ADN grâce à l'action distincte des domaines BRC (Carreira et Kowalczykowski, 2011).

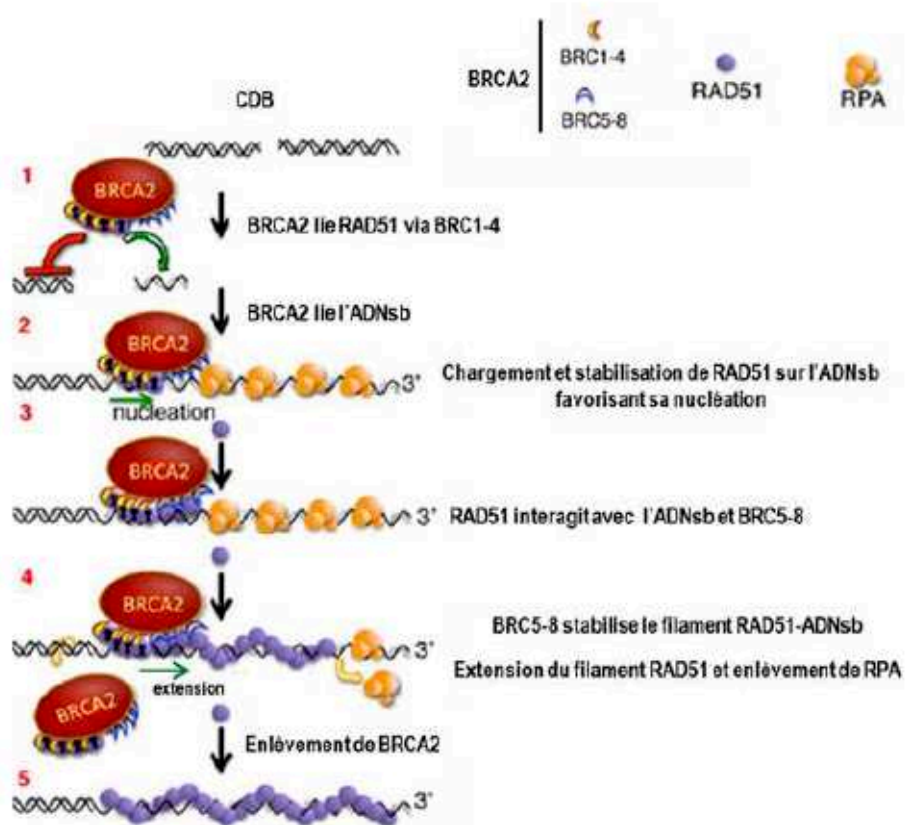


Figure 8 : Modèle de formation du filament RAD51 par BRCA2

(1) RAD51 lie les domaines BRC1-4 de BRCA2. (2) Le chargement de BRCA2 à l'ADNsb permet le recrutement de RAD51 qui est stabilisé permettant sa nucléation à l'ADNsb. (3) Après la nucléation de RAD51 sur l'ADNsb, BRC5-8 lie le filament RAD51 naissant et favorise son extension en le stabilisant. (4) L'extension du filament RAD51 déplace RPA de l'ADNsb. BRCA2 se dissocie de l'ADNsb. (5) Le filament RAD51 formé est capable de s'apparier avec une séquence homologue. (modifié d'après (Carreira et Kowalczykowski, 2011)).

Pour autant, BRCA2 n'interagit pas directement avec RPA (Jensen et al., 2010). Une possibilité est qu'un partenaire d'interaction de BRCA2 lie directement RPA pour favoriser son désassemblage de l'ADNsb (Zhao et al., 2015). Il a été proposé qu'un nouvel interactant de BRCA2, DSS1 (Deletion of SUV3 Suppressor) joue ce rôle. La combinaison d'approches biochimiques, structurales et *in vivo* suggère que DSS1 mime l'ADNsb afin d'atténuer l'affinité de RPA à l'ADNsb, ce qui favorise le désassemblage de RPA en faveur de l'assemblage de RAD51 (**Figure 9**) (Zhao et al., 2015).

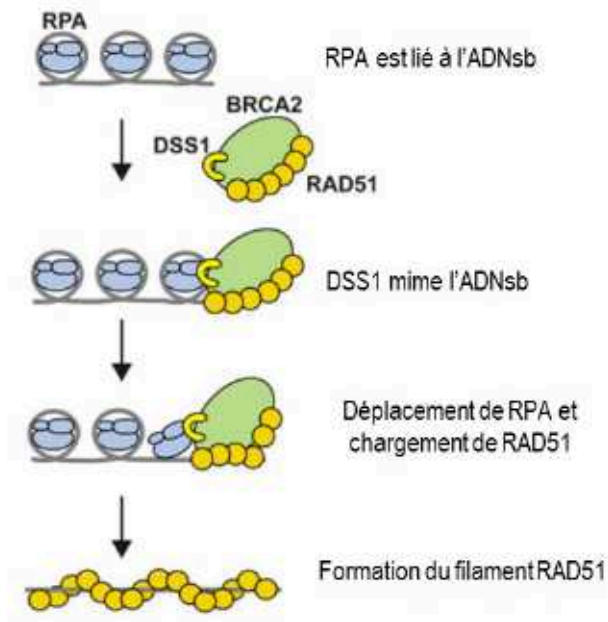


Figure 9 : Modèle du déplacement de RPA par BRCA2 et DSS1

BRCA2 est recruté à l'ADNsb grâce à sa haute affinité avec le simple brin. DSS1 interagit avec RPA en mimant l'ADNsb. Cette interaction diminue l'affinité de RPA avec l'ADNsb favorisant sa dissociation de l'ADNsb. BRCA2 charge RAD51 sur l'ADNsb. (adapté de (Zhao et al., 2015)).

- Les régulateurs de l'activité d'invasion du filament RAD51 :

Chez la levure, l'homologue fonctionnel de BRCA2 est Rad52. En revanche, la protéine humaine RAD52 n'est pas considérée comme un médiateur de la formation du filament RAD51 car elle stimule davantage l'activité d'invasion de RAD51 que son chargement (Jensen et al., 2010; Kowalczykowski, 2015).

Chez les mammifères, des paralogues de RAD51 (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3) et le complexe SWS1-SWSAP1 sont tous capables de lier RAD51 et l'ADNsb. Des études structurales et d'interactions ainsi que les études menées chez les paralogues de RAD51 levures suggèrent des rôles stabilisateurs du filament RAD51 (Fasching et al., 2015b; Prakash et al., 2015; Takata et al., 2001). De plus, l'inactivation d'un des paralogues de RAD51 chez la souris cause une mortalité embryonnaire, montrant l'importance de ces protéines (Kowalczykowski, 2015). Leur implication en RH reste à être détaillée chez les mammifères.

La protéine PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) (aussi FANCN) se lie à la fois à BRCA1 et BRCA2, et semble posséder deux rôles au cours de la RH. D'une part, des études biochimiques ont montré que PALB2 lie l'ADN et RAD51, et stimule l'activité d'invasion de RAD51 en présence de BRCA2. PALB2 se lie

préférentiellement aux structures d'ADN en D-Loop et son interaction avec RAD51 viendrait stabiliser la D-Loop (Buisson et al., 2010; Dray et al., 2010). D'autre part, PALB2 avec BRCA2 est capable de stimuler la synthèse d'ADN par la polymérase η de filaments intermédiaires de l'invasion (Buisson et al., 2014). PALB2 pourrait alors en interagissant avec BRCA1 et BRCA2 participer à l'invasion du filament RAD51 et ensuite avec BRCA2 favoriser la stabilisation de la D-Loop pour permettre la synthèse d'ADN (Kowalczykowski, 2015; Prakash et al., 2015).

Chez la levure, la translocase ATP dépendante Rad54 lie le filament présynaptique Rad51-ADNsb et facilite l'appariement des brins d'ADN lors de la recherche d'homologie en conférant une stabilité accrue du filament (indépendante d'hydrolyse d'ATP), ce qui facilite la formation de la D-Loop (Kowalczykowski, 2015; Mazin et al., 2010). De plus, Rad54 semble aussi impliquée en postsynaptique (ou post « invasion ») : elle est capable *in vitro* de se transloquer (ou diffuser) de l'ADNdb et d'enlever RAD51. L'enlèvement de RAD51 laisserait les extrémités 3'OH de l'ADN libres nécessaires à l'initiation de la synthèse par les polymérases (Mazin et al., 2010). Chez la souris les homologues de Rad54, RAD54 et RAD54B favorisent la RH (Wesoly et al., 2006). Chez l'Homme, RAD54 et RAD54B sont capables de s'associer à RAD51 (Mazina et Mazin, 2004; Tanaka et al., 2000). *In vitro*, RAD54 stimule l'activité d'appariement et d'invasion par RAD51 (Mazina et Mazin, 2004; Sigurdsson et al., 2002). Leurs rôles précis restent néanmoins peu connus chez les mammifères (Miyagawa et al., 2002; Zhang, Z. et al., 2007).

- Les régulateurs négatifs du filament RAD51 :

Parmi les régulateurs négatifs de la formation et stabilisation du filament de RAD51, les hélicases humaines FANCI (Fanconi anemia group I protein), RECQ5 (DNA helicase RecQ-like 5), FBH1 (F-box DNA helicase 1) et BLM (Bloom syndrome protein) sont toutes capables d'empêcher la formation du filament RAD51 en dissociant RAD51 de l'ADNsb (Heyer, 2015; Kowalczykowski, 2015). Les hélicases sont des ATPases capables de transloquer le long de l'ADN et d'enlever des protéines liées à l'ADN. Classiquement, elles permettent le désappariement des doubles brins d'ADN (ou d'ARN) au niveau de jonction ADNdb/ADNsb en rompant les liaisons hydrogènes (Toussaint, 1995).

Après l'invasion, le brin d'ADN apparié peut (1) ne jamais initier de synthèse d'ADN et avorter spontanément la RH, (2) initier la synthèse d'ADN et dissoudre la D-loop pour réparer par SDSA ou (3) synthétiser et allonger ce brin d'ADN néosynthétisé jusqu'à la formation de la dJH.

2.3) L'extension de la D-Loop et la synthèse d'ADN

Après l'invasion du brin homologue par le filament RAD51 et son désassemblage, le brin d'ADN s'apparie de façon stable et forme un hétéroduplex d'ADN. La (les) polymérase(s) peuvent commencer à synthétiser de l'ADN au niveau des extrémités libres 3'OH au sein de la D-Loop. Puis, l'élongation du brin néosynthétisé entraîne un déplacement de la D-Loop : on parle d'extension de la D-Loop. Cette synthèse d'ADN est dépendante d'une action combinée de la polymérase δ , de PCNA (Proliferating Cell Antigen A) et de RPA. En effet, des expériences menées avec des protéines humaines et de levures ont montré que la polymérase δ est capable de synthétiser de l'ADN dans des D-loops produites par RAD51 (Li et al., 2009; Sneed et al., 2013). RPA semble fixer et stabiliser l'ADNsb au sein de la D-Loop au cours de la progression de la polymérase δ et l'ajout de PCNA stimule la processivité de cette dernière (Mcvey et al., 2017; Sneed et al., 2013). D'autres études biochimiques avec des protéines humaines ou de levures et génétiques chez les levures ont révélé que les polymérase ϵ et η sont aussi capables de synthétiser de l'ADN de D-Loop bien que leurs rôles précis ne soient pas bien établis (Mcvey et al., 2017; Sneed et al., 2013; Wright et al., 2018).

L'élongation du brin d'ADN amène des contraintes topologiques qui peuvent engendrer le blocage de la synthèse au sein de la D-Loop. De manière générale, les topoisomérases et les hélicases enlèvent ces contraintes pour permettre à la synthèse de se poursuivre. Les hélicases désappariaient les jonctions ADNdb/ADNsb tandis que les topoisomérases décatènent (ou « désenchangent ») des molécules jointes d'ADN. Ces dernières induisent une cassure simple ou double brin d'ADN (topoisomérase de type I et II, respectivement) et font passer un brin d'ADN à travers cette cassure pour les décatèner (Toussaint, 1995).

Chez les mammifères, le complexe d'hélicases MCM8-MCM9 (Minichromosome maintenance 8 et 9) semble impliqué dans la régulation de la synthèse. MCM8-MCM9 favorise la synthèse d'ADN de façon RAD51-dépendante, suggérant ainsi son implication en RH (Natsume et al., 2017). Dans une étude récente, Husted et al., ont

identifié le recruteur du complexe MCM8-MCM9 aux CDB, HROB (Homologous Recombination factor with OB domain) (Hustedt et al., 2019). HROB interagit à la fois avec MCM8-MCM9, l'ADNsb et RPA : des acteurs situés à la D-Loop et tous impliqués dans la régulation de la synthèse d'ADN. De plus, la double inactivation de HROB et de l'hélicase HELQ (Helicase POLQ-like) dans des cellules humaines suggère que HROB-MCM8-MCM9 d'une part et HELQ d'autre part participent à deux voies redondantes dans la régulation de la synthèse d'ADN en RH (Figure 10) (Hustedt et al., 2019). Les souris déficientes pour HROB, MCM8 et MCM9 arborent le même phénotype d'infertilité associé à un arrêt de progression des cellules méiotiques, montrant leurs rôles essentiels en RH méiotique (Griffin et Trakselis, 2019; Hartford et al., 2011; Hustedt et al., 2019; Lutzmann et al., 2012).

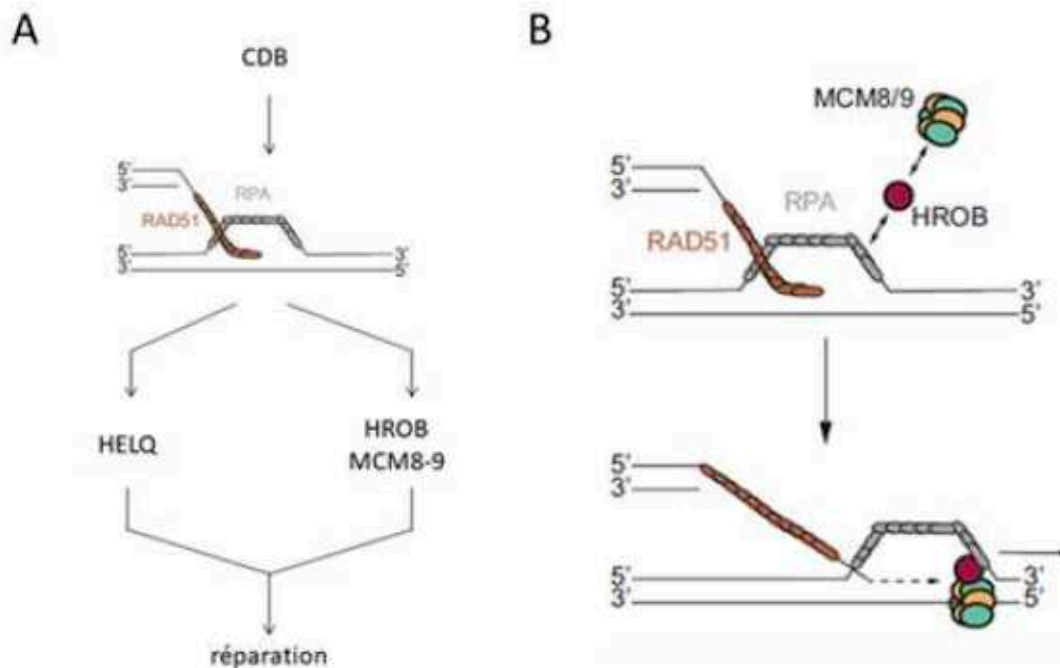


Figure 10 : Modèle des rôles de HELQ et du complexe HROB-MCM8-MCM9 en recombinaison

A) HELQ et HROB-MCM8-MCM9 constituent deux voies parallèles de réparation des CDB après invasion du filament RAD51 en RH. B) HROB-MCM8-MCM9 favorise la synthèse d'ADN après invasion. HROB interagit avec RPA et le complexe MCM8-MCM9. HROB favorise la localisation de MCM8-MCM9 aux sites de recombinaison. L'interaction de HROB avec RPA au niveau du brin d'ADN déplacé au sein de la D-Loop favoriserait la localisation de MCM8-MCM9. Le positionnement correct de MCM8-MCM9 par HROB faciliterait la progression de la synthèse d'ADN et la migration de la bulle de réplication post-invasion. (modifié d'après (Hustedt et al., 2019))

2.4) Démantèlement de la D-Loop

Après avoir initié la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop, celle-ci peut être démantelée (ou réversée) avant d'être prise en charge par la voie de réparation SDSA afin de réparer la cassure d'ADN. De nombreuses données biochimiques suggèrent l'implication d'hélicases de par leur capacité à séparer des jonctions d'ADNdb/ADNsb. Notamment, chez l'Homme, les hélicases FANCM (Fanconi anemia group M protein), RECQ1 (DNA helicase RecQ-like 1), WRN (Werner syndrome helicase) et BLM possèdent toutes un pouvoir antirecombinogène *in vivo* et la capacité *in vitro* de démanteler la D-Loop (Heyer, 2015; Kowalczykowski, 2015). Il est proposé que BLM démantèle la D-Loop à l'aide de TOPIII α -RMI1/2 (DNA topoisomerase 3-alpha; RecQ-mediated genome instability protein 1 et 2) et de RPA (Fasching et al., 2015; Van Brabant et al., 2000). Le mécanisme d'action des autres hélicases dans le démantèlement de la D-Loop n'a pas été mis en évidence et pourrait nécessiter des acteurs/régulateurs inconnus à ce jour venant aider l'action des hélicases.

2.6) La capture de la seconde extrémité de la CDB de l'ADN

Si la D-loop reste stabilisée, le brin d'ADN de la CDB qui n'a pas envahi va s'apparier avec le brin d'ADN déplacé: on parle de « second-end capture » pour former une structure d'hétéroduplex jointe de deux molécules d'ADN, la dJH.

La second-end capture a été principalement décrite *in vitro* avec des protéines recombinantes de levure. Elle est (1) catalysée par Rad52, (2) implique l'interaction de Rad52 et Rpa qui recouvre à la fois l'extrémité qui a envahi au sein de la D-loop et l'autre extrémité de la CDB qui n'a pas envahi et (3) est favorisée par la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop (Kowalczykowski, 2015; Wright et al., 2018). L'absence de RAD52 chez la souris n'induit pas de stérilité à l'inverse de son homologue levure. RAD52 n'est donc pas essentielle à cette étape puisque la formation des CO méiotiques n'est pas altérée (Rijkers et al., 1998). Chez l'Homme, RAD52 est capable de lier l'ADNsb recouvert par RPA *in vitro* (Jensen et al., 2010). Sa déplétion dans les cellules humaines montre une augmentation de la réparation des cassures par SDSA, ce qui corrèle avec un rôle dans la second-end capture (Kan et al., 2017). Chez les mammifères, les acteurs/régulateurs restent pas ou peu connus et

pourraient impliquer des protéines de liaison à l'ADNsb capables de lier RPA au sein de la D-loop pour stimuler la second end-capture.

2.7) La dissolution et la résolution de la dJH

La double jonction de Holliday (dHJ) formée par la jonction des deux molécules d'ADN entre elles peut être (1) dissoute en ne formant pas de produit de CO (NCO) (activité hélicase) ou (2) résolue par clivage des brins d'ADN en formant ou non des produits de CO (CO et NCO, respectivement) en fonction de où sont clivés les brins d'ADN (activité nucléasique dite « résolvasse ») (**Figure 11**). L'importance de la prise en charge de la dJH chez les mammaliens a été clairement observée de par la létalité synthétique des cellules déplétées de l'hélicase BLM (voie de la dissolution) et de la nucléase SLX4 (voie de la résolution) ou des nucléases SLX4 et GEN1 (voies de la résolution) (Garner et al., 2013; Wyatt et al., 2013).

(1) Une jonction de Holliday est une jonction à quatre voies qui engage deux molécules d'ADNdb (ou duplex) (Holliday, 1964). La libération des deux molécules d'ADN peut se faire via un processus appelé la « dissolution ». La dissolution d'une dJH 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. De cette façon, les deux molécules d'ADN sont séparées l'une de l'autre sans échange réciproque de séquences d'ADN (sans CO). Chez les mammifères, le complexe BLM-TOPIII α -RMI1/2 (BTR) promeut la dissolution de la dJH (**Figure 11**). BLM recruterait la topoisomérase III α à l'ADN et stimule son activité de décaténation avec l'aide de RMI1/2. Cette interaction fonctionnelle impliquant une hélicase de la famille RecQ et une Topoisomérase III semble être conservée de la bactérie à l'Homme ainsi que la stimulation de l'activité enzymatique de la topoisomérase par l'hélicase (Bizard et Hickson, 2014; Heyer, 2015). En plus, RPA est capable d'interagir via RMI1-RMI2 avec le dissolvosome BTR et stimule l'activité de dissolution des dJH par le BTR (Xue et al., 2013). Les personnes ayant des mutations de BLM souffrent du Syndrome de Bloom caractérisé par un excès d'échange entre chromatides sœurs (CO) et une instabilité génétique prédisposant au cancer (Heyer, 2015; West, S. C. et al., 2015), montrant l'importance de l'activité anti-recombinogène (anti-CO) de cette hélicase.

(2) La libération des deux molécules d'ADN de la dJH peut aussi se faire via un processus appelé la « résolution ». La résolution nécessite l'action d'endonucléases spécifiques de structures précises de l'ADN (ou « résolvas ») qui clivent les deux JH et forment des produits de CO ou de NCO après ligation des brins d'ADN clivés. Le clivage symétrique ou asymétrique des deux jonctions de Holliday aboutit à des produits de NCO et de CO, respectivement. Dans les cellules humaines, les nucléases impliquées sont d'une part SLX1-SLX4 et MUS81-EME1 qui forment le complexe SLX-MUS et d'autre part la nucléase GEN1 (**Figure 11**) (Castor et al., 2013).

- L'association de SLX1-SLX4 et MUS81-EME1 permet la reconnaissance d'une grande variété de structures d'ADN par les résolvas, ce qui confère à ce complexe un haut potentiel d'activité résolvas. Cette activité résolvas de dHJ *in vitro* est supérieure en présence des deux dimères plutôt que séparément. Le dimère SLX cliverait la dJH pour générer une structure clivée d'ADN reconnue spécifiquement par MUS81-EME1 pouvant être alors à nouveau clivée. Plusieurs régulateurs du cycle cellulaire tels que CDK1 et PLK1, kinases actives en phase G2 principalement, modulent l'interaction du complexe SLX-MUS ainsi qu'avec d'autres interactants (West, S. C. et al., 2015; Wright et al., 2018).

- Le mécanisme d'action de GEN1 est très similaire à la résolvas de référence RuvC décrite chez *E.Coli*: un homodimère clive deux sites d'ADN situés à l'exact opposé de la dHJ de façon coordonnée et symétrique. Sa régulation se ferait principalement via la modulation de sa localisation nucléaire. Dans les cellules humaines, GEN1 est exclue du noyau par sa séquence d'exportation nucléaire. A la transition G2/M, la membrane nucléaire se désassemble et donne l'accessibilité de GEN1 aux chromosomes pour résoudre des JH rémanentes (Garner et al., 2013; West, S. C. et al., 2015).

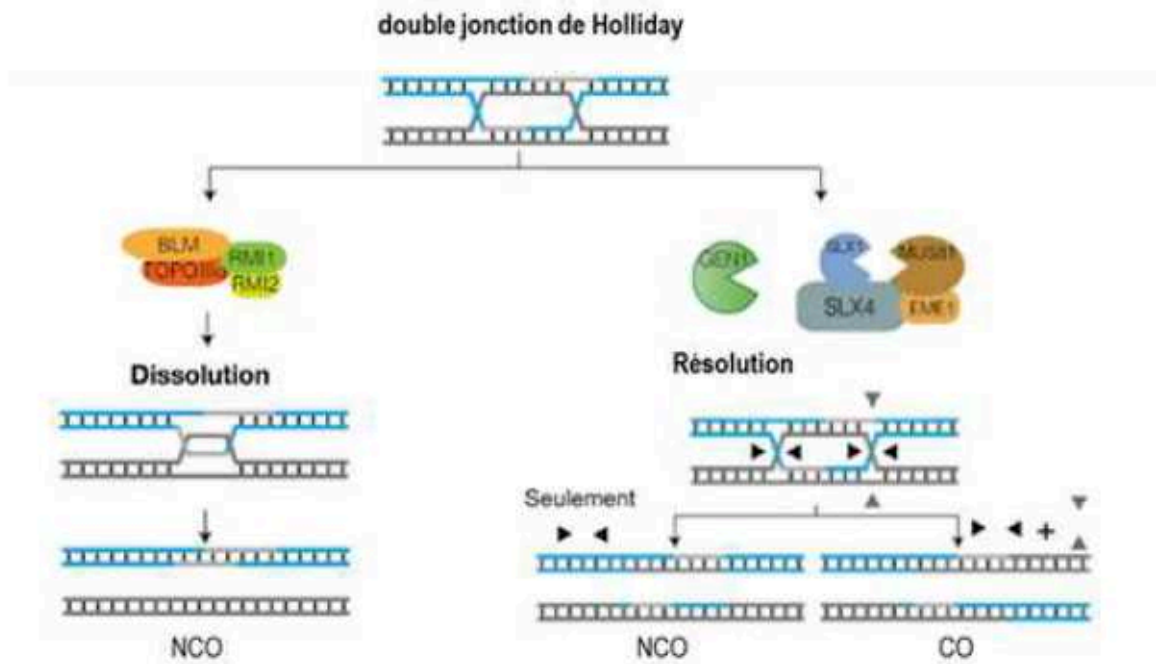


Figure 11 : La dissolution ou la résolution de la double jonction de Holliday

Le complexe BTR désenchaîne les brins d'ADN joints de la double jonction de Holliday (dJH) par mécanisme de dissolution et génère des produits de non cross-over (NCO). Les endonucléases structurales du complexe SLX-MUS, formé par SLX1-SLX4 et MUS81-EME1, d'une part et GEN1 d'autre part clivent la dJH par mécanisme de résolution. Le clivage symétrique ou asymétrique de la dJH génère des produits de NCO et de cross-over (CO), respectivement. (adapté de (Matos et West, 2014))

Bien que le choix entre dissolution ou résolution des dJH chez les mammifères n'est pas compris à ce jour, elles semblent régulées en partie en fonction du cycle cellulaire selon la nécessité ou non de former un CO. Chez les mammifères, la voie du NCO prédomine par rapport à celle du CO en RH (jusqu'à un ratio de 30 pour 1 dans des cellules embryonnaires souris et 6 pour un 1 dans des cellules humaines). A cela s'ajoute la faible fréquence des événements de RH dans les cellules (estimé à 1 pour 100 CDB en moyenne). La formation d'un CO est donc préférentiellement réprimée et constitue un événement particulièrement rare (Moynahan et Jasin, 2010).

B) La recombinaison méiotique

La recombinaison méiotique suit les mêmes grandes étapes que la RH mitotique. Elle se caractérise par l'action combinée de facteurs ubiquitaires impliqués en RH mitotique et de facteurs spécifiquement exprimés dans les cellules germinales. Cette implication de facteurs méiotiques spécifiques avec des facteurs ubiquitaires apporte des spécificités d'actions et de régulations à la RH méiotique à chaque étape de son déroulement. Elle aboutit à la formation d'un CO au moins par paire de chromosomes homologues (ou bivalents). Les spécificités méiotiques de cette RH spécialisée seront présentées aux différentes étapes de la RH.

1) La formation des CDB méiotiques programmées

Le RH méiotique s'initie par la formation de CDB programmées localisées préférentiellement aux niveaux de sites spécifiques appelés points chauds (ou « hotspots ») de recombinaison (Baudat et al., 2013; Lam et Keeney, 2015). Dans les spermatocytes murins et humains, les CDB formées sont estimées entre 200 et 400 par cellule (Baudat et al., 2013). Une partie seulement de ces CDB aboutira à la formation de CO entre chromosomes homologues.

1.1) La formation des CDB méiotiques

La formation des CDB méiotiques par SPO11 (SPOrulation 11) et ses orthologues semble être une caractéristique commune à l'initiation de la RH méiotique à la fois chez les champignons, les invertébrés, les plantes ou les mammifères (Keeney, 2007). SPO11 est une endonucléase orthologue de la sous unité catalytique A de la topoisomérase VI (topoisomérase de type II) chez les archaebactéries. Les TopoVI possède une sous-unité A qui clive l'ADN, et, une sous-unité B qui régule l'activité catalytique par hydrolyse d'ATP et contrôle ainsi l'ouverture de l'ADN pour le passage d'un autre brin d'ADN (relaxation topologique) (Bouuaert et Keeney, 2016).

Des études fonctionnelles et structurales chez la levure ont permis de comprendre le mécanisme d'action de SPO11 : elle catalyse la formation des CDB de façon similaire aux topoisomérases de type II. SPO11 se dimérise et clive l'ADN par réaction de transestérification, ce qui en résulte d'une liaison phosphodiester entre les sites tyrosines catalytiques de SPO11 avec les extrémités 5' de la CDB

(Lam et Keeney, 2015). SPO11 reste donc liée aux extrémités 5' de l'ADN après clivage. Chez la souris et l'Homme, SPO11 possède deux isoformes SPO11 α et SPO11 β . La majorité des CDB méiotiques sont induites par SPO11 β . De récents travaux chez la plante et la souris suggèrent que SPO11 et la protéine TOPVIBL (TopoVIB-like) agissent ensemble sous forme d'hétérotétramère ressemblant fortement aux formes ancestrales des topoisomérases (sous unité catalytique A et sous unité régulatrice B) (**Figure 12**) (Bouuaert et Keeney, 2016; Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016). TOPVIBL agirait donc comme la sous unité régulatrice de SPO11.

En plus de SPO11, d'autres protéines auxiliaires sont essentielles à la formation des CDB méiotiques. Chez la souris, MEI4 (MEiosis-specific 4), REC114 (RECombination 114) et IHO1 (Interactor of HORMAD1 protein 1, aussi nommée CCDC36) sont capables de catalyser la réparation des CDB au niveau des axes des chromosomes méiotiques (de Massy, 2013; Kumar et al., 2010, 2018). Leur invalidation chez la souris révèle une absence de formation des CDB, des défauts de synapsis des chromosomes homologues et une absence de protéines effectives pour la réparation des CDB : un phénotype similaire observé chez les souris déficientes pour SPO11 (Baudat et al., 2000; Kumar et al., 2010, 2018; Romanienko et Camerini-Otero, 2000; Stanzione et al., 2016). Ces trois protéines essentielles sont capables d'interagir ensemble (Kumar et al., 2018). De plus, HORMAD1 (localisée aux axes des chromosomes asynapsés) interagit avec IHO1 et permettrait ainsi le recrutement MEI4-REC114-IHO1 aux axes des chromosomes (Stanzione et al., 2016). Ce trimère pourrait y activer et/ou moduler l'activité catalytique de SPO11.

La kinase ATM est capable d'agir comme un régulateur limitant la formation des CDB (Lange et al., 2011). Après formation des CDB méiotiques, MRN reconnaît la cassure et y est recruté induisant le recrutement et l'activation d'ATM. ATM est connue pour signaler les CDB en phosphorylant l'histone H2A.X (γ H2A.X) et active la réparation des CDB (**Figure 12**) (Maréchal et Zou, 2013). Dans des spermatocytes *Atm*^{-/-}, la formation des CDB est dix fois supérieure à la normale (Lange et al., 2012). Tel1 (Telomere maintenance 1), l'homologue d'ATM chez la levure *S. cerevisiae*, est impliquée dans le phénomène d'interférence des CDB. Elle inhibe la formation d'autres cassures à une distance proximale d'une CDB formée et empêche la formation de cluster de CDB (Garcia et al., 2015). Ces données suggèrent qu'ATM

restreint localement l'activité de SPO11 par un rétrocontrôle négatif qui empêcherait la formation de nouvelles cassures (**Figure 12**). Cette régulation pourrait se faire via un réarrangement chromatinien autour de la CDB formée qui restreint l'accessibilité à SPO11 et/ou par la régulation de l'activité de SPO11 via ses protéines auxiliaires. Notamment, Tel1 est capable de phosphoryler Rec114 et la phosphorylation de Rec114 corrèle avec une diminution globale des CDB méiotiques (Carballo et al., 2013). Chez les mammifères, ATM pourrait ainsi réguler l'activité de SPO11 en agissant sur les protéines auxiliaires de formation des CDB (recrutement et/ou activité).

1.2) La localisation des CDB méiotiques

Les CDB méiotiques se localisent préférentiellement au niveau des points chauds de recombinaison c'est-à-dire au niveau des régions d'ADN clivées par SPO11. Ces régions sont majoritairement déplétées en nucléosome rendant l'accès à la chromatine favorisé aux protéines de formation et de réparation des CDB (Lam et Keeney, 2015). Chez la souris et l'Homme, les points chauds de recombinaison sont retrouvés à la fois sur des régions géniques et intergéniques; et, corrélient avec des sites chromatinien enrichis des marques post-traductionnelles H3K4me3 et H3K36me3 (marques de chromatine « ouverte ») (Grey et al., 2018).

La méthyltransférase PRDM9 (PR domain-containing protein 9) joue un rôle central dans la localisation spécifique des CDB méiotiques au sein du génome. Dans les mutants murins *Prdm9*^{-/-} ou les mutants non fonctionnels, les CDB se forment mais avec une localisation alternative. Les souris sont stériles et caractérisées par une absence de réparation des CDB (Diagouraga et al., 2018; Hayashi et al., 2005; Sun et al., 2015).

PRDM9 lie la chromatine grâce à son domaine en doigt de zinc et se localise aux centres des points chauds de recombinaison (Grey et al., 2018). L'activité catalytique de son domaine PR/SET induit l'enrichissement des marques H3K4me3 et H3K36me3 au niveau de ces points chauds (Diagouraga et al., 2018). Cet enrichissement se fait sur les boucles de chromatine au niveau de nucléosomes situés à proximité des sites de liaison de PRDM9. PRDM9 induirait un remodelage chromatinien dans le but de rendre accessible la chromatine à la machinerie de formation et de réparation des CDB.

De plus, PRDM9 est capable d'interagir avec des protéines présentes aux axes des chromosomes au niveau des sites de recombinaison : les éléments du CS (REC8, SYCP3, SYCP1) et avec CXXC1 (CXXC Finger Protein 1) et EWSR1 (Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1) (Imai et al., 2017; Parvanov et al., 2017). CXXC1 lie H3K4me3 et interagit avec PRDM9 et IHO1 (protéine auxiliaire de SPO11) alors que EWSR1 interagit avec la cohésine REC8 (Eberl et al., 2013; Imai et al., 2017). Ces interactions permettraient de relier les marques chromatiniennes déposées par PRDM9 aux boucles de chromatine avec la machinerie de formation des CDB située aux axes (SPO11 et ses protéines auxiliaires MEI4-REC114-IHO1) (**Figure 12**).

PRDM9 spécifie la localisation des CDB en fonction (1) des séquences spécifiques reconnues par son domaine de liaison à l'ADN, (2) de la position de ces séquences au sein du génome et (3) de l'environnement chromatinienn de ces séquences. L'accessibilité des séquences de liaison de PRDM9 peut dépendre de leur positionnement global en sein du génome (régions plus ou moins réprimées), du contenu en nucléosomes et de la présence de modifications post-traductionnelles. Cette variabilité de liaison de PRDM9 à ses séquences spécifiques au sein du génome induit un polymorphisme des sites de liaisons de PRDM9, et donc des sites de recombinaison, inter- et intra-espèces (détaillée dans (Grey et al., 2018)).

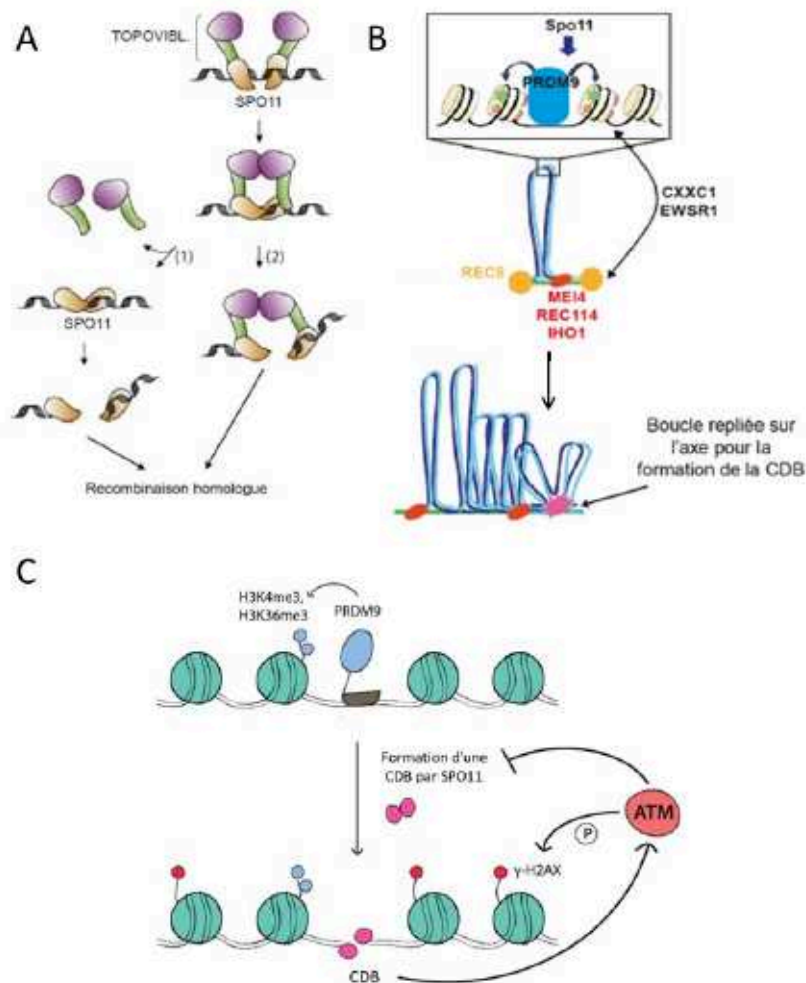


Figure 12 : La formation de la CDB en méiose

A) SPO11 et sa sous unité régulatrice TOP6BL (TOPOVIBL) catalyse la formation de la CDB méiotique. TOP6BL induit l'activation de SPO11 sans être nécessaire au clivage (1) ou bien reste complexée à SPO11 pour le clivage de l'ADN (2). (adapté de (Robert et al., 2016)) B) Modèle du couplage de la localisation des CDB méiotiques avec la machinerie de formation des CDB. PRDM9 dépose les marques chromatiniennes H3K4me3 et H3K36me3 (étoiles vertes) aux boucles de chromatine des chromosomes méiotiques aux points chauds de recombinaison. CXXC1 et EWSR1 interagissent avec ces marques chromatiniennes et les protéines de formation de la CDB (MEI4-REC114-IHO1) et les protéines structurales (REC8) situés aux axes des chromosomes méiotiques. Les marques déposées par PRDM9 aux boucles de chromatine sont ainsi reliées à la machinerie des CDB méiotiques aux axes. Après repliement de la boucle de chromatine sur l'axe, SPO11 se trouve à proximité de ses protéines auxiliaires et catalyse la formation de la CDB. (adapté de (Borde et de Massy, 2013)) C) La kinase ATM régule la formation des CDB méiotiques. SPO11 induit la formation des CDB au niveau de sites enrichis en H3K4me3 et H3K36me3 déposés par PRDM9. ATM est activée en réponse aux CDB. ATM inhibe la formation d'autres CDB par SPO11 et signale les cassures en phosphorylant l'histone H2A.X (γ H2A.X) à proximité de la CDB. (adapté de (Lukaszewicz et al., 2018))

2) La résection en méiose

Contrairement aux topoisomérases canoniques, SPO11 reste liée de façon covalente aux extrémités des CDB méiotiques qu'elle a induites et doit être enlevée pour permettre une prise en charge de la CDB pour la réparer (Baudat et al., 2013). Dans les cellules humaines, nous avons vu précédemment que le complexe nucléasique MRN et les nucléases EXO1/DNA2 avec l'aide de l'hélicase BLM sont impliqués dans la résection en RH mitotique (paragraphe 2.1) La résection)

A l'inverse de son homologue chez la levure (complexe MRX) (Borde, 2007), l'implication du complexe MRN chez les mammifères n'a pas été clairement établie en méiose. Chez la souris, un mutant hypomorphe (mutation sur un seul allèle) de MRE11 tronqué au niveau de son domaine de liaison à l'ADN montre la formation du même nombre de foyers DMC1 (recombinase méiotique spécifique) que chez les ovocytes sauvages, ce qui suggère que la résection a eu lieu correctement (Inagaki et al., 2016). Il se peut que (1) l'invalidation incomplète de MRE11 chez la souris ne permette pas d'observer son effet catalytique en méiose du fait de son caractère essentiel en cellules somatiques. Cette invalidation ne serait pas suffisante pour abolir l'activité de MRE11 en résection méiotique. Et, (2) d'autres nucléases peuvent substituer l'action catalytique de MRE11 (redondance d'actions entre nucléases). Pour autant, ces souris mutantes sont infertiles et présentent des défauts de de synapsis des chromosomes homologues et de réparation des CDB. MRE11 possède bien un rôle essentiel dans la progression méiotique.

Quant à EXO1, son invalidation chez la souris n'induit pas de phénotype drastique avant le stade pachytène des cellules méiotiques : les homologues sont correctement synapsés mais ne forment pas de CO (Wei et al., 2003). Ces résultats montrent davantage l'implication d'EXO1 dans la formation des CO méiotiques que dans la phase de résection des extrémités de la cassure.

De façon similaire, l'invalidation conditionnelle de BLM dans les cellules germinales ne modifie pas le nombre de foyers RAD51 (recombinase aussi impliquée en RH méiotique), montrant que l'absence de BLM n'affecte pas ou peu la résection (Holloway et al., 2010).

Une étude récente menée dans des spermatocytes murins a analysé les séquences des extrémités résectées par méthode END-Seq (détaillé dans (Paiano et

al., 2020)). Ces extrémités sont séquencées et comparées avec celles notamment des séquences d'ADN liées par SPO11 (séquençage SPO11-oligo). Leurs résultats indiquent que (1) le pattern de résection chez la souris est proche de la levure, (2) MRE11 lie les points chauds de recombinaison et que (3) EXO1 n'impacte que faiblement la longueur de la résection. Le mécanisme de résection via le complexe homologue MRN chez la levure serait conservé chez les mammifères et impliquerait bien l'activité de MRE11. Et, EXO1 n'est pas la seule nucléase impliquée : DNA2 pourrait aussi participer avec l'aide de BLM ou d'une autre hélicase (redondances fonctionnelles multiples possibles).

3) L'invasion

Au cours du cycle mitotique, RPA recouvre l'ADNsb des extrémités sortantes des CDB après résection. RPA est remplacé par RAD51 pour former le filament RAD51 recombinogène qui envahit une séquence homologue. En méiose et en particulier chez les mammifères, il n'est pas clairement établi que RPA soit recruté le premier. En effet chez la souris, le nombre de foyers RAD51 est supérieur à celui des foyers RPA en début de recombinaison au stade leptotène. RAD51 pourrait être chargée avant RPA en méiose (Moens et al., 2002; Plug et al., 1998).

La recombinaison méiotique nécessite la recombinase ubiquitaire RAD51, et, la recombinase méiotique spécifique DMC1 (Disrupted Meiotic cDNA 1). La présence de ces deux recombinases est une caractéristique conservée chez les levures, les plantes et les mammifères (Brown et Bishop, 2015). Pour autant, certains organismes tels que la mouche *Drosophila melanogaster*, le vers *Caenorhabditis elegans* et le champignon *Sordaria macrospora* utilisent pour seule recombinase RAD51. La présence de cette seconde recombinase DMC1, uniquement en méiose, amène à réfléchir sur les spécificités apportées par l'utilisation de cette seconde recombinase en RH au cours de la méiose.

Les deux recombinases possèdent des caractéristiques biochimiques très similaires. Chacune d'elles est capable de (1) de s'oligomériser sur de l'ADNsb (et ADNdb) pour former un filament nucléoprotéique et (2) de promouvoir la recherche d'homologie et l'invasion du filament nucléoprotéique formé (Brown et Bishop, 2015). Chez la levure *S. cerevisiae* et la plante *A. thaliana*, l'activité recombinase de Rad51 est dispensable à la recombinaison méiotique et agirait comme un facteur accessoire

de l'activité recombinogène assurée par Dmc1 du filament Rad51-Dmc1 (Cloud et al., 2012; Da Ines et al., 2013). Bien que recruté à l'ADNsb, l'activité recombinase de Rad51 semble y être réprimée. De plus, Dmc1 favorise l'invasion entre séquences nucléotidiques hétérologues, ce qui faciliterait l'invasion entre les brins polymorphes des chromosomes homologues lors de la recombinaison méiotique (Borgogno et al., 2016). Dmc1 jouerait un rôle prédominant de celui de Rad51 lors de l'invasion du filament recombinogène en méiose (Brown et Bishop, 2015). Pour autant, les fonctionnalités spécifiques des recombinases ne sont pas ou peu connues chez les mammifères.

Chez la souris, l'absence de DMC1 induit une infertilité associée à un arrêt de progression des cellules germinales en stade zygotène, et, un synapsis incomplet et aberrant des chromosomes homologues (Yoshida et al., 1998). L'invalidation de *Rad51* étant létale chez l'embryon, son rôle en gamétogénèse a été étudié grâce à des micro-injections de siRNA de RAD51 dans les testicules souris (Knockdown RAD51) (Dai et al., 2017). Dans les tubes séminifères affectés, l'ensemble des stades des cellules germinales (mitotiques et méiotiques) est fortement altéré et les spermatocytes progressent difficilement au-delà du stade zygotène, mettant ainsi en évidence le rôle de RAD51 en RH dans les cellules mitotiques et méiotiques. De façon intéressante, les rares spermatocytes en zygotène ne présentent pas de défauts de localisation de DMC1 aux chromosomes méiotiques. Ce phénotype peut être biaisé par la présence résiduelle de RAD51 suffisante à la localisation de DMC1. Néanmoins, il apparaît que chez les mammifères les deux recombinases pourraient bien avoir des rôles et/ou spécificités propres durant l'invasion en méiose (recrutement et/ou activité différente).

Comme en RH mitotique, BRCA2 semble aussi jouer un rôle dans le chargement des recombinases sur l'ADNsb en recombinaison méiotique. Du fait de la létalité de l'invalidation complète de BRCA2 chez la souris, son rôle dans la gamétogénèse n'a été révélé qu'après l'utilisation d'un transgène humain de BRCA2 pour permettre la survie de souris avec invalidation totale de BRCA2. Ce transgène ne s'exprime presque pas dans les gonades. Ces souris sont infertiles et les spermatocytes sont arrêtés à la transition zygotène/pachytène (Sharan et al., 2004). Dans ces mutants, la localisation de RAD51 et DMC1 est compromise alors que celle de RPA ne l'est pas. Ces résultats corréleraient avec l'implication majeure de BRCA2

nécessaire au chargement des deux recombinaisons durant l'étape d'invasion de la RH en stade zygotène. Les études biochimiques ont montré que BRCA2 favorisait la nucléation de RAD51 et DMC1 sur de l'ADNsb, et interagissait directement avec RAD51 et DMC1 (Jensen et al., 2010; Martinez et al., 2016). BRCA2 est capable de stimuler l'activité recombinaison de DMC1 (en plus de celle de RAD51) à partir d'ADNsb recouvert par RPA (Liu, J. et al., 2010; Martinez et al., 2016). Le modèle qui émerge est que BRCA2 serait le médiateur du chargement de RAD51 et DMC1 à l'ADNsb grâce à sa capacité de liaison à l'ADNsb et sa capacité de déplacer/enlever RPA recouvert sur de l'ADNsb.

Ces dernières années, d'autres régulateurs (ou médiateurs) ont été mis en évidence dans la formation et/ou l'activité du filament RAD51/DMC1.

Des protéines en interaction directe avec BRCA2 permettent le recrutement des recombinaisons aux sites de recombinaison. Notamment, le nouveau facteur méiotique spécifique MEILB2 (Meiotic Localizer of BRCA2) (ou HSF2BP, Heat Shock Factor 2 Binding Protein) est essentiel à la localisation de BRCA2 et des recombinaisons RAD51/DMC1 aux sites de recombinaison en zygotène dans des spermatocytes murins (Zhang, J. et al., 2019). Son invalidation chez la souris induit une stérilité associée à une absence de réparation des CDB méiotiques. MEILB2 interagit directement avec BRCA2 et indirectement avec RAD51 via BRCA2. L'étude de la dynamique des foyers RAD51, DMC1, BRCA2 taggué et MEILB2 a mis en évidence que (1) l'absence de MEILB2 abolit la localisation de BRCA2 et des recombinaisons et (2) la localisation de MEILB2 précède celle des recombinaisons. MEILB2 est ainsi proposé comme un facteur clé du recrutement des recombinaisons grâce à son interaction avec BRCA2.

Le complexe Shu formé par SWS1-SWSAP (SWIM domain-containing and Srs2-interacting protein 1 homolog) (SWS1-associated protein 1) est considéré comme un régulateur positif de BRCA2 favorisant le chargement des recombinaisons (Abreu et al., 2018). Chez la souris, la délétion de ce complexe induit une infertilité associée à un arrêt tardif des cellules en prophase I (pachytène) et une forte diminution du recrutement des recombinaisons RAD51 et DMC1. Cette diminution est accentuée chez des doubles mutants *Swsap1^{-/-}Brca2^{Δ27/Δ27}* où une forme tronquée de BRCA2 est exprimée et induit une perte partielle de l'interaction avec RAD51 et DMC1. Ces résultats suggèrent bien une action régulatrice du complexe Shu sur le

rôle cargo de BRCA2 pour le recrutement des recombinaisons et la formation du filament présynaptique.

Le complexe HOP2-MND1 semble favoriser l'activité du filament présynaptique. *In vitro*, les protéines méiotiques spécifiques HOP2 (Homologous-pairing protein 2 homolog) et MND1 (Meiotic nuclear division protein 1 homolog) interagissent avec RAD51 et DMC1 et stimulent l'activité recombinaison du filament RAD51 ou DMC1 (Petukhova et al., 2005). *In vivo*, les souris déficientes pour HOP2 montrent une accumulation des recombinaisons et de RPA, et, un arrêt de progression méiotique en stade pachytène : des indicateurs de défauts de réparation des CDB méiotiques aboutissant à l'infertilité des animaux (Petukhova et al., 2003). Ces résultats suggèrent que HOP2-MND1 n'est pas nécessaire au chargement des recombinaisons mais qu'il agirait sur l'activité du filament RAD51/DMC1. De plus, d'autres résultats *in vitro* suggèrent que (1) SYCP3 (élément du CS) entre en compétition avec HOP2-MND1 pour lier le filament RAD51 et inhiberait ainsi l'activité régulatrice de HOP2-MND1 sur ce filament et (2) SYCP3 ne modifie pas l'activité recombinaison du filament DMC1 (Kobayashi et al., 2017). SYCP3 inhiberait spécifiquement l'activité recombinaison de RAD51 pour favoriser celle de DMC1 au cours de l'invasion en méiose. L'absence de HOP2-MND1 aux sites de recombinaison en présence de SYCP3 ne permettrait plus une correcte modulation de l'activité du filament mixte RAD51/DMC1 en méiose. HOP2-MND1 participerait ainsi à la modulation de l'activité du filament en concertation avec d'autres facteurs régulateurs qui apporteraient des spécificités au filament.

Conservé de la plante *Arabidopsis* à l'Homme, le complexe FIGL1-FLIP (FIDGETIN-LIKE-1/FIDGETIN-LIKE-1 INTERACTING PROTEIN) possède un rôle antagoniste de BRCA2 et est impliqué en RH mitotique et méiotique. En effet, les mutants *figl1*, ou *flip* chez la plante, présentent des dérégulations de la dynamique des recombinaisons RAD51 et DMC1, et, une augmentation anormale de CO (Fernandes et al., 2018). Toujours chez la plante, la double déficience *figl1* et *brca2* restaure la formation des foyers RAD51/DMC1 dans les cellules méiotiques et les foyers RAD51 dans les cellules somatiques (Kumar et al., 2019). Ce complexe est aussi impliqué en RH dans des cellules humaines down-régulées pour FIGNL (Fidgetin-like protein 1), l'homologue humain de FIGL1 (Yuan et Chen, 2013). FIGL1/FLIP pourrait réguler directement l'activité recombinaison du filament RAD51/DMC1 par l'activité ATPase de FIGL1 (Yuan et Chen, 2013). En effet, FIGL1

fait partie de la famille des protéines AAA-ATPase capables de remodelages structurels protéiques mono- ou multi-mères (White et Lauring, 2007). Le complexe FIGL1/FLIP pourrait donc agir comme un régulateur négatif de l'activité recombinogène du filament RAD51/DMC1. Des expériences biochimiques plus poussées permettraient véritablement de déterminer à quelle(s) étape(s) de l'invasion et comment agit ce complexe (formation, recherche d'homologie ou activité recombinase du filament présynaptique).

Parmi les facteurs évoqués dans la formation du filament RAD51/DMC1 en méiose, certains sont essentiels alors que d'autres le régulent. L'implication de facteurs ubiquitaires avec des facteurs méiotiques spécifiques suggère que ces derniers apportent des caractéristiques biochimiques, structurelles et/ou d'interactants spécifiques modulant les intermédiaires de recombinaison nécessaires à envahir l'homologue plutôt que la chromatide sœur.

4) La synthèse d'ADN au sein de la D-Loop en méiose

Après invasion du brin homologue, la synthèse d'ADN s'initie au sein de la D-Loop en utilisant comme matrice modèle la chromatide du chromosome homologue (chromatide sœur en mitose). Cette séquence d'ADN provenant du chromosome homologue, et non de la chromatide sœur, peut présenter des mésappariements de base avec l'extrémité 3'OH qui a envahie et d'où s'initie la synthèse. Or, certaines polymérases sont incapables d'initier la synthèse en présence de mésappariements comme la polymérase β (Bebenek et Kunkel, 2004). Chez l'Homme et chez *S. cerevisiae*, la polymérase δ possède une activité exonucléase lui permettant d'initier une synthèse d'ADN en présence de mésappariements (Mcvey et al., 2017). Chez *S. cerevisiae*, cette dernière est impliquée en RH mitotique ainsi qu'en RH méiotique et en particulier dans la formation des CO méiotiques (Li et al., 2009; Maloisel et al., 2004). D'autres polymérases à activité nucléase pourraient être impliquées lors de la synthèse d'ADN en méiose. Chez les mammifères, parmi les 14 polymérases existantes, aucune n'a encore été décrite comme essentielle lors de la synthèse au sein de la D-Loop en méiose, potentiellement dû à des redondances fonctionnelles des nombreuses polymérases existantes (Mcvey et al., 2017).

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, MMR) (Fishel, 2015). Un mésappariement peut résulter d'un mauvais appariement entre deux bases ou bien d'insertion ou délétion de bases (appelé indels) induisant des boucles de mésappariement entre deux brins d'ADN. Le MMR reconnaît un mésappariement, dégrade la séquence contenant celui-ci et synthétise *de novo* cette séquence en absence d'erreurs. Plusieurs facteurs sont impliqués : les homologues MutS et MutL, l'exonucléase EXO1, la polymérase δ , PCNA et son cofacteur RFC (Replication Factor C), RPA et l'ADN ligase I. Chez les eucaryotes, les homologues MutS d'*E.coli* forment des complexes: MSH2-MSH3 (MutS β), MSH2-MSH6 (MutS α) et MSH4-MSH5 (MutS γ). Les homologues MutL forment aussi des hétérodimères: MLH1-PMS2 (MutL α), MLH1-PMS1 (MutL β) et MLH1-MLH3 (MutL γ). Seuls MutS α , MutS β et MutL α sont impliqués dans le MMR. L'implication de MutL β n'est pas clairement établie. MutS γ et MutL γ sont eux impliqués dans la promotion et la formation des CO méiotiques (paragraphe 6) La promotion des CO en méiose). Un modèle simple de réparation par le MMR est le suivant (**Figure 13**). MutS (α ou β) lie le mésappariement de façon ATP dépendante et recrute MutL α pour former un tétramère (**Figure 13**). PCNA est recruté avec son cofacteur RFC et entoure l'ADNdb pour le stabiliser. PCNA stimule l'activité endonucléase de MutL α qui clive l'ADN en amont (ou en aval) du mésappariement (**Figure 13**). Certaines données suggèrent qu'avant le clivage MutS α/β et MutL α diffusent le long de l'ADN à distance du mésappariement alors que d'autres suggèrent que seul MutL β diffuse. EXO1 est recruté au niveau de la cassure d'ADN et activé par MSH2 et/ou MLH1. EXO1 dégrade la séquence contenant le mésappariement de 5' vers 3' (**Figure 13**). RPA stabilise l'ADNsb formé et PCNA stimule la polymérase δ dans la synthèse de cette séquence manquante. Les extrémités sont ensuite reliées par l'ADN ligase I (**Figure**)(Fishel, 2015; Jiricny, 2006; Liu, D. et al., 2017).

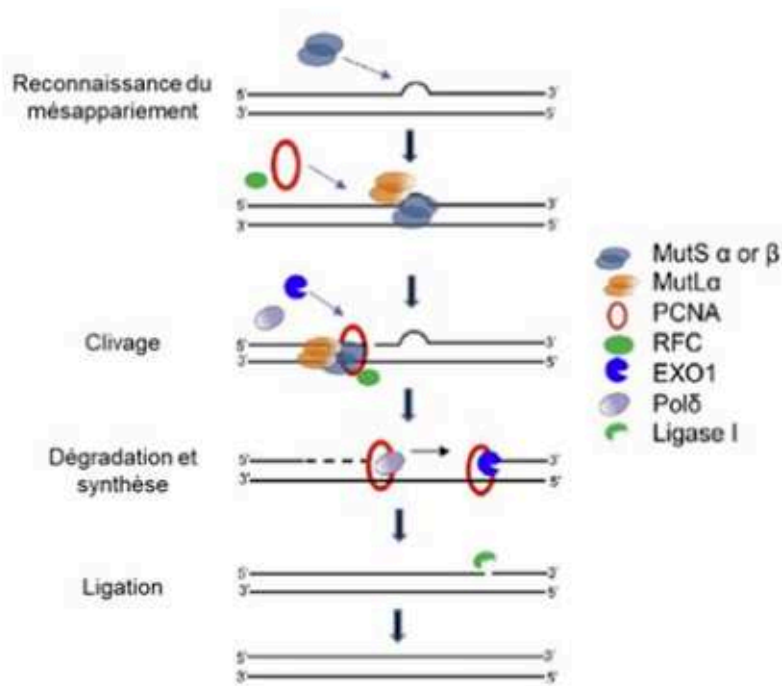


Figure 13 : Schéma de réparation d'un mésappariement de l'ADN

Après reconnaissance du mésappariement, les MutS α (ou β) et MutL α forme un complexe au mésappariement de l'ADN. PCNA-RFC stimule le clivage de l'ADN par MutL α à proximité du mésappariement. A partir de cette entaille, EXO1 dégrade la séquence contenant le mésappariement et la polymérase δ synthétise *de novo* la séquence en absence d'erreurs. Les extrémités d'ADN sont ensuite reliées par la ligase I pour rétablir la continuité du brin d'ADN. (adapté de (Liu, D. et al., 2017))

Comme en mitose, l'extension de la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop amène des contraintes topologiques de l'ADN et nécessite la stabilisation des brins au sein de celle-ci. Le complexe HROB-MCM8-MCM9 et l'hélicase HELQ nécessaires en RH mitotique l'est aussi en RH méiotique (paragraphe 2.3) L'extension de la D-Loop et la synthèse d'ADN). L'absence de HROB, MCM8, MCM9 ou HELQ chez la souris induit des phénotypes d'infertilité ou sous fertilité révélant une implication de chacun de ces facteurs au développement correct des gamètes (Adelman et al., 2014; Hustedt et al., 2019; Lutzmann et al., 2012).

5) La répression des CO en méiose

La régulation des intermédiaires méiotiques à chaque étape de son déroulement permet d'empêcher la formation des CO notamment en induisant (1) le démantèlement (ou réversion) de la D-Loop, (2) la dissolution de la dJH (3) ou sa résolution en NCO. Chez la souris, sur plus de 200 foyers RAD51/DMC1 comptabilisés, événements engagés dans les étapes précoces de la RH méiotique, seuls ~23 CO en résultent (moyenne/cellule méiotique) (Handel et Schimenti, 2010). La majorité des intermédiaires de recombinaison forme des produits de NCO. Cette régulation des intermédiaires de recombinaison est assurée par les hélicases et les topoisomérases de façon similaire à la RH mitotique.

Chez les eucaryotes, BLM-TOPIII α -RMI1/2 (BTR) est un complexe majeur de la promotion des événements de NCO en RH (Hunter, 2015). Il est impliqué dans le démantèlement des D-Loop et la dissolution des dJH en présence de RPA (paragraphes 2.4) Démantèlement de la D-Loop et 2.7) La dissolution et la résolution de la dJH (Fasching et al., 2015; Xue et al., 2013). Chez la levure en RH mitotique et méiotique, l'homologue de BLM (avec l'aide de TOPIII et RMI) semble bien responsable (1) du démantèlement de la D-Loop pour mener les intermédiaires vers la voie du SDSA, et, (2) contrôler les événements de NCO par dissolution de la dJH (De Muyt et al., 2012; Hatkevich et Sekelsky, 2017; Kaur et al., 2015; Tang et al., 2015). Chez les mammifères, l'inactivation conditionnelle de *Blm* chez la souris induit une augmentation de la fréquence des CO méiotiques (Holloway et al., 2010). Bien que ces résultats ne permettent pas d'établir clairement l'implication de BLM dans le démantèlement de la D-Loop et/ou la dissolution de la dJH en méiose, BLM apparaît comme un régulateur important des intermédiaires de recombinaison méiotique impliqué dans la voie du NCO.

D'autres hélicases pourraient intervenir pour prendre en charge les intermédiaires de recombinaison afin de promouvoir la voie du NCO. Elles pourraient avoir des rôles mineurs et redondants anti-CO en méiose par rapport au rôle central de BLM. Notamment, les hélicases de la même famille que BLM (famille des hélicases RECQ homologues) comme RECQ1/5 et WRN possèdent des capacités de démantèlement de D-Loop *in vitro* et sont impliquées en RH mitotique *in vivo*. FANCM (Fanconi anemia group M protein) est aussi capable de démanteler des D-

Loop naissantes et de dissoudre des JH *in vitro* (Gari et al., 2008). Chez les plantes et la levure, l'homologue de FANCM est impliqué dans la répression de la formation des CO méiotiques et favorise la réparation par le SDSA (NCO) (Crismani et al., 2012; Girard et al., 2015; Lorenz et al., 2012). Les souris déficientes pour FANCM présentent une hypofertilité associée à un hypogonadisme davantage lié à une perte des cellules germinales mitotiques (Bakker et al., 2009). Pour autant, FANCM est bien exprimé dans les cellules germinales méiotiques et se localise fortement aux noyaux des cellules en pachytène (Fouquet et al., 2017). Et, une mutation ponctuelle de FANCM a été décrite dans un cas familial d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) (Fouquet et al., 2017). Ces données suggèrent que FANCM est impliquée en recombinaison méiotique chez les mammifères. Une invalidation ciblée de FANCM dans les cellules germinales méiotiques permettrait de déterminer spécifiquement son implication dans la régulation de la formation des CO en méiose.

6) La promotion des CO en méiose

Après l'initiation et l'élongation de la synthèse au sein de la D-Loop, des facteurs appelés ZMM stabilisent les intermédiaires de recombinaison post-synaptiques afin de promouvoir la formation des CO. Le complexe ZMM est un acronyme pour les protéines levures qui le composent Zip 1/2/3/4 (molecular ZIPper 1, 2 3 et 4), Msh4/5 (MutS Homolog 4 et 5), Mer3 (MEiotic Recombination 3) et Spo16 (SPOrulation 16) (Lynn et al., 2007; Pyatnitskaya et al., 2019). Relativement bien conservé de la levure à l'Homme, le complexe ZMM chez les mammifères se compose de : 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). Les orthologues de zip2 et spo16 sont SHOC1 (Shortage in chiasmata 1) et SPO16, respectivement (Guiraldelli et al., 2018; Zhang, Q. et al., 2018, 2019).

L'ensemble des éléments ZMM possède une caractéristique commune : elles sont nécessaires à l'assemblage des éléments du CS et au synapsis des chromosomes conjointement à l'initiation de la recombinaison méiotique. La fonction proposée des ZMM est de protéger les intermédiaires de recombinaison de l'action des hélicases notamment lors du démantèlement des D-Loop. Les ZMM stabiliseraient ainsi les intermédiaires de recombinaison afin de promouvoir la

formation de la dJH et la formation des CO. Elles peuvent se sub-diviser selon leurs caractéristiques fonctionnelles : (1) les protéines associées au métabolisme de l'ADN (Mer3/HFM1, MSH4/5, Zip2/SHOC1, SPO16), (2) les protéines de modifications post-traductionnelles d'ubiquitinylation et/ou sumoylation régulant les interactions protéiques (HEI10, RNF212, TEX11) et (3) des protéines structurelles (SYCP1) (Lynn et al., 2007).

Le passage de la structure triplexe d'ADN de la D-Loop à la structure quadruplexe de la dJH suppose que les différents intermédiaires de recombinaison de la D-Loop à la dJH soient stabilisés, notamment, lors de l'extension de la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop et de la seconde-end-capture.

Parmi les ZMM, l'hélicase Mer3 chez la levure a été décrite *in vivo* comme un facteur pro-CO (Mazina et al., 2004). *In vitro*, elle est à la fois (1) capable de dissoudre les D-Loop et les jonctions de Holliday (Duroc et al., 2017) et (2) de stimuler l'activité recombinase du filament RAD51 et l'extension de la D-Loop (Mazina et al., 2004). Cette dernière fonctionnalité *in vitro* pourrait stabiliser les intermédiaires naissants de la D-Loop pour permettre la second-end capture et favoriser la formation de la dJH en méiose. Un autre rôle de Mer3, indépendant de son activité hélicase, a aussi été décrit : l'interaction de Mer3 avec Mlh1-Mlh2 (MutL β , MLH1/PMS1 chez les mammifères) limite l'extension de la D-Loop par synthèse d'ADN en méiose. Il se peut que la liaison de Mer3 aux différents intermédiaires de recombinaison soit suffisante à les stabiliser et promouvoir leur prise en charge par d'autres ZMM plus tardifs. Le modèle proposé est que (1) Mer3 lie la D-Loop pour favoriser l'extension de celle-ci par synthèse d'ADN, puis (2) avec MutL β inhibe la synthèse excessive au sein de la D-Loop et enfin (3) interagit avec d'autres ZMM pour favoriser la formation de la dJH (**Figure 14**) (Duroc et al., 2017). Chez la souris, l'absence de HFM1 (Helicase For Meiosis 1), l'homologue de Mer3, induit un phénotype similaire à celui décrit chez la levure: une diminution drastique (mais pas totale) du nombre de CO et un synapsis incomplet des chromosomes homologues (Guiraldelli et al., 2013). Le rôle de Mer3/HFM1 pourrait ainsi être conservé chez les mammifères.

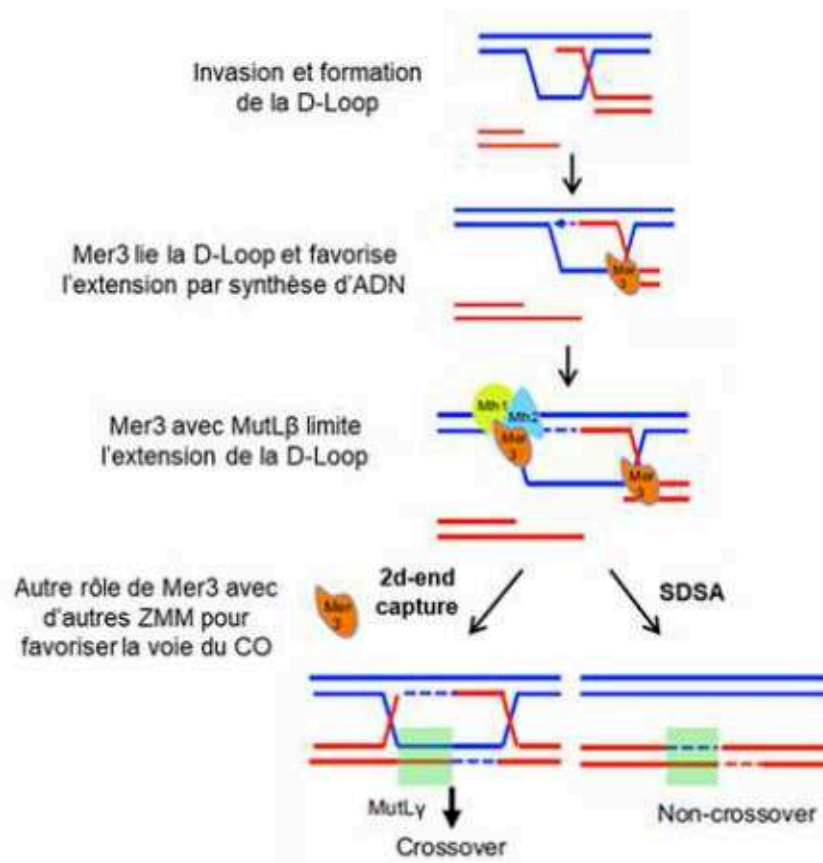


Figure 14 : Modèle de régulation des intermédiaires de recombinaison méiotique par Mer3

Après invasion du brin d'ADN lésé, Mer3 (en orange) lie et stabilise la D-loop naissante et la synthèse d'ADN s'initie. En interaction avec MutL β , Mer3 bloque l'extension de la D-Loop par synthèse d'ADN. Mer3 agirait aussi sur des intermédiaires plus tardifs de recombinaison avec d'autres ZMM pour favoriser la formation d'un cross-over (CO). Si les intermédiaires ne progressent pas jusqu'à la second-end capture, ils sont pris en charge par le SDSA pour réparer les CDB. Les rectangles verts indiquent des zones de conversion génique entre les brins homologues. (adapté de (Duroc et al., 2017))

Le dimère MSH4-MSH5 (MutSy) assurerait aussi la stabilisation des intermédiaires de recombinaison favorisant la formation et stabilisation de la dJH (Cohen et Holloway, 2015; Pyatnitskaya et al., 2019). MSH4 et MSH5 possèdent des homologies de structure avec les protéines MutS des bactéries du MMR sans posséder le domaine de liaison aux mésappariements de bases et sans rôle dans le MMR (Manhart et Alani, 2016). Elles sont conservées chez les champignons, les plantes, les mammifères ainsi que chez *C.elegans*. Bien que présentant des différences phénotypiques, les mutants déficients pour l'une ou l'autre de ces protéines des différentes espèces sont hypofertiles voire infertiles et possèdent un

nombre de CO altérés, ce qui supporte un rôle conservé dans la formation des CO (Pyatnitskaya et al., 2019). Deux rôles du complexe MSH4-MSH5 sont proposés à ce jour en recombinaison méiotique : (1) un rôle précoce stabilisateur des intermédiaires de recombinaison favorisant la formation/stabilisation de la dJH (rôle « ZMM ») et (2) un rôle régulateur du complexe endonucléase MLH1-MLH3 nécessaire à la résolution de la dJH en méiose (Pyatnitskaya et al., 2019).

(1) Tout d'abord, chez les souris stériles *Msh4*^{-/-} ou *Msh5*^{-/-}, les cellules germinales arrêtent leur progression en méiose dès le stade zygotène et présentent un synapsis incomplet et aberrant des chromosomes homologues. De plus, les protéines humaines MSH4-MSH5 lient spécifiquement les D-Loop et les JH *in vitro* (Cannavo et al., 2020; Snowden et al., 2004). MSH4/5 entoure les jonctions d'ADNdb (Liu, D. et al., 2017) présentes aux D-Loop et aux dJH (Snowden et al., 2004). Et, elles interagissent et colocalisent en partie avec les recombinaisons RAD51/DMC1 ainsi qu'avec le complexe MLH1-MLH3 (MutLy) (Neyton et al., 2004; Santucci-Darmanin et al., 2002). Des travaux réalisés chez la levure indiquent que MSH4/5 antagonise l'action anti-CO de l'hélicase Sgs1/BLM (Jessop et al., 2006). Ces résultats corrélerent avec un rôle stabilisateur du complexe MutSy des intermédiaires précoces lors de l'invasion pour faciliter leur maturation/stabilisation en dJH, et notamment en les protégeant contre le démantèlement de la D-Loop et/ou la dissolution de la dJH par l'action des hélicases.

(2) En plus de cette fonction « ZMM » stabilisatrice des intermédiaires de recombinaison, MSH4-MSH5 semble avoir un rôle plus tardif stimulateur de l'activité de résolution de la dJH par MutLy. Chez la souris, les foyers MSH4/5 s'associent aux sites de recombinaison en zygotène (~100-150 foyers MSH4/5 pour les 250-300 CDB) et les foyers rémanents colocalisent avec des foyers MLH1-MLH3 en pachytène (Gray et Cohen, 2016; Santucci - Darmanin et al., 2000). Or, l'interaction entre MSH4-MSH5 et MLH1-MLH3 dans les testicules murins (Santucci - Darmanin et al., 2000) renforcent l'idée que MSH4/5 a une action au niveau de la dJH avec le complexe MLH1-MLH3. Des études récentes, chez la levure *in vivo* et *in vitro* avec les protéines recombinantes humaines correspondantes, ont confirmé une interaction transitoire de MutSy avec les MutLy et que l'activité résolvasse de MLH1-MLH3 des JH est stimulée en présence des MutSy (Cannavo et al., 2020; Sanchez et al., 2020). L'ensemble de ces données suggèrent bien que chez les mammifères MSH4-MSH5

agit comme des stabilisateurs des intermédiaires dont une partie seulement aboutit à la formation des CO et qu'il participerait à la désignation des CO en stimulant le complexe MLH1-MLH3 sur les dJH stabilisées.

Chez la souris, les ZMM RNF212 et HEI10 semblent impliquées dans la régulation de MLH1-MLH3 par MSH4-MSH5 aux intermédiaires. Elles possèdent des rôles antagonistes dans le maintien des MutSy et sont essentielles à la formation des CO (Qiao et al., 2014; Reynolds et al., 2013; Ward et al., 2007). Chez les mutants *Rnf212^{-/-}* et *Hei10^{-/-}*, le synapsis des chromosomes s'établit correctement alors que les sites de recombinaison spécifiques des CO par MLH1-MLH3 ne parviennent pas à se former induisant la stérilité des animaux. Les mutants *Rnf212^{-/-}* présentent (1) une diminution drastique des foyers MSH4 durant la progression méiotique et une absence complète en pachytène ; et, (2) très peu de foyers HEI10. Quant aux mutants *Hei10^{-/-}*, ils présentent à l'inverse (1) une persistance des foyers MSH4 en pachytène et (2) une augmentation de la colocalisation entre MSH4 et RNF212 à tous les stades. Ces résultats suggèrent bien que RNF212 a une action antagoniste de celle de HEI10 sur la présence de MSH4 aux intermédiaires de recombinaison nécessaires à la formation des CO méiotiques. De plus, RNF212 et HEI10 sont deux homologues des E3 ligases capables de catalyser des modifications post-traductionnelles grâce à leur activité de sumoylation et d'ubiquitinylation, respectivement. Qiao et al., proposent que la balance entre ces deux activités régulerait l'association/dissociation de MutSy aux intermédiaires permettant leur progression jusqu'à la formation de CO (Qiao et al., 2014). HEI10 limiterait l'association de RNF212 aux intermédiaires précoces de recombinaison liés par MutSy, ce qui permettrait la distinction entre les futurs sites de CO et de NCO (Figure 15). RNF212 stabiliserait les intermédiaires précoces de recombinaison en stabilisant MutSy jusqu'à la formation/stabilisation de la dJH. Puis, HEI10 permettrait la dissociation de RNF212 et MutSy à ces intermédiaires pour qu'ils progressent jusqu'à la formation des CO (Figure 15). Bien que les cibles de RNF212 et HEI10 ne soient pas identifiées, la balance des modifications post-traductionnelles de MutSy par RNF212 et HEI10 pourrait ainsi permettre la régulation des intermédiaires liés par MutSy et la progression d'une partie seulement pour former des CO.

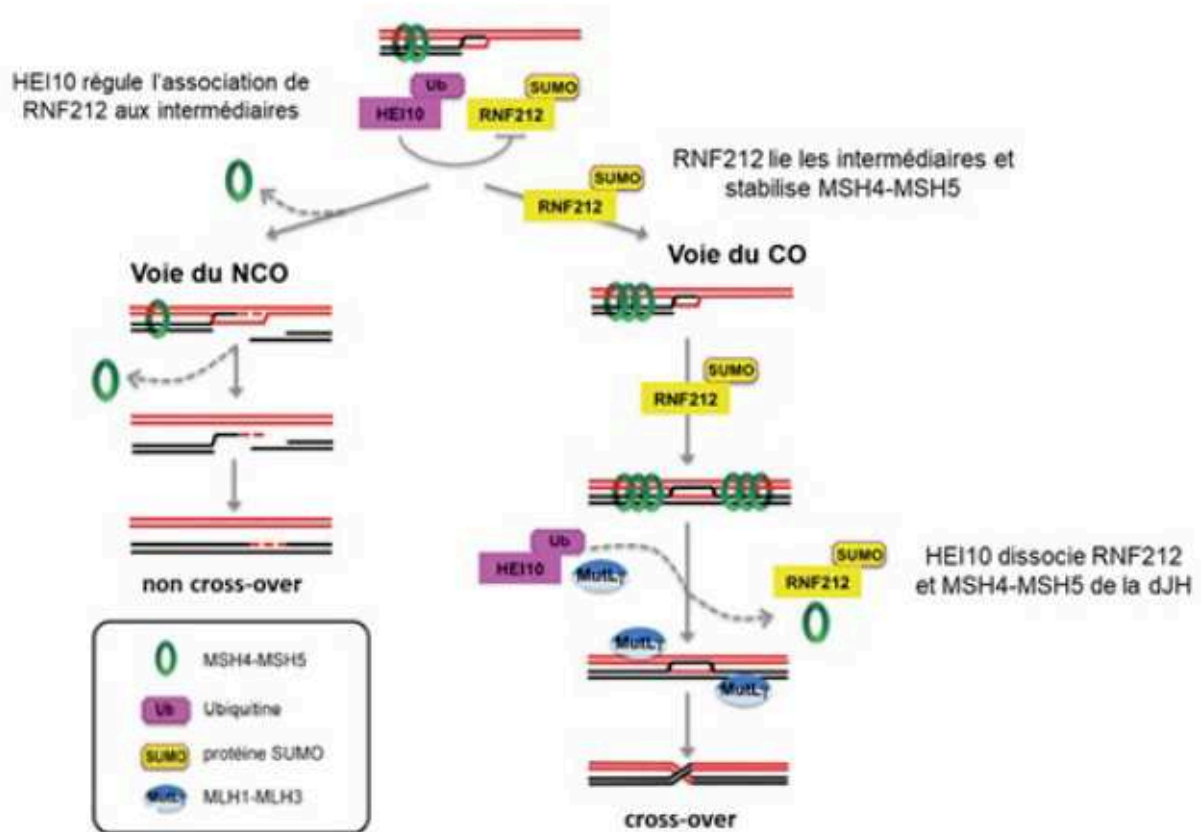


Figure 15 : Modèle de régulation des intermédiaires de recombinaison par HEI10 et RNF212

MSH4-MSH5 (MutS γ) se lie aux intermédiaires post-synaptiques pour les stabiliser. HEI10 régule l'association de RNF212 aux intermédiaires liés par MutS γ . Lorsque RNF212 est liée aux intermédiaires de recombinaison, elle les stabilise en maintenant liés les MutS γ jusqu'à la formation de la dJH. HEI10 dissocie RNF212 et MutS γ de la dJH pour permettre sa résolution par le complexe MLH1-MLH3 (MutL γ) pour former un cross-over (CO) (voie du CO). Lorsque RNF212 ne lie pas les intermédiaires précoces de recombinaison, MutS γ se dissocient des intermédiaires. Ces intermédiaires sont déstabilisés sans aboutir à la formation de CO (voie du NCO). (adapté de (Qiao et al., 2014))

7) La dissolution ou la résolution de la dJH en méiose

Grâce à la stabilisation des intermédiaires de recombinaison par les ZMM, les intermédiaires progressent jusqu'à la formation de la dJH qui pourra être résolue par activité nucléasique ou dissoute par l'action d'hélicases (paragraphe 2.7) La dissolution et la résolution de la dJH). La dissolution de la dJH en méiose fait aussi intervenir l'hélicase BLM avec ses partenaires TOPIII α -RMI1/2 et RPA (paragraphe 2.7) La dissolution et la résolution de la dJH). La résolution de la dJH en méiose se fait majoritairement par le complexe MLH1-MLH3 pour former uniquement des CO, dits de classe I (90-95% des CO méiotiques chez la souris). La résolution de la dJH peut aussi se faire par l'action de MUS81-EME1, SLX1-SLX4 et GEN1 et aboutir à la formation ou non de CO (CO et NCO). Ces CO sont dits de classe II. Ils ne constituent qu'une faible minorité des CO méiotiques (moins de 10% chez la souris) et résulte d'endonucléases activées par la reconnaissance de structures spécifiques de l'ADN. Un produit de CO ou de NCO est formé en fonction du clivage asymétrique ou symétrique de la dJH, respectivement (Hunter, 2015).

Chez de nombreux organismes, le dimère MLH1-MLH3 est indispensable à la résolution des dJH pour former des CO en recombinaison méiotique. Chez la souris, MLH1 et MLH3 se localisent en foyers discrets en pachytène et leur nombre correspond à celui des chiasmas formés (observations cytologiques des CO) (Baker et al., 1996; Edelman et al., 1996; Lipkin et al., 2002). MLH1 et MLH3 colocalisent dans des spermatocytes et ovocytes murins et les formes recombinantes humaines (ou souris) interagissent *in vitro*, ce qui suggère fortement que MLH1-MLH3 forme un complexe stable en méiose (Jaafar et Flores-Rozas, 2009; Toledo et al., 2019). Leur déficience induit des phénotypes similaires de stérilité caractérisés par un arrêt de progression des cellules germinales à la transition fin de prophase I/métaphase I et une perte quasi-totale des chiasmas. Chez la levure et la souris, l'activité endonucléase de MLH3 est essentielle dans la résolution des CO (Nishant et al., 2008; Toledo et al., 2019). Pour autant, comment ce dimère clive la dJH reste particulièrement mal compris *in vivo*. Des données récentes *in vitro* indiquent que le complexe MutL γ lie préférentiellement les structures branchées de l'ADN dont les jonctions de Holliday et est capable de cliver ces structures branchées de l'ADN, suggérant que MLH1-MLH3 est potentiellement capable de résoudre la dJH via son activité nucléase en méiose (Cannavo et al., 2020). La résolution de la dJH en CO

suppose un clivage asymétrique des deux jonctions de Holliday. Chez la levure, il est proposé que MutLy forme des polymères et induit des cassures simples brins en *trans* au niveau d'ADNdb à proximité des jonctions de Holliday qui permettraient la résolution de la dJH en CO (**Figure 16**) (Manhart et al., 2017). L'orientation et la localisation spécifique de polymères MutLy à la dJH pourrait permettre le clivage asymétrique induisant la formation de CO (**Figure 16**).

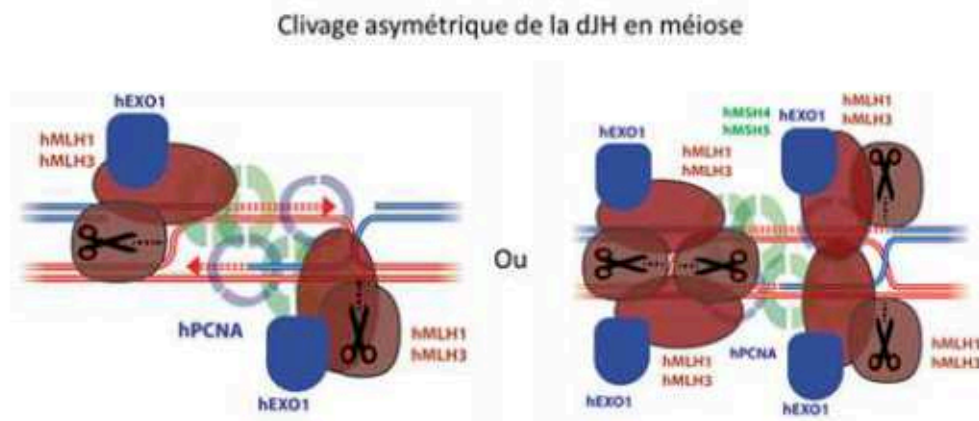


Figure 16 : Modèle de la résolution de la dJH en méiose

La présence asymétrique des co-facteurs tels que MSH4-MSH5 et PCNA à la dJH stimule le clivage de structures d'ADN précurseurs de la dJH (à gauche) ou de dJH matures par MLH1-MLH3 avec l'aide d'EXO1. L'orientation spécifique en *trans* de MLH1-MLH3-EXO1 permettrait de cliver la dJH de façon asymétrique pour former des CO. (adapté de (Cannavo et al., 2020))

Par ailleurs, MutLy agirait en concertation avec une autre nucléase essentielle à la formation des CO en méiose, EXO1 (**Figure 16**) (Wei et al., 2003; Zakharyevich et al., 2010). Chez la levure, l'activité nucléase d'EXO1 ne participe pas à la formation des CO alors que son interaction avec MLH1 est nécessaire (Zakharyevich et al., 2010). L'utilisation de protéines recombinantes humaines *in vitro* a montré que EXO1 interagit de façon constitutive avec le dimère MLH1-MLH3 et sa présence stimule spécifiquement l'activité nucléasique du complexe (Cannavo et al., 2020; Sanchez et al., 2020). L'ensemble de ces données suggèrent qu'EXO1 stimule l'activité nucléase de MutLy pour permettre la résolution des dJHs *in vivo*. Une question persiste : comment EXO1 induit cette stimulation de l'activation du complexe ? Elle pourrait moduler l'activité du complexe via (1) son interaction directe qui induit un changement de conformation, (2) recruter des facteurs induisant des modifications post-traductionnelles stimulant l'activité du complexe ou (3) les deux (Sanchez et al., 2020).

En plus de MutLy et d'EXO1, d'autres facteurs sont capables de stimuler l'activité des MutLy. Notamment, PCNA-RFC interagit directement avec MutLy et stimule son activité (Figure 16). De façon intéressante, l'activité maximale de MutLy est obtenue en présence de l'ensemble de ces facteurs (Cannavo et al., 2020). Son activation semble ainsi nécessiter plusieurs facteurs permettant un clivage efficace de la dJH. Ce clivage de la dJH par MutLy serait donc lié davantage à sa régulation qu'à la reconnaissance spécifique de la structure de la dJH par MutLy pour induire le clivage. Ces multiples facteurs pourraient réguler à la fois la localisation précise et l'activité du complexe au niveau de la dJH pour cliver l'ADN uniquement aux sites induisant la formation de CO (**Figure 16**).

Le fait que les mutants nuls *Mlh1^{-/-}*, *Mlh3^{-/-}* et *Exo1^{-/-}* possèdent des CO rémanents implique qu'une minorité des CO produits en méiose sont pris en charge par d'autres acteurs (Edelmann et al., 1996; Lipkin et al., 2002; Toledo et al., 2019; Wei et al., 2003). De la levure aux mammifères, les endonucléases MUS81-EME1, SLX1-SLX4 et GEN1 sont impliquées dans la résolution des dJH en méiose (Castor et al., 2013; Hunter, 2015; Manhart et Alani, 2016; Zakharyevich et al., 2012). Leur mode d'action suppose qu'elles reconnaissent et clivent les dJH et/ou ses structures intermédiaires aboutissant à la formation ou non de CO suivant le site de clivage sur les structures d'ADN (paragraphe 2.7) La dissolution et la résolution de la dJH). Les souris déficientes pour MUS81 ou SLX4 présentent un nombre de foyers MLH1/3 supérieur aux souris sauvages sans augmentation du nombre de chiasmas (Holloway et al., 2008, 2011). Ces résultats *in vivo* montrent bien l'existence de CO indépendants de MutLy. De plus, la persistance de BLM sur les chromosomes méiotiques en absence de MUS81 suggère que BLM avec l'aide de TOPIII α -RMI1/2 induirait la dissolution des dJH qui ne peuvent plus être pris en charge par MUS81 et éviterait ainsi la formation de chiasmas surnuméraires.

III) Un exemple de coopération de facteurs ubiquitaires et méiotiques spécifiques durant la recombinaison méiotique : les protéines de liaisons à l'ADNsb RPA, MEIOB et SPATA22.

L'information génétique est contenue au sein de la double hélice d'ADN. L'utilisation de cette information nécessite un passage à l'état de simple brin comme en réplication ou lors de la transcription. L'ADNsb est donc particulièrement abondant dans les cellules. Etant moins stable que la forme double brin, l'ADNsb est protégé par les protéines de liaisons à l'ADNsb, appelées protéines SSB (Single Strand Binding), de la dégradation par les agents/facteurs nucléolytiques et de la formation spontanée de structures secondaires (Liu et Huang, 2016). Les SSB sont conservées chez les bactéries, les archées et les eucaryotes. Bien que leurs séquences et leurs sous-unités puissent varier selon les espèces, elles sont toutes caractérisées par leur forte affinité à l'ADNsb.

A) Le complexe ubiquitaire essentiel de liaison à l'ADNsb : le complexe RPA

Dès 1988, le complexe RPA a été décrit pour la première fois dans des cellules humaines cancéreuses HeLa dans une étude sur la réplication de l'ADN utilisant le virus simien 40 (SV40) comme modèle (Fanning et al., 2006). Depuis, RPA a été étudié intensivement et est considéré chez les eucaryotes comme un facteur crucial de liaison à l'ADNsb impliqué dans le métabolisme de l'ADN, notamment en réplication, recombinaison et réparation de l'ADN. De nombreux homologues ont été identifiés parmi les eucaryotes, en particulier pour RPA1, sur la base d'homologie des séquences et structures protéiques.

1) Structure et modalités d'interaction des sous-unités de RPA

Le complexe RPA est un hétérotrimère composé de trois sous-unités RPA1, RPA2 et RPA3. Bien que la structure complète de RPA n'a jamais pu être élucidé, des analyses biochimiques et structurales des domaines de RPA ont permis de comprendre et mieux caractériser ce complexe. Les éléments structuraux et fonctionnels du complexe RPA sont ses domaines de liaison oligosaccharide/nucléotide (Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding, OB) au nombre

de 6 au total. Le domaine OB contient un repliement OB, ou OB-fold, qui est un repliement protéique de 5 à 6 feuillets β qui se structure en tonneau β (**Figure 17**); et, est une caractéristique structurale commune à toutes les protéines de liaison à l'ADNsb (Bochkarev et Bochkareva, 2004; Oakley et Patrick, 2010). Au sein d'un domaine OB, les repliements OB sont souvent accompagnés de structures annexes comme des hélices α . Initialement décrit comme un domaine de liaison à l'ADNsb, le domaine OB est aussi impliqué dans des interactions protéiques.

La grande sous-unité RPA1 possède 4 domaines OB : DBD-A (DNA binding domain A), DBD-B, DBD-C et DBD-F. La moyenne sous unité RPA2 et la petite sous-unité RPA3 contiennent DBD-D et DBD-F, respectivement (**Figure 17**) (Bochkareva et al., 2002). Les domaines DBD-A et DBD-B de RPA1 confèrent en grande majorité la capacité de liaison à l'ADNsb du complexe RPA alors que les domaines DBD-C et DBD-D de RPA1 et RPA2, respectivement, y participent en moindre mesure. Le domaine DBD-C de RPA1, et les domaines de RPA2 et RPA3, DBD-D et DBD-E respectivement, constituent le cœur de trimérisation de RPA par l'interaction d'hélices contenues dans chaque domaine ci-dessus (**Figure 17**) (Bochkareva et al., 2002; Krasikova et al., 2016). Situé en région C-terminale, le domaine DBD-C de RPA1 contient un motif zinc impliqué dans la modulation de la liaison du complexe RPA (Krasikova et al., 2016). Quant à son domaine DBD-F situé en région N-terminale, il est lui impliqué dans de nombreuses interactions protéiques modulatrices du métabolisme de RPA. La région en hélice-tour-hélice situé en région C-terminale de RPA2 (2C) est elle aussi impliquée dans des interactions protéiques et sa partie non-structurée en N-terminale contient de nombreux sites de phosphorylation. L'ensemble de RPA3 est structuré selon son domaine unique DBD-E et ne possède pas d'autres fonctions connues que celle l'impliquant dans la trimérisation du complexe RPA (Bochkareva et al., 2002).

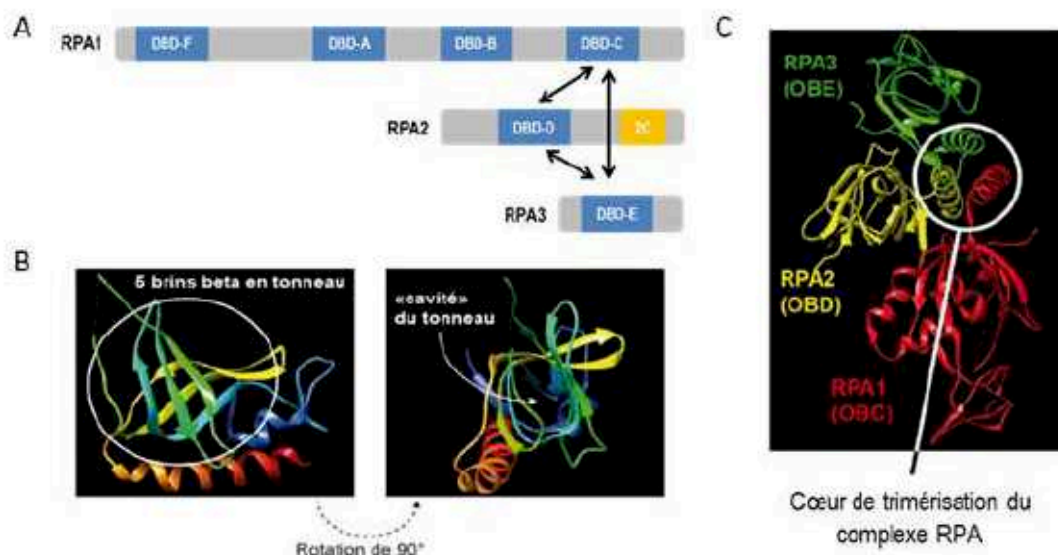


Figure 17 : La structure du complexe RPA

A) Schéma des sous-unités du complexe RPA. Les domaines OB de RPA sont représentés en bleu et la partie C-terminale de RPA2 en jaune. Les domaines DBD-C, -D, -E interagissent ensemble pour former le trimère RPA. Les interactions sont signalées par les flèches noires. B) Domaine OB de RPA2. L'OB-fold contenu dans le domaine OB est entouré en blanc (image de gauche). La rotation à 90° permet d'observer la structure en tonneau de l'OB-fold (image de droite). (C) Domaines de RPA1, RPA2 et RPA3 responsable de la trimérisation de RPA. Trois hélices provenant de chacune des sous-unités interagissent ensemble pour former le complexe RPA. Les modélisations sont issues de la thèse du Dr. Ribeiro et établies avec le logiciel USCf Chimera, référence Protein Data Bank 1L10 (d'après (Bochkareva et al., 2002)).

2) RPA et sa capacité de liaison à l'ADNsb

RPA possède une affinité de liaison à l'ADNsb (de 10^{-9} à 10^{-10} M) jusqu'à 1000 fois supérieure à celle de l'ADNdb. Sa liaison à l'ADNsb se fait en plusieurs étapes selon une polarité de 5' vers 3' du simple brin. Selon des données biochimiques, de cristallographiques et de microscopies électroniques, la liaison s'établit selon plusieurs modalités d'interaction qui dépendent de la longueur des nucléotides liés et des sous-unités impliquées : (1) 8-10 nucléotides (nt), (2) 12-23 nt, (3) 23-27 nt et (4) 30 nt (**Figure 18**) (Iftode et al., 1999; Oakley et Patrick, 2010). Les domaines DBD-A et DBD-B de RPA1 contactent en premier entre 8 à 10 nt et avec la plus grande affinité l'ADNsb. Puis, les domaines DBD-C de RPA1 et DBD-D de RPA2 permettent d'étendre la liaison à l'ADNsb de 12 à 23 nt et 23 à 27 nt, respectivement et de façon séquentielle. Enfin, grâce à la flexibilité des linkers reliant chaque domaine OB, les 4 domaines OB étendent leur interaction avec l'ADNsb jusque 30nt, ce qui confère au

complexe RPA une stabilité de liaison renforcée à l'ADNsb (**Figure 18**). Ce mécanisme de liaison à l'ADNsb est désigné comme un mécanisme « Hand-off » de par la dynamique séquentielle de liaison des différents domaines OB du complexe RPA. Ces différents modes d'interaction de RPA avec l'ADNsb pourraient conférer des propriétés et des fonctionnalités aux filaments nucléoprotéiques recouverts par RPA dans ses différents rôles *in vivo* (décrits par la suite au paragraphe 3) Les rôles essentiels de RPA dans le métabolisme de l'ADN). Cette cinétique de liaison à l'ADNsb pourrait avoir (1) une nécessité fonctionnelle selon le processus cellulaire impliqué (réplication ou réparation de l'ADN) ou bien (2) pourrait participer à de multiples conformations du complexe nécessaires à la prise en charge de l'ADNsb et dans la régulation des partenaires d'interaction de RPA.

Deux études suggèrent que cette modalité de liaison à l'ADNsb des différents domaines OB de RPA apporte une dynamique de liaison nécessaire notamment à l'échange de RPA avec d'autres protéines de liaison à l'ADNsb. Les deux études ont suivi la dynamique de l'interaction RPA-ADNsb à l'échelle de la molécule unique *in vitro*. La première montre que les protéines recombinantes humaines de RPA sont capables de diffuser le long de l'ADNsb jusqu'à dissoudre des structures secondaires (épingles à cheveux) de l'ADNsb (Nguyen et al., 2014). La seconde montre que le complexe recombinant de levure de RPA suit des cycles d'association-dissociation rapides favorisant l'enlèvement de RPA au profit d'autres protéines de liaisons à l'ADNsb présentes en solution, comme la recombinaise RAD51 levure ou la protéine SSB d'*E.coli* (Gibb et al., 2014). Leurs résultats suggèrent un modèle de liaison dynamique de RPA capable : (1) de diffuser le long de l'ADNsb, (2) de déstabiliser des structures secondaires de l'ADNsb et que (3) les régions non liées par un domaine OB de RPA pourrait servir de site de liaison à d'autres protéines induisant la dissociation de RPA sur l'ADNsb (liaison dynamique des domaines OB de RPA) (**Figure 18**). Cette dynamisme intrinsèque du complexe apporterait une caractéristique essentielle à l'assemblage/désassemblage du filament RPA notamment au cours de la recombinaison pour promouvoir l'association d'autres protéines de liaison à l'ADNsb (tel que RAD51).

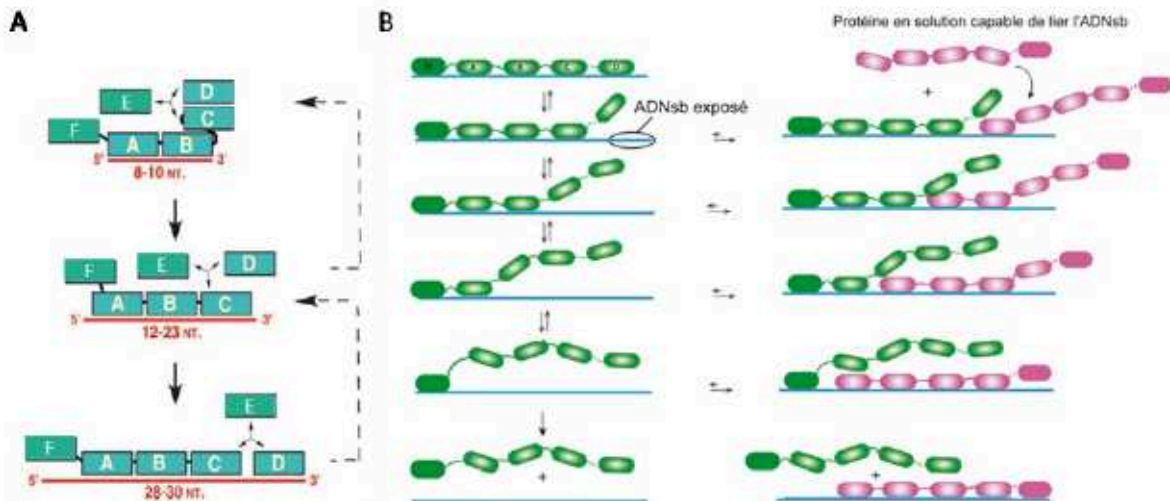


Figure 18 : Modèle de liaison à l'ADNsb du complexe RPA

A) Modèle de liaison séquentielle à l'ADNsb du complexe RPA. Les domaines DBD-A et -B de RPA1 lie entre 8 à 10 nt d'ADNsb. La liaison des domaines DBD-C et DBD-D permet de lier entre 12 à 23 nt et jusque 30 nt d'ADNsb. La flexibilité des linkers entre les différents domaines OB permet d'étendre l'interaction de RPA le long de l'ADNsb. Les domaines OB DBD-A à F correspondent respectivement aux lettres A à F. (adapté d'après (Fanning et al., 2006)) B) Modèle de liaison dynamique de RPA. Les domaines de liaison à l'ADNsb (en vert ou rose) de RPA s'associe et se dissocie rapidement de l'ADNsb. La présence d'autres protéines capables de lier l'ADNsb en solution (comme RAD51) favorise la dissociation et le remplacement de RPA sur le filament d'ADNsb. (adapté de (Gibb et al., 2014))

3) Les rôles essentiels de RPA dans le métabolisme de l'ADN

Le complexe RPA est impliqué dans des processus vitaux de la cellule : la réplication, les mécanismes de réparation de l'ADN (réparation par excision de base (BER), de nucléotides (NER) et de mésappariements de bases (MMR)) et la recombinaison (mitotique et méiotique). L'ensemble de ces processus présente des intermédiaires d'ADNsb et tous nécessitent la présence de RPA qui lie rapidement le simple brin. Les propriétés multiples de RPA (structurales, de liaison à l'ADNsb, d'interactions, d'état de phosphorylation) lui confèrent des fonctionnalités essentielles dans les différentes voies du métabolisme de l'ADN et dans le maintien de la stabilité génomique. De par sa structure et sa capacité d'interactions multiples via ses domaines RPA2-Cter et RPA1-Nter principalement, RPA est considéré comme un « hub » d'interactions ou complexe échafaud qui orchestre les différents intermédiaires simples brins avec les machineries du métabolisme de l'ADN

(réplication, réparation ou RH) (Sugitani et Chazin, 2016). L'état de phosphorylation de la région N-terminale de RPA2 est impliqué dans la modulation des interactions du complexe RPA et participe ainsi à la régulation de l'activité de RPA dans les différentes voies du métabolisme de l'ADN. RPA agit aussi en coordination avec la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN et est requis dans l'activation de points de contrôles cellulaires (checkpoints).

Les rôles de RPA dans la réplication de l'ADN, l'activation des checkpoints réplicatifs et des dommages à l'ADN, et dans la réparation de l'ADN par recombinaison seront détaillés dans ce manuscrit.

3.1) Le rôle de RPA dans la réplication de l'ADN et l'activation des points de contrôles cellulaires

a) Le rôle de RPA dans la synthèse d'ADN aux fourches de réplication

Le complexe RPA est impliqué dans la synthèse d'ADN par son interaction avec la machinerie de réplication. Chez les eucaryotes, la machinerie de réplication, aussi appelée réplisome, se compose de nombreuses sous-unités protéiques : des hélicases (le complexe CMG dont MCM2-7), des ADN polymérases (d'initiation α , d'élongation δ et ϵ), des protéines de recrutement (RFC), des protéines stimulatrices de la processivité des polymérases (PCNA) et des protéines de liaison à l'ADNsb (RPA). Grâce à sa liaison à l'ADNsb, RPA aiderait en premier lieu au recrutement de la polymérase α aux origines de réplication favorisant ainsi l'initiation de la réplication. L'interaction directe de la région N-terminale de RPA1 avec la polymérase α permet aussi de stimuler spécifiquement l'activité et la processivité de synthèse d'ADN de cette dernière. Par ailleurs, la polarité de liaison à l'ADNsb de RPA semble participer à la stimulation de la synthèse par la polymérase α . Lors de l'élongation de la synthèse par les polymérases δ et ϵ , RPA stimule aussi la processivité de ces polymérases via potentiellement son interaction avec PCNA (Oakley and Patrick, 2010). De plus, le mécanisme séquentiel de liaison à l'ADNsb de RPA (mécanisme « Hand-off ») favorise l'enlèvement de la polymérase α au profit de la polymérase δ au cours de la synthèse. Et enfin, RPA et les hélicases MCM sont aussi capables d'interagir pour stabiliser l'avancée de la fourche. En revanche,

l'hyperphosphorylation de RPA2 en N-terminale a été décrite comme inhibitrice des interactions protéiques de RPA, notamment avec la polymérase α . Cette modification post-traductionnelle de RPA modulerait le recrutement et/ou la stimulation de la polymérase α afin d'inhiber la réplication (Maréchal and Zou, 2015; Oakley and Patrick, 2010).

b) Le rôle de RPA dans l'activation des points de contrôles cellulaires liés au stress réplcatif et aux dommages de l'ADN

Au sein des cellules, le stress réplcatif correspond au ralentissement ou à l'arrêt de la fourche de réplication. Il peut résulter notamment : (a) d'un blocage du passage de la fourche par la collision avec la machinerie de transcription, (b) d'une coupure de l'ADN (ADNsb « cassé ») lors du passage de la fourche donnant lieu à la formation d'une CDB ou encore (c) d'autres lésions de l'ADN (telles que des bases modifiées, des cassures de l'ADN, des liaisons entres bases, etc) bloquant le passage de la machinerie de réplication. Les fourches de réplication arrêtées peuvent être directement réparées par RH. Elles peuvent aussi être stabilisées en se remodelant en formant une fourche dite « réversée ». La structure nouvellement formée est en « chicken foot » connue aussi comme une jonction de Holliday. Notamment, ces fourches réversées peuvent être prises en charge et réparées par un mécanisme dépendant de la recombinaison, le Break Induced Repair (BIR). La RH permet ainsi la réparation des lésions de réplication et le redémarrage des fourches arrêtées et/ou réversées. Le complexe RPA est impliqué à plusieurs niveaux dans: (1) le remodelage de ces fourches arrêtées afin de les stabiliser et permettre la réparation des évènements liés aux stress réplcatifs via la recombinaison (Mehta et Haber, 2014; Zeman et Cimprich, 2014); et, (2) l'activation des points de contrôles cellulaires liés aux stress réplcatifs et (3) aux dommages à l'ADN (les CDB).

(1) Lors de la réversion des fourches de réplication, RPA favorise la réversion de la fourche et la formation de la jonction de Holliday (ou « chicken foot »). La translocase à ADN SMARCAL1 interagit avec la partie C-terminale de RPA2 pour être recrutée aux fourches de réplication arrêtées. RPA stimule alors spécifiquement l'activité de réversion de la fourche par SMARCAL1. Cette fourche réversée pourra ensuite être prise en charge et réparée (Bhat et Cortez, 2018).

(2) Lorsqu'une fourche de réplication est soumise à un stress réplicatif, les polymérases tendent à s'arrêter alors que les hélicases continuent de désenchaîner les brins d'ADN en amont de la lésion de l'ADN. Ce découplage des hélicases et des polymérases induit la formation de longs brins d'ADNsb recouverts par RPA. Cet intermédiaire d'ADNsb lié par RPA est essentiel à l'activation du point de contrôle réplicatif par ATR lors d'un arrêt de la fourche de réplication. RPA lie ATRIP (ATR-interacting protein) qui par sa liaison avec ATR le recrute aux sites de dommages de l'ADN. Le recrutement du complexe ATR-ATRIP favorise le recrutement de la topoisomérase TOPBP1 qui stimule l'activité kinase d'ATR. L'activation d'ATR induit une cascade de phosphorylation sur des effecteurs tels que les kinases CHEK1/2 (Checkpoint kinase 1 et 2) pour freiner et/ou stopper la réplication (**Figure 19**) (Cimprich et Cortez, 2008; Maréchal et Zou, 2015). ATR est considérée comme la kinase de référence activatrice du checkpoint lié aux stress réplicatifs. Son activation se fait aussi en présence d'autres dommages de l'ADN qui induisent la formation de la structure ADNsb-RPA.

(3) Si le passage d'une fourche de réplication a amené des « trous » sur l'ADNsb (liés à des bases endommagées notamment), une CDB peut s'être formée. La présence de cette CDB est reconnue par MRN qui active et recrute ATM à la CDB. ATM phosphoryle le variant d'histone H2A.X, γ H2A.X, au niveau proximal de la CDB. La protéine médiatrice MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) reconnaît cette forme phosphorylée de l'histone H2A.X et permet le recrutement à la CDB d'autres complexes MRN via l'interaction de MDC1 avec NBS1 (MRN) pour favoriser la résection (**Figure 19**) (Cimprich et Cortez, 2008). Après résection, les extrémités sont recouvertes par RPA afin de les protéger contre la dégradation et la formation de structures secondaires. En plus de son rôle protecteur du simple brin, l'étude réalisée par Robison et al. (2004) montre que les formes phosphorylées de MRN et RPA co-localisent en foyers discrets et interagissent aux niveaux de fourches de réplication arrêtées. Après traitement à la phosphatase, les deux complexes ne sont plus capables d'interagir ensemble en réponse aux stress réplicatifs. Ces résultats suggèrent qu'en réponse à des dommages de l'ADN et/ou à un stress réplicatif, la phosphorylation de RPA favoriserait son interaction avec le complexe de résection MRN nécessaire à la réparation des dommages par mécanismes de recombinaison. RPA et ATM sont donc impliquées en réplication lorsqu'il y a apparition d'une CDB.

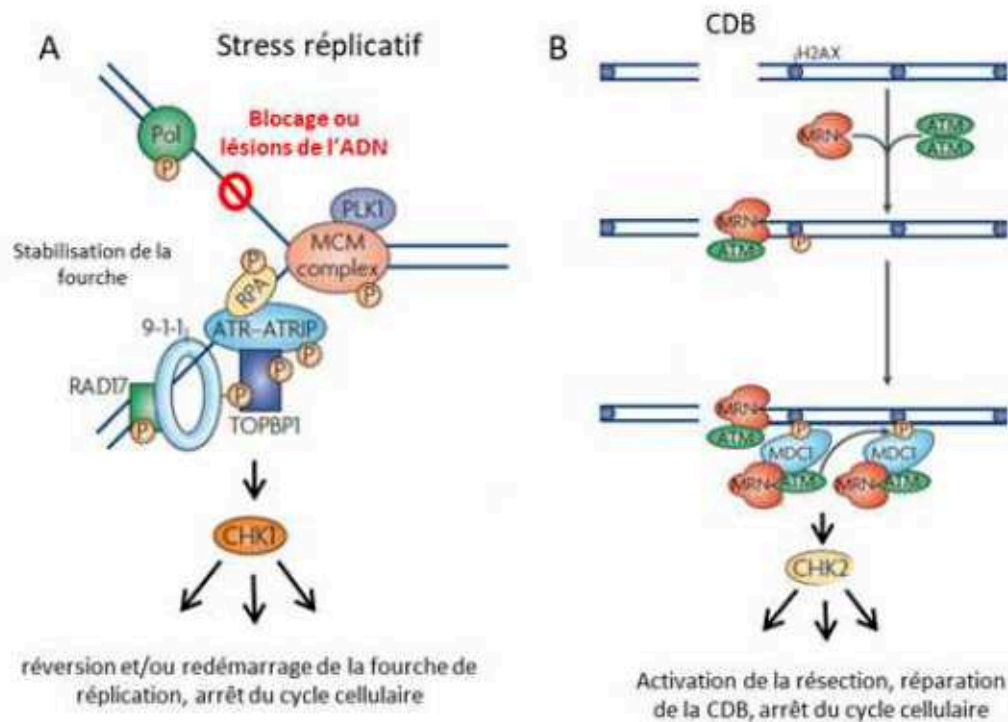


Figure 19 : L'activation d'ATM et d'ATR en réponse au stress réplcatif et aux dommages de l'ADN

A) L'activation d'ATR en réponse à une fourche de réplcation soumise à un stress réplcatif. La progression de la polymérase réplcative (pol) est ralentie par la présence de la machinerie de transcription (blocage) ou la présence de lésions de l'ADN alors que les hélicases du complexe MCM poursuivent la décaténation des brins d'ADN en aval de la fourche. Les brins d'ADNs b formés sont recouverts par RPA qui recrute ATR-ATRIP à la fourche de réplcation. TOPBP1 se lie à ATR-ATRIP qui stimule l'activation d'ATR. ATR induit une cascade de signalisation via CHK1 afin de reverser et/ou redémarrer la fourche de réplcation et induit un arrêt du cycle cellulaire jusqu'à résolution du stress réplcatif. La protéine RAD17 et le complexe RAD9-HUS1-RAD1 (9-1-1) participent à l'activation du checkpoint réplcatif. B) L'activation d'ATM en réponse à une CDB. Le passage d'une fourche de réplcation sur de l'ADN endommagé peut induire la formation d'une CDB. MRN reconnaît la CDB et y recrute ATM qui phosphoryle H2A.X. MDC1 reconnaît la forme phosphorylée de H2A.X et permet le recrutement d'autres protéines MRN et ATM à la cassure. ATM induit une cascade de signalisation via CHK2 afin d'activer la résection (MRN) et permettre la réparation de la CDB. (modifiés d'après (Cimprich et Cortez, 2008))

De façon intéressante, les kinases majeures de la voie de réponse aux dommages de l'ADN et au stress réplicatif que sont ATM et ATR respectivement, semblent capables de s'influencer mutuellement lors de stress réplicatifs. Les deux kinases ATR et ATM s'activeraient selon des structures spécifiques de l'ADN, ADNsb-RPA et CDB respectivement. L'ADNsb-RPA active ATR pour favoriser la réversion de la fourche de réplication. Les CDB, résultantes d'ADN endommagé après passage de la fourche de réplication, activent ATM pour permettre la résection des extrémités de la CDB. La résection aboutit à la formation d'ADNsb-RPA qui active alors ATR. Ainsi, RPA est nécessaire à l'activation des deux kinases essentielles de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et stress réplicatifs (Chanoux et al., 2009; Maréchal et Zou, 2015; Tomimatsu et Mukherjee, 2009).

Par ailleurs, ATM et ATR phosphorylent de nombreuses cibles communes. En réponse aux dommages à l'ADN, RPA2 est hyperphosphorylé sur plusieurs sites dépendants de la liaison du complexe RPA à l'ADNsb et du contexte réplicatif (détaillées par (Zou et al., 2006)). Cette hyperphosphorylation semble être effectuée par les kinases de la famille des PIKK (Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases) dont font parties ATM et ATR. A quoi servirait cette hyperphosphorylation dans un contexte de lésions à l'ADN ? L'hypothèse première est qu'elle induirait un changement du rôle de RPA en réplication au profit de son rôle dans les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN. Le fait que (1) cette hyperphosphorylation déstabilise l'interaction de RPA avec la polymérase α *in vitro* (Patrick et al., 2005) et que (2) une forme constitutive hyperphosphorylée de RPA ne se localisent pas aux foyers de réplication mais aux foyers de dommages à l'ADN (Vassin et al., 2004) semblent conforter cette hypothèse.

3.2) Le rôle de RPA en recombinaison homologue

Au cours de la recombinaison, de nombreux intermédiaires simples brins sont générés et donc potentiellement liés par RPA.

a) RPA et la formation de la D-Loop

Les recombinaisons sont capables de recouvrir l'ADNsb et de former un filament nucléoprotéique à activité recombinogène en absence de RPA (Brooks Crickard et al., 2018; Chan et al., 2018; Sung, 1994). Et, elles sont capables seules de promouvoir l'enlèvement de RPA sur l'ADNsb, mais lentement en comparaison avec la présence de BRCA2 (Brooks Crickard et al., 2018; Chan et al., 2018; Liu, D. et al., 2017). Pour autant en absence de RPA, la formation de la D-loop par les recombinaisons est très faible (0,9%) même en présence d'autres protéines médiatrices de la formation de ce filament recombinogène (Chan et al., 2018). Finalement, comment les recombinaisons et BRCA2 permettent efficacement d'enlever RPA de l'ADNsb pour favoriser la formation du filament recombinogène et la formation de la D-Loop?

RPA est capable d'interagir avec les recombinaisons RAD51 et DMC1 (Golub et al., 1998; Stauffer et Chazin, 2004). Et, la perte d'interaction directe entre le domaine DBD-A de RPA1 (domaine majeur de liaison à l'ADNsb de RPA) et RAD51 diminue considérablement la capacité de RAD51 à déplacer directement RPA de l'ADNsb (Stauffer et Chazin, 2004). Stauffer et Chazin proposent que l'interaction de RPA1 avec RAD51 entre en compétition directe avec l'ADNsb. Cette interaction mimerait celle avec l'ADNsb engendrant le décrochage de RPA (**Figure 20**). Il n'a pas été montré si l'interaction directe de DMC1 avec RPA favorise le déplacement de RPA de façon similaire à RAD51. De plus, BRCA2 stimulerait l'échange RAD51/RPA en favorisant l'interaction RAD51/RPA et induirait ainsi la déstabilisation de RPA à l'ADNsb (Martinez et al., 2016). La formation du filament RAD51 est davantage stimulée en présence d'une autre protéine partenaire de BRCA2, DSS1, capable de mimer l'ADNsb (Liu, J. et al., 2010; Zhao et al., 2015a). Complexé à BRCA2, DSS1 interagit avec RPA (la partie N-terminale, et les domaines d'interaction à l'ADNsb, DBD-A et DBD-B de RPA1) et diminue l'interaction de RPA avec l'ADNsb en mimant l'ADNsb favorisant l'enlèvement de RPA (Zhao et al., 2015) (paragraphe 2.2)

L'invasion). Il apparaît donc que le déplacement de RPA se fait par l'intermédiaire d'interactions compétitives qui miment celles avec l'ADNsb (**Figure 20**). En recombinaison méiotique, le facteur méiotique spécifique MEILB2 lie directement BRCA2 et assure le recrutement des recombinauses RAD51 et DMC1 aux sites de recombinaison pour assurer la progression de la RH méiotique (Brandsma et al., 2019; Zhang, J. et al., 2019, 2020). MEILB2 pourrait jouer un rôle similaire à celui de DSS1 en méiose pour permettre la formation du filament recombinogène en stimulant le déplacement de RPA.

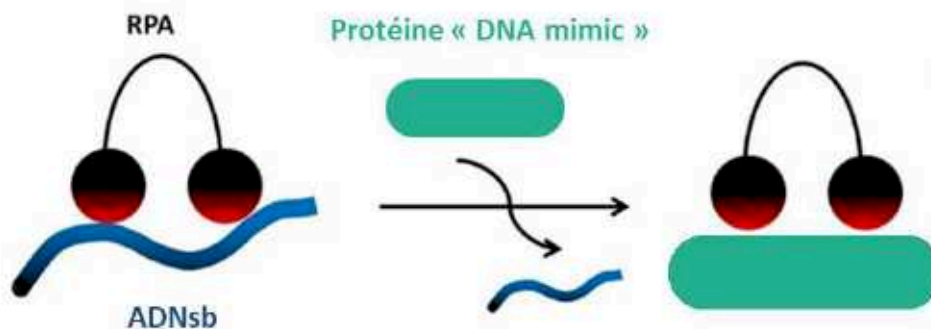


Figure 20 : Modèle du déplacement de RPA à l'ADNsb par des protéines mimant l'ADNsb

Une protéine de liaison à l'ADNsb (protéine « DNA mimic » en vert) entre en compétition directe avec l'interaction de RPA et l'ADNsb favorisant le décrochage de RPA à l'ADNsb. (adapté de (Sugitani et Chazin, 2016)).

b) RPA et la régulation de la formation des CO

RPA participe à d'autres étapes de la RH que celle de l'invasion notamment (1) à la résection des extrémités de la CDB, (2) à la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop et (3) à la déstabilisation d'intermédiaires de recombinaison.

(1) Après formation de la CDB, les extrémités sont résectées par le complexe MRN/CtIP (résection initiale) et EXO1/BLM/DNA2 (élongation de la résection). RPA coordonnerait la résection initiale avec l'élongation de la résection. RPA interagit (1) avec MRN, BLM et DNA2 ; et, (2) stimule les activités de résection de EXO1 et DNA2. RPA est recruté à l'ADNsb après initiation de la résection par MRN. Puis, RPA interagit, recrute et stimule la nucléase DNA2 aux extrémités d'ADN et stimule l'activité de BLM. Et, RPA favorise aussi l'affinité d'EXO1 aux extrémités d'ADN et stimule son activité après recrutement d'EXO1 par CtIP/MRN (Brosh et al., 2000;

Chen et al., 2013; Nimonkar et al., 2011; Symington, 2014). RPA participe donc activement au recrutement et à la stimulation des acteurs de la résection en recombinaison.

(2) Après l'invasion du filament recombinogène, la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop par la polymérase δ dépend de la présence de RPA (Sneeden et al., 2013). En effet, RPA stimule fortement la synthèse d'ADN en se liant à la fois au brin d'ADN qui a envahi et qui s'est fait envahir au sein de la D-Loop. De ce fait, RPA prévient les contraintes topologiques au sein de la D-Loop et évite l'arrêt de la synthèse par la polymérase (**Figure 21**). RPA participe aussi à la stabilité des intermédiaires de la D-Loop de par son interaction avec les hélicases HROB-MCM8-MCM9 en recombinaison mitotique et méiotique (Hustedt et al., 2019) (paragraphe 2.3) L'extension de la D-Loop et la synthèse d'ADN). RPA favorise donc la synthèse d'ADN en stabilisant les intermédiaires au sein de la D-Loop.

(3) A l'inverse, RPA participe à la déstabilisation de certains intermédiaires de recombinaison afin de prévenir la formation de CO. La présence de RPA stimule la dissolution des D-Loop et des dJH en présence de BLM-TOPIII α -RMI1/2 (BTR) (Fasching et al., 2015b; Xue et al., 2013). Notamment, l'interaction de RPA stimule l'activité hélicase de BLM (Brosh et al., 2000) et celle avec RMI1 est indispensable à la dissolution de la dJH (Fasching et al., 2015b). RPA est aussi capable d'interagir avec d'autres hélicases potentiellement impliquées en RH telles que WRN et RECQL1 et stimule leurs activités hélicases pour la dissolution de D-Loop *in vitro* (Cui et al., 2003; Shen et al., 2003; Sommers et al., 2014; Sowd et al., 2009). L'interaction de RPA avec les hélicases semble favoriser leur action dans la dissolution de molécules jointes de l'ADN (D-Loop, dJH) et participerait ainsi à l'inhibition de la formation des CO en RH.

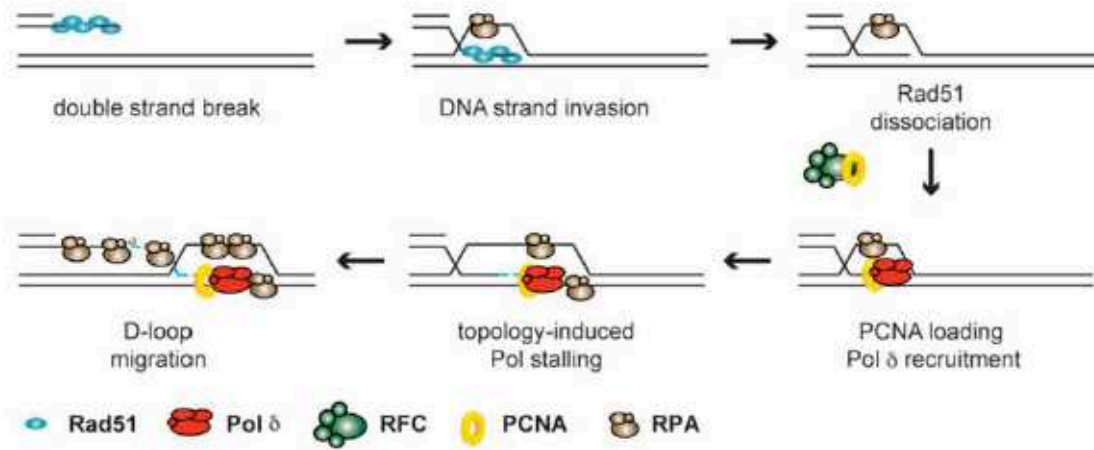


Figure 21 : Modèle du rôle de RPA lors de la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop en recombinaison

Après invasion du filament recombinogène RAD51, RFC charge PCNA permettant le chargement de la polymérase δ et l'initiation de la synthèse d'ADN au sein de la D-Loop. RPA en se liant à l'ADNsb présent au sein de la D-loop favorise le recrutement de la polymérase en stabilisant les intermédiaires. L'élongation de la synthèse d'ADN induit des contraintes topologiques lors de la migration de la D-Loop. RPA lie l'extrémité d'ADN en amont de la polymérase et facilite la processivité de la polymérase (d'après (Sneeden et al., 2013)).

B) Le complexe méiotique spécifique essentiel de liaison à l'ADNsb : le complexe MEIOB-SPATA22

1) La découverte et les modèles d'étude de MEIOB et SPATA22

Meiosis specific with OB domains (Meiob) a été découvert et étudié selon deux approches chez la souris. D'une part, le Laboratoire de Développement des Gonades a utilisé une analyse transcriptomique différentielle basée sur le différentiel d'entrée en méiose des cellules germinales entre le mâle et la femelle (post-natal versus foetal) (Souquet et al., 2013). D'autre part, Luo et al., (2013) ont utilisé une approche de crible des protéines associées à la chromatine dans les cellules méiotiques. La souris nulle pour *Meiob* a été générée par transgénèse ciblée par les deux équipes pour en étudier le rôle.

Spermatogenesis associated 22 (Spata22) a été identifié pour la première fois chez l'Homme comme un gène associé à la spermatogénèse dans une analyse transcriptomique différentielle entre le testicule foetal et adulte (Sha et al., 2002). *Spata22* a aussi été décrit et étudié chez le rat et la souris à la suite d'un crible génétique par mutagenèse aléatoire à l'ENU (N-ethyl-N-nitrosourea). Chez le rat, la mutation appelée tremor (*tm*) induit une délétion chromosomique de plusieurs gènes dont *Spata22* (Ishishita et al., 2013, 2014). Chez la souris, la mutation appelée *repro42* se localise au niveau du gène *Spata22*. Elle est non-sens avec l'apparition d'un codon stop prématuré et une absence de protéine SPATA22 (La Salle et al., 2012). La souris nulle pour *Spata22* a par la suite été générée par transgénèse ciblée (Hays et al., 2017a).

2) La conservation de MEIOB et SPATA22

Meiob est retrouvé chez la plupart des métazoaires (à l'exception des nématodes), les champignons et dans un organisme unicellulaire, *Capsaspora owczarzaki*. MEIOB est très conservé chez les vertébrés (91% de similitude et 85% d'identité entre les séquences d'acides aminés entre la souris et l'Homme). Aucun homologue n'a été identifié chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* (Ribeiro et al., 2016; Souquet et al., 2013). En revanche, *Meiob* est un paralogue méiotique spécifique de RPA1 chez les métazoaires. La phylogénie de MEIOB et RPA1 suggère que *Meiob* aurait évolué à partir de la duplication d'un gène ancestral de

Rpa1 avant l'apparition de la multicellularité et des métazoaires (Ribeiro et al., 2016; Souquet et al., 2013).

Spata22 est retrouvé chez les vertébrés à os (Eutélostomes) incluant les mammaliens, les oiseaux, les reptiles et les poissons. SPATA22 est conservé entre ces espèces avec un degré de conservation variant en fonction de la divergence entre les espèces (73% d'identité entre les séquences d'acides aminés entre l'Homme et la souris et seulement 37% entre celles de l'Homme et du zebrafish). Aucun paralogue de *Spata22* n'a été identifié chez la souris ou l'Homme (La Salle et al., 2012).

3) MEIOB et SPATA22, deux facteurs essentiels à la RH méiotique

3.1) La localisation de MEIOB et SPATA22 aux intermédiaires de recombinaison

A partir des modèles murins et/ou rats, l'expression spécifique et la localisation de MEIOB et SPATA22 ont été déterminées dans les cellules germinales. *Meiob* et *Spata22* sont spécifiquement exprimées dans les cellules germinales méiotiques mâles et femelles (Hays et al., 2017a; La Salle et al., 2012; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Les deux protéines se localisent en foyers au niveau des chromosomes méiotiques du leptotène jusqu'au pachytène (Hays et al., 2017a; La Salle et al., 2012; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Dans les spermatocytes murins et de rats, les foyers de MEIOB et SPATA22 se forment dès le stade leptotène, atteignent un maxima en zygotène et diminuent en pachytène (Hays et al., 2017a; Ishishita et al., 2013, 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). La dynamique de MEIOB et SPATA22 suit celle d'autres acteurs de la RH méiotique tels que RPA, RAD51 et DMC1 (Moens et al., 2002).

De plus, MEIOB et SPATA22 co-localisent avec RPA et co-localisent partiellement avec RAD51 et DMC1 (Hays et al., 2017a; La Salle et al., 2012; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Une faible proportion de MEIOB et SPATA22 co-localisent avec MSH4 ou MLH1, des acteurs plus tardifs de la recombinaison (Hays et al., 2017a; Souquet et al., 2013). Chez des mutants *Spo11^{-/-}* qui ne forment pas de CDB, MEIOB n'est pas localisée aux chromosomes méiotiques (Souquet et al., 2013), ce qui atteste que MEIOB est recrutée aux intermédiaires de recombinaison.

Et, le fait que MEIOB s'accumule en absence de DMC1 (Souquet et al., 2013), suggère que MEIOB est recruté aux filaments présynaptiques.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que MEIOB et SPATA22 sont des acteurs de la RH méiotique et participent à la réparation des CDB à des étapes précoces et plus tardives (comme RPA).

3.2) MEIOB et SPATA22 sont essentielles à la réparation des CDB méiotiques

L'étude du rôle de MEIOB et SPATA22 en recombinaison méiotique s'est faite par l'analyse du phénotype des souris et/ou rats invalidés pour les gènes codants ces protéines (Hays et al., 2017a; Ishishita et al., 2013, 2014; La Salle et al., 2012; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). L'absence de MEIOB ou SPATA22 induit une stérilité mâle et femelle due à un arrêt de progression méiotique des cellules germinales à un stade similaire au zygotène ou au pachytène (zygotène/pachytène-like) et est associé à une apoptose des cellules germinales. MEIOB et SPATA22 sont donc essentielles à la progression de la prophase I de méiose.

Les mutants présentent des défauts de progression méiotique associés à un synapsis aberrant et incomplet des chromosomes méiotiques. De plus, la persistance du marqueur γ H2A.X et de RPA dans les cellules arrêtées indiquent une absence réparation des CDB méiotiques. Chez les souris *Meiob*^{-/-} et le rat *tm* déficient pour *Spata22*, le nombre de foyers RPA est normal du leptotène jusqu'au zygotène puis reste anormalement élevé (Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013). Par ailleurs, l'absence de foyers MLH1 chez les mutants traduit une absence de formation de CO, caractéristique des défauts de réparation des CDB méiotiques (Hays et al., 2017a; Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Ainsi, ces résultats indiquent que MEIOB et SPATA22 sont nécessaires à la réparation des CDB méiotiques par recombinaison.

Afin de déterminer à quel(s) étape(s) de la recombinaison MEIOB et SPATA22 interviennent, le chargement des recombinases a été principalement étudié au vu de l'arrêt cytologique des cellules germinales chez les mutants nuls pour *Meiob* ou *Spata22*. Chez les souris *Meiob*^{-/-} et les rats *tm* déficients pour *Spata22*, le nombre de foyers RAD51 et DMC1 est initialement normal en stade leptotène puis décline précocement à partir du stade zygotène (Ishishita et al., 2014; Luo et al., 2013). Ces

résultats suggèrent que MEIOB et SPATA22 ne sont pas nécessaires au chargement des recombinaisons. Cette perte précoce des recombinaisons en absence de MEIOB et SPATA22 peut s'expliquer selon : (1) MEIOB et SPATA22 stabilise les recombinaisons aux intermédiaires de recombinaison pour favoriser l'invasion ; ou (2) en leur absence, l'invasion se fait mais les intermédiaires post-synaptiques ne peuvent pas progresser et les recombinaisons sont enlevées. MEIOB et SPATA22 agiraient au moment de l'invasion soit en stabilisant/facilitant les intermédiaires de l'invasion soit en stabilisant les intermédiaires en post-synaptique.

4) Les propriétés de MEIOB et SPATA22

4.1) La structure de MEIOB et SPATA22

MEIOB est un paralogue de la grande sous-unité de RPA1 et possède 3 domaines OB homologues de RPA1 (Ribeiro et al., 2016). Cependant, MEIOB et RPA1 diffèrent significativement par leur région N-terminale puisque MEIOB ne possède pas de quatrième domaine OB en région N-terminale similaire à RPA1. Le domaine OB en N-terminale de RPA1 (DBD-F) est impliqué dans de nombreuses interactions comme ATRIP ou MRN (paragraphe 1) Structure et modalités d'interaction des sous-unités de RPA). L'absence de ce domaine chez MEIOB suggère que MEIOB possède des interactions propres avec un nombre plus restreint de partenaires. Cette différence notable supporte l'idée que MEIOB posséderai un rôle distinct de RPA1 et explique en partie que RPA1 ne compense pas l'absence de MEIOB dans les *Meiob*^{-/-} (Ribeiro et al., 2016; Souquet et al., 2013).

SPATA22 possède deux régions très conservées : une petite région située en N-terminale (quelques dizaines d'acides aminés chez la souris) et une plus grande région située en C-terminale (une centaine d'acides aminés chez la souris) (La Salle et al., 2012). Sa région N-terminale est structurellement désorganisée alors que sa région C-terminale s'organise en domaine globulaire (La Salle et al., 2012). L'analyse structurale menée par le Dr Ribeiro indique que SPATA22 possède un domaine OB situé dans sa région conservée en C-terminale (Ribeiro et al., 2018). SPATA22 possède de forte similarités de structure avec la moyenne sous-unité de RPA, RPA2, de par son domaine OB unique en région C-terminale et une région N-terminale sans structure fonctionnelle apparente (Ribeiro et al., 2018). Tout comme RPA2, cette

région N-terminale de SPATA22 pourrait participer à la modulation de la fonctionnalité de SPATA22.

4.2) L'interaction de MEIOB et SPATA22 et leur interdépendance

Dans le but de déterminer des partenaires de MEIOB, l'équipe de Luo et al., (2013) a réalisé des études d'interactions protéiques au sein des cellules germinales et mis en évidence que MEIOB et SPATA22 interagissent ensemble (Luo et al., 2013). Cette interaction est assurée par les parties C-terminales de MEIOB et SPATA22 qui contiennent les domaines OB terminaux des deux protéines (Xu, Y. et al., 2017). Seuls les domaines OB situés en région C-terminale sont nécessaires et suffisants à leur interaction (Ribeiro et al., 2018). Cette modalité d'interaction via les domaines OB C-terminaux de MEIOB et SPATA22 possède des similitudes avec celle des sous-unités de RPA. De plus, cette interaction entre les deux protéines semble assurer une stabilité interdépendante dans les cellules germinales (Hays et al., 2017a; Luo et al., 2013). Et, la co-localisation de MEIOB et SPATA22 aux chromosomes méiotiques et aux CDB induites dans les cellules somatiques par des agents génotoxiques est aussi interdépendante (Luo et al., 2013; Xu, Y. et al., 2017). Ces résultats suggèrent que MEIOB et SPATA22 forment un complexe et sont capables de se localiser aux CDB.

4.3) MEIOB et sa capacité à lier l'ADNsb

Au vu de l'homologie de MEIOB avec RPA1 et parce que RPA1 possède 3 domaines OB impliqués dans l'interaction de RPA avec l'ADNsb, il est probable que MEIOB puisse aussi lier l'ADNsb. Il a ainsi été montré *in vitro* que MEIOB lie spécifiquement l'ADNsb via son domaine OB central (équivalent au domaine DBD-B de RPA1) (Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Cette liaison à l'ADNsb de MEIOB pourrait participer à son recrutement directement aux intermédiaires simples brins au cours de la recombinaison.

Ce domaine OB central de MEIOB posséderait aussi une activité exonucléase 3'>5' spécifique de l'ADNsb (Luo et al., 2013). Cette activité n'est pas attendue pour un homologue de RPA1 : RPA protège le simple brin contre la dégradation. Chez la souris, MEIOB n'est pas nécessaire ni à la formation des CDB ni à la résection et il se localise aux intermédiaires jusqu'en pachytène (Luo et al., 2013; Souquet et al.,

2013). Luo et al., ont alors proposé que MEIOB serait impliqué dans la résection d'ADN excédentaire lors de la synthèse au sein de la D-Loop ou lors de la formation des événements de NCO par le SDSA (Luo et al., 2013). Pour autant, les auteurs restent prudents sur la possibilité qu'*in vivo* MEIOB n'utilise pas cette activité avec ses partenaires d'interaction. De plus, cette activité n'a été observée qu'avec l'OB central de MEIOB. Et, la purification de cette forme tronquée est particulièrement succincte et pourrait potentiellement être contaminée.

4.4) L'interaction de MEIOB et SPATA22 avec RPA

En plus de l'interaction de MEIOB et SPATA22 dans les cellules germinales murines, MEIOB est capable d'interagir avec RPA2 (Luo et al., 2013). Ces résultats corrélerent avec la colocalisation de MEIOB, SPATA22 et RPA aux chromosomes méiotiques et suggèrent que MEIOB et SPATA22 collaborent avec RPA au cours de la RH méiotique (Hays et al., 2017a; Luo et al., 2013; Souquet et al., 2013). Pour définir les modalités d'interaction entre ces trois protéines, des expériences de co-immunoprécipitation lors de surexpressions des protéines souris dans des cellules humaines ont montré que (1) MEIOB et SPATA22 interagissent respectivement avec RPA1, (2) SPATA22 interagit avec RPA1 et RPA2 et (3) MEIOB et SPATA22 participent ensemble à l'interaction avec RPA3 (Xu et al., 2017). Ces interactions multiples suggèrent que MEIOB et SPATA22 collaborent avec le complexe RPA. Cependant, chacune des sous-unités de RPA a été exprimée individuellement dans cette étude. L'interaction de MEIOB-SPATA22 avec le complexe RPA n'a donc pas été testée. De plus, l'absence de RPA1 chez la souris dans les cellules germinales induit l'absence de localisation des sous-unités RPA2 et RPA3 aux chromosomes méiotiques (Shi et al., 2019), ce qui suggère qu'*in vivo* seule la forme complexée des sous-unités de RPA est impliquée en recombinaison. Cela implique aussi que MEIOB et SPATA22 interagiraient plutôt avec le complexe RPA entier en méiose. De plus, l'absence de RPA1 ne modifie pas le recrutement de MEIOB et SPATA22 aux chromosomes méiotiques mais celui des recombinases (Shi et al., 2019), ce qui renforce l'idée que le complexe MEIOB-SPATA22 ne nécessite pas la présence d'une sous-unité de RPA pour être formé. Il est probable que la complexation de MEIOB-SPATA22, d'une part, et des sous-unités de RPA, d'autre part, soient responsables *in vivo* des points de contacts multiples entre les différentes protéines observées *in vitro* lors de l'interaction de MEIOB, SPATA22 et RPA.

Par ailleurs, d'autres données *in vivo* décrivent un nouvel interactant de MEIOB et SPATA22. Chez la souris, MEILB2/HSF2BP, essentielle au recrutement des recombinaisons RAD51 et DMC1 aux sites de recombinaison, interagit avec SPATA22 et RAD51 (Zhang, J. et al., 2019). Et BRME1, le partenaire stabilisateur de MEILB2, interagit avec MEIOB et SPATA22, et RAD51 (Zhang, J. et al., 2020). De plus, MEILB2 et son partenaire BRME1 n'influent ni sur la localisation de RPA ni celles de MEIOB et SPATA22. Il se pourrait que l'interaction de MEILB2/BRME1 avec MEIOB et SPATA22 favorise la formation correcte du filament recombino-gène et la formation de la D-Loop. L'interaction décrite entre MEILB2 et SPATA22 indique que SPATA22 pourrait avoir des interactions propres qui joueraient un rôle dans les fonctionnalités du complexe MEIOB-SPATA22. Alors que la région C-terminale de SPATA22 est impliquée dans l'interaction avec son partenaire MEIOB (Xu, Y. et al., 2017), la fonction de la région N-terminale de SPATA22 est inconnue à ce jour. Cette région pourrait servir de hub d'interaction au complexe MEIOB-SPATA22 pour orienter les fonctionnalités du complexe au cours de la recombinaison.

Au vu des données *in vitro* et *in vivo*, l'interaction de MEIOB et SPATA22 avec RPA suggère bien que MEIOB et SPATA22 sont présents aux intermédiaires liés par RPA et collaborent sur ces intermédiaires pour les faire progresser en RH méiotique. D'autres études sur les propriétés et les fonctionnalités de l'interaction de MEIOB et SPATA22 avec RPA permettront une meilleure compréhension de son rôle en recombinaison méiotique. Notamment, elles permettront de savoir sur quelle(s) étape(s) précisément est (sont) impliqué(es) MEIOB et SPATA22 et qu'apporte ce complexe à ces intermédiaires en RH méiotique (spécificités structurales et/ou d'interactions) pour favoriser leur progression.

5) *MEIOB* et *SPATA22* chez l'Homme

Grâce aux méthodes de séquençages modernes, de plus en plus de causes génétiques sont reliées à des cas d'infertilité humaine et apportent une meilleure compréhension des cas d'infertilité considérés jusqu'alors idiopathiques (Hassold et al., 2007; Hassold et Hunt, 2001; Huhtaniemi et al., 2018; Mandon-pépin et al., 2002; Vera et al., 2012). Les modèles animaux déficients pour *Meiob* et *Spata22* ont permis d'établir leur rôle essentiel dans la réparation des CDB méiotiques par recombinaison et ainsi de les lier à de potentielles causes génétiques notamment d'azoospermie chez l'homme.

Deux études génétiques à la recherche de variants perte-de-fonction impliquées en spermatogénèse chez des patients atteints d'azoospermie ont mis en évidence des mutations de *MEIOB*. La première décrit un cas familial de consanguinité possédant une mutation homozygote faux sens d'un acide aminé très conservé du premier domaine OB de *MEIOB* alors que la deuxième décrit une mutation non-sens retrouvée chez deux frères induisant la troncation de la moitié du domaine OB C-terminal de *MEIOB* (Gershoni et al., 2017, 2019). La causalité de ces mutations n'a pas été démontrée par des études fonctionnelles de ces formes mutées de *MEIOB*. Pour autant, ces deux mutations se localisent dans les domaines fonctionnels de *MEIOB* et sont donc fortement susceptibles de modifier la conformation et/ou les interactions, notamment avec son partenaire *SPATA22*, empêchant à ces formes mutées d'être fonctionnelles chez ces patients infertiles. Récemment, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr Veitia sur un cas familial d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) présentant une mutation ponctuelle de *MEIOB*. Cette mutation induit un saut d'épissage de l'exon 12 aboutissant à la délétion de la majorité de l'OB C-terminale de *MEIOB*. Nous avons participé à l'étude fonctionnelle de cette mutation de *MEIOB* et montré que cette forme tronquée n'est plus capable d'interagir avec son partenaire *SPATA22* (Caburet et al., 2019). Cette étude atteste de l'importance *in vivo* de l'interaction entre *MEIOB* et *SPATA22*. Quant à *SPATA22*, des variants d'expression ont été retrouvés chez des patients atteints d'azoospermie et il a aussi été décrit un niveau anormalement bas d'expression du transcrit *SPATA22* dans une autre cohorte de patients azoospermiques (Dorosh et al., 2013; Okada et al., 2008).

IV) *MEIOB* et *SPATA22* et leur expression dans les cancers: un rôle potentiel de dérégulation ?

Bien qu'exprimés spécifiquement dans les cellules germinales méiotiques, *MEIOB* et *SPATA22* sont exprimés de façon aberrante dans plusieurs types de cancers (Wang, C. et al., 2016). Cette expression aberrante dans les cancers est aussi le cas de nombreux autres gènes spécifiquement exprimés dans les cellules germinales comme *SPO11*, *SYCP3* ou encore *HORMAD1* (Whitehurst, 2014). Ces gènes normalement restreints aux cellules germinales et exprimés anormalement dans divers cancers sont regroupés au sein de la famille des Cancer Testis Antigens (CTA).

A) Les Cancer Testis Antigens

1) La découverte des Cancer Testis Antigens

Les CTA ont été découverts lors de recherches d'antigènes de surfaces spécifiquement exprimés par les cellules tumorales dans le but de les utiliser comme des cibles en immunothérapies (Van Der Bruggen et al., 1991; Van Pel et al., 1995). *MAGE-1* (Melanoma Antigen 1) fut le premier membre découvert d'une large famille de CTA. Les gènes *MAGE*, dont l'expression est restreinte au testicule, sont couramment exprimés dans les tumeurs (Simpson et al., 2005; Van Der Bruggen et al., 1991). La combinaison d'approches immunologiques et d'analyse des profils d'expression a permis de classer plus de 200 gènes parmi les CTA (Whitehurst, 2014). Aujourd'hui, de nombreux gènes sont considérés comme des CTA uniquement sur la base de leur expression retrouvée dans les testicules/ovaires (ainsi que le placenta) et les tumeurs sans que leur statut d'antigène n'ait été déterminé (Gantchev et al., 2020; Whitehurst, 2014). Cette expression restreinte associée aux potentiels antigéniques des CTA en font des cibles idéales pour des traitements par immunothérapie et thérapies ciblées des cancers.

2) La classification des Cancer Testis Antigens

Les CTA peuvent être classés en fonction de leur profil d'expression. Bien qu'ayant tous une expression préférentielle restreinte aux gonades, certains CTA peuvent présenter une expression (a) exclusivement gonadique, ou (b) restreinte aux gonades et au cerveau ou bien (c) aux gonades et dans pas plus de deux autres tissus somatiques (avec une expression inférieure à celle retrouvée dans les gonades) (Hofmann et al., 2008). En plus de leur profil d'expression, de nombreux CTA sont localisés sur le chromosome X et référencés comme des gènes CT-X. Décrit initialement pour les gènes testiculaires, les gènes CT-X seraient exprimés préférentiellement par les cellules souches testiculaires, les spermatogonies, qui prolifèrent activement. L'expression des gènes CT-X semble aussi être fortement associée à des séquences répétées au sein du génome. A l'inverse, les gènes non liés au chromosome X (gènes non CT-X) sont répartis au sein du génome entier sans événements génomiques particuliers associés (Simpson et al., 2005). Et, leur expression prédominante semble être dans des stades de différenciation plus tardifs des cellules germinales comme ceux des spermatocytes. Cette distinction entre les cellules germinales différenciées et indifférenciées pour l'expression des gènes CT-X et les non CT-X pourraient apporter des caractéristiques propres (prolifération vs différenciation, par exemple) aux cellules cancéreuses en fonction des gènes exprimés.

3) L'expression des Cancer Testis Antigens

3.1) L'expression hétérogène des Cancer Testis Antigens

L'analyse des banques de données transcriptionnelles publiques a permis de déterminer de nouveaux CTA potentiels et d'étudier leur expression à grande échelle sur des échantillons variés de patients atteints de cancers. Ainsi, le niveau d'expression diffère d'un CTA à un autre et d'un type de cellule tumorale à un autre (Wang, C. et al., 2016; Whitehurst, 2014). Et, le niveau d'expression des CTA varie en fonction des échantillons au sein d'un même type de cellules tumorales. Certains CTA seraient exprimés dans au moins 40% des échantillons provenant d'un même type de tumeur (Hofmann et al., 2008; Wang, C. et al., 2016). La présence de protéine n'a pas systématiquement été déterminée et/ou corrélée avec la présence

des transcrits pour tous les CTA. Souvent, celle-ci est mise en évidence lors d'études menées sur un nombre restreint de CTA dans des lignées cancéreuses et des échantillons de patients. Néanmoins, l'expression de certains CTA (seul ou à plusieurs) pourrait être des indicateurs spécifiques (ou « signatures ») d'un type de tumeur et/ou avoir une fonctionnalité au sein de la tumeur potentiellement en influençant son comportement tumoral (capacité de survie/prolifération, d'invasion/migration et d'instabilité génétique).

3.2) L'activation des Cancer Testis Antigens

L'expression aberrante des gènes de cellules germinales dans les cancers suppose une activation de l'expression du programme germlinal (partielle ou totale) dans les cellules cancéreuses. Cette activation aberrante pourrait être la conséquence de l'instabilité génétique caractéristique des cancers et/ou de dérégulations épigénétiques. L'activation des CTA au sein des tumeurs semblent être fortement liée à des modifications épigénétiques majoritairement de méthylation de l'ADN. En effet, l'exposition à un agent de déméthylation est suffisante à induire l'activation de l'expression de certains CTA (tels que les MAGE), ce qui suggère un mécanisme commun entre les CTA (Coral et al., 2002; De Smet et al., 1999; Fratta et al., 2010, 2011; Whitehurst, 2014). En outre, le séquençage bisulfite a montré que certains CTA possèdent des régions promotrices hypométhylées dans différentes tumeurs en comparaison avec leur tissu d'expression normale et corrèle avec une activation d'expression (Glazer et al., 2009; Smith et al., 2009). Bien que la méthylation de l'ADN semble être un régulateur clé dans l'activation des CTA, il est aussi proposé que les modifications d'histones, dont l'acétylation, participent à cette expression aberrante. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la méthylation de l'ADN et/ou de l'acétylation d'histone induit (ou augmente) l'expression de CTA dans différents types de cancers (Akers et al., 2010). Cette induction pharmacologique peut activer une partie des CTA, mais la réactivation globale n'est pas observée. Ces résultats suggèrent des spécificités de régulations propres à chaque CTA et/ou l'implication d'autres phénomènes de régulations transcriptionnelles (autres modifications épigénétiques, modulation de facteurs de transcription). Les régulations de l'expression des CTA restent mal connues et semblent varier en fonction des CTA et des types de cancers.

4) La mise en évidence de fonctionnalités des Cancer Testis Antigens

Le processus de développement des cellules germinales et celui des tumeurs possèdent de fortes similitudes comme la capacité de prolifération clonale et l'hyperactivité transcriptionnelle (Simpson et al., 2005). Ces similitudes suggèrent qu'un lien fonctionnel entre le processus de tumorigénèse et l'expression des CTA puisse exister.

De nombreux CTA ont été notamment impliqués dans différents aspects du développement/maintien du processus tumoral (Fratta et al., 2010, 2011; McFarlane et Wakeman, 2017). En particulier, une sous-population des CTA ayant une expression méiotique spécifique dans les cellules germinales émerge et est de plus en plus décrite dans la littérature avec un rôle promoteur d'instabilité génétique au sein des cellules cancéreuses : les gènes de réparation des CDB méiotiques (Gantchev et al., 2020). Ces gènes de réparation de l'ADN, comme *SPO11*, sont exprimés dans les cancers et de par leur fonctionnalité sont capables d'influencer la réparation des dommages de l'ADN et la stabilité génétique dans ces cellules.

Comme exemple, la déplétion de *DMC1* dans des lignées cellulaires de glioblastome induit une diminution de la prolifération, une augmentation du stress réplcatif et une radiosensibilité accrue *in vitro*, ce qui suggèrent que l'expression ectopique de *DMC1* dans les cellules cancéreuses jouerait un rôle dans la réparation des dommages de l'ADN (Rivera et al., 2015). Cette expression ectopique de *DMC1*, semble donc influencer la survie/prolifération et la réparation des dommages de l'ADN dans ces cellules.

B) MEIOB et SPATA22 sont des Cancer Testis Antigens

1) L'expression de MEIOB et SPATA22 dans les cancers

MEIOB et *SPATA22* sont eux aussi exprimés de façon aberrante dans plusieurs types de cellules cancéreuses provenant entre autre des poumons, de la vessie ou des reins (Wang, C. et al., 2016). Différents niveaux d'expression des transcrits de *MEIOB* ou *SPATA22* ont été retrouvés chez des patients et dans des lignées cellulaires cancéreuses (Shiohama et al., 2014; Wang, C. et al., 2016). L'expression seule ou conjointe de *MEIOB* et *SPATA22* a aussi été décrite et détaillée dans 19 types différents de cellules tumorales (Wang, C. et al., 2016).

Au vu du rôle de *MEIOB* et *SPATA22* dans la réparation des CDB en méiose, leur expression ectopique dans les cancers pourrait influencer le comportement de ces cellules. Deux études portent sur l'expression de *MEIOB* et de son influence dans des lignées cellulaires cancéreuses et mettent en évidence de potentielles fonctionnalités de cette expression aberrante de *MEIOB* dans les cancers (Shiohama et al., 2014; Wang, C. et al., 2016). Notamment, la surexpression de *MEIOB* augmente la viabilité cellulaire et accroît le phénotype tumoral de ces cellules de lignées cancéreuses de poumons (migration, invasion et capacité à former des colonies), et inversement lorsque *MEIOB* est déplétée (Wang, C. et al., 2016). De plus, cette expression ectopique de *MEIOB* semble influencer sur la progression du cycle cellulaire en augmentant le nombre de cellules en phase post-mitotique G2 (Wang, C. et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'expression ectopique de *MEIOB* modifierait le comportement de ces cellules notamment leur prolifération/survie et favoriserait des processus caractéristiques des cellules tumorales. En revanche, l'influence de l'expression ectopique de *SPATA22* seule ou de l'expression conjointe de *MEIOB* et *SPATA22* n'a pas été étudiée sur le comportement des cellules cancéreuses, en particulier sur la prolifération et la réparation des dommages de l'ADN.

2) MEIOB et SPATA22 dans les cancers: dérégulation des fonctionnalités de RPA ?

Le fait que (1) MEIOB et SPATA22 semblent collaborer avec RPA dans la réparation de l'ADN en méiose et (2) qu'elles sont recrutées ensemble aux dommages de l'ADN lorsqu'elles sont surexprimées suggèrent que MEIOB et SPATA22 pourraient aussi collaborer et/ou influencer les fonctionnalités de RPA dans les cellules cancéreuses exprimant conjointement MEIOB et SPATA22. L'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 dans les cancers pourrait induire la présence de partenaires de RPA capables de modifier/perturber les interactions (protéiques et/ou ADN) de RPA et donc les fonctionnalités du complexe RPA. MEIOB et SPATA22 pourraient déréguler le métabolisme de RPA ; et ainsi influencer les rôles de RPA, notamment en prolifération et/ou réparation des dommages de l'ADN et donc impacter la survie cellulaire.

La présence de MEIOB et SPATA22 pourrait perturber les intermédiaires réplicatifs pris en charge par RPA et inhiber la capacité proliférative des cellules (toxicité) ou bien aider RPA et favoriser la prolifération des cellules cancéreuses (prolifération clonale). Les cellules pourraient acquérir une tolérance à la présence de MEIOB et SPATA22 et adapter leur comportement. De façon similaire, la présence de MEIOB et SPATA22 pourrait modifier/perturber les intermédiaires pris en charge par RPA lors de la réparation des dommages à l'ADN. Ces dérégulations pourraient notamment induire la modification de la balance entre les voies de réparation (NHEJ/RH), la modification des produits de réparation et des capacités de réponse aux différents stress de l'ADN (réplicatifs et dommages à l'ADN).

L'ensemble des modifications du métabolisme de RPA induites potentiellement par la présence de MEIOB et SPATA22 participerait à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses et pourrait influencer la sensibilisation des cellules aux agents génotoxiques. MEIOB et SPATA22 apporteraient donc des spécificités aux cellules cancéreuses permettant d'adapter le traitement anti-cancéreux des patients présentant ce type de cancer.

Objectifs de thèse

Ces travaux de thèse ont eu pour but de spécifier les rôles de MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique afin de mieux comprendre comment ils participent à la spécialisation de la recombinaison méiotique. Ces travaux ont aussi portés sur la caractérisation de l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 et la détermination de l'influence potentielle de cette expression sur le comportement des cellules.

Résultats

Résultats

La découverte et la caractérisation de nouveaux facteurs spécifiques de la méiose essentiels à la recombinaison méiotique chez les mammifères permettent une meilleure compréhension de ce mécanisme. Au cours de ma thèse, j'ai cherché en particulier à comprendre comment MEIOB et SPATA22, deux facteurs spécifiques de la méiose, participent à la spécialisation de la RH en méiose. En plus de leur expression spécifique dans les cellules germinales, de nombreux gènes méiotiques sont exprimés dans certains cancers et appelés gènes Cancer Testis Antigens, dont font partie *MEIOB* et *SPATA22*. J'ai cherché à mieux comprendre comment cette expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* pourraient influencer le processus cancéreux de ces cellules.

- Les fonctionnalités de *MEIOB* et *SPATA22* en recombinaison méiotique :

Nous avons cherché à étayer les différentes fonctionnalités du complexe MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique en combinant des approches *in vivo* et *in vitro*. Notamment nous avons cherché à déterminer (1) comment le complexe MEIOB-SPATA22 agit en collaboration avec le complexe ubiquitaire et essentiel qu'est RPA au cours de la recombinaison méiotique et (2) comment MEIOB, SPATA22 et RPA interagissent.

Le premier article présenté dans cette thèse porte sur la caractérisation du phénotype d'un nouveau mutant ponctuel de *Spata22* chez la souris généré par le laboratoire du Dr Keeney et dont la mutation est localisée en région N-terminale de SPATA22. La fonctionnalité de la région N-terminale est mal connue. L'étude de ce nouveau mutant ponctuel en collaboration avec l'équipe du Dr Keeney avait pour but de préciser le rôle de cette région N-terminale de SPATA22 et de caractériser son importance en RH méiotique. La localisation et la nature de la mutation laissaient supposer que nous avions affaire à une mutation non-sens. Or, l'étude des transcrits produits par le gène muté a révélé que la mutation affectait l'épissage aboutissant à un mutant nul. Bien que le phénotype de nos mutants soit similaire à celui des souris nulles *Spata22*^{-/-} ou *Meiob*^{-/-}, nous avons confirmé l'importance *in vivo* de la présence de MEIOB et SPATA22 dans la progression correcte de la RH méiotique. Cette étude a aussi permis d'étayer les rôles potentiels de MEIOB et SPATA22 en

recombinaison méiotique. Et, nous avons découvert l'existence de séquences régulatrices de l'épissage, appelées ESE (Exonic Splicing Enhancer), dans un gène de méiose chez la souris.

Le deuxième article porte sur la caractérisation structurale de MEIOB et SPATA22, la détermination des modalités d'interaction entre MEIOB, SPATA22 et RPA et de la fonctionnalité de ces interactions. Cet article porte sur les travaux de thèse menés par le Dr Ribeiro et j'ai participé à la finalisation de celui-ci. Nous avons mis en évidence des similitudes structurales de MEIOB et SPATA22 avec les sous-unités RPA1 et RPA2, respectivement, du complexe RPA. En se basant sur ces similitudes, nous avons démontré que MEIOB et SPATA22 interagissent via leurs domaines C-terminaux et que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec le complexe RPA. Cette étude a permis de proposer une structure du complexe MEIOB-SPATA22 et des fonctionnalités de ce complexe en recombinaison méiotique.

Le troisième article porte sur l'étude fonctionnelle d'une mutation ponctuelle de *MEIOB* retrouvée chez deux sœurs atteintes d'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) issues d'une famille consanguine. Cette mutation induit un épissage alternatif du transcrit de *MEIOB* aboutissant à la délétion de la majorité du domaine C-terminale de MEIOB. Nous avons participé à cette étude en collaboration avec le laboratoire du Dr Veitia et avons démontré que cette forme tronquée de MEIOB n'est plus capable d'interagir avec son partenaire SPATA22. Cette étude a mis en évidence l'importance *in vivo* de l'interaction entre MEIOB et SPATA22.

L'ensemble de ces études ont contribué à proposer différents rôles du complexe MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique.

- *Les fonctionnalités potentielles de MEIOB et SPATA22 dans certains cancers :*

Nous avons cherché à mieux comprendre les fonctionnalités potentielles de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans certains cancers. Notamment, j'ai caractérisé cette expression ectopique par des approches *in silico* et j'ai initié l'étude de l'influence de cette expression ectopique sur le comportement des cellules cancéreuses.

Pour cela, j'ai analysé l'expression des transcrits *MEIOB* et *SPATA22* à partir des données de séquençages transcriptomiques accessibles en ligne provenant de différents tissus tumoraux issus de patients et des lignées cancéreuses. J'ai mis en évidence que *MEIOB* et *SPATA22* ont une expression préférentielle mutuellement exclusive mais que certaines tumeurs les expriment conjointement. Nous avons aussi montré que la surexpression de *MEIOB* et *SPATA22* semble modifier le comportement prolifératif des cellules. Ces résultats constituent des données préliminaires et nécessitent d'être approfondies.

J'ai développé des constructions plasmidiques nécessaires à l'établissement d'une lignée stable inductible pour l'expression de *MEIOB* et *SPATA22*. Cette lignée stable permettra d'approfondir l'étude de l'influence de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* sur le comportement des cellules cancéreuses. Notamment, elle permettra d'évaluer l'impact de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* sur les capacités prolifératives, les capacités de réparation de l'ADN et l'instabilité génétique dans ces cellules.

Ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* pourrait influencer la dynamique des cellules cancéreuses.

Article 1: *shani* mutation in mouse affects splicing of *Spata22* and leads to impaired meiotic recombination

Chromosoma (2020) 129:161–179
<https://doi.org/10.1007/s00412-020-00735-8>



shani mutation in mouse affects splicing of *Spata22* and leads to impaired meiotic recombination

Cynthia Petrillo¹ · Vilma Barroca² · Jonathan Ribeiro¹ · Nathalie Lailier³ · Gabriel Livera¹ · Scott Keeney^{4,5} · Emmanuelle Martini¹ · Devanshi Jain⁴

Received: 6 February 2020 / Revised: 14 April 2020 / Accepted: 26 April 2020 / Published online: 10 May 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Recombination is crucial for chromosome pairing and segregation during meiosis. SPATA22, along with its direct binding partner and functional collaborator, MEIOB, is essential for the proper repair of double-strand breaks (DSBs) during meiotic recombination. Here, we describe a novel point-mutated allele (*shani*) of mouse *Spata22* that we isolated in a forward genetic screen. *shani* mutant mice phenocopy *Spata22*-null and *Meiob*-null mice: mutant cells appear to form DSBs and initiate meiotic recombination, but are unable to complete DSB repair, leading to meiotic prophase arrest, apoptosis and sterility. *shani* mutants show precocious loss of DMC1 foci and improper accumulation of BLM-positive recombination foci, reinforcing the requirement of SPATA22-MEIOB for the proper progression of meiotic recombination events. The *shani* mutation lies within a *Spata22* coding exon and molecular characterization shows that it leads to incorrect splicing of the *Spata22* mRNA, ultimately resulting in no detectable SPATA22 protein. We propose that the *shani* mutation alters an exonic splicing enhancer element (ESE) within the *Spata22* transcript. The affected DNA nucleotide is conserved in most tetrapods examined, suggesting that the splicing regulation we describe here may be a conserved feature of *Spata22* regulation.

Keywords Meiosis · Gametogenesis · Meiotic recombination · Splicing · MEIOB

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00412-020-00735-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Emmanuelle Martini
emmanuelle.martini@cea.fr

✉ Devanshi Jain
jaind@mskcc.org

- ¹ Laboratory of Development of the Gonads, UMRE008 Genetic Stability Stem cells and Radiations, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA, 92265 Fontenay aux Roses, France
- ² UMRE008 Genetic Stability Stem cells and Radiations, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA, Insem, U1274, 92265 Fontenay-aux-Roses, France
- ³ Integrated Genomics Operation, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA
- ⁴ Molecular Biology Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA
- ⁵ Howard Hughes Medical Institute, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY 10065, USA

Introduction

Gamete formation during sexual reproduction occurs by a specialized cell division program called meiosis, where two rounds of chromosome segregation follow one round of DNA replication; homologous chromosomes segregate in the first round and sister chromatids separate in the second. The meiotic cell division program contains an extended prophase, during which replicated homologous chromosomes pair and recombine. This creates temporary connections called crossovers that are essential to stabilize homologs on the metaphase spindle during segregation (Page and Hawley 2003; Hunter 2015). Errors in these events can cause gametogenic failure and infertility or can produce aneuploid gametes that in turn result in miscarriage and developmental defects (Hassold and Hunt 2001; Sasaki et al. 2010).

Meiotic recombination initiates with the formation of programmed DSBs that are resected to yield single-strand DNA (ssDNA) overhangs. Then, DMC1, the meiosis-specific strand-exchange protein, along with its ubiquitously expressed paralog, RAD51, assembles onto ssDNA to form nucleoprotein filaments that conduct homology search and

strand invasion. The resulting recombination intermediates are repaired by multiple pathways to ultimately give either non-crossover products or crossovers (Baudat et al. 2013; Hunter 2015). Recombination intermediates and their repair pathways are closely regulated to guarantee the formation of at least one crossover per homolog pair (Hunter 2015; Zickler and Kleckner 2015). While we have a broad-strokes picture of the factors involved and their contributions to meiotic recombination, mechanistic detail of their individual molecular functions and their cross-talk is lacking. We also lack clear understanding of how meiosis-specific proteins collaborate with ubiquitous repair proteins to specialize homologous recombination during meiosis. Moreover, it is unclear whether the catalog of relevant vertebrate proteins important for meiotic recombination is complete.

To explore the mechanisms underlying the regulation of meiotic recombination and to identify novel mouse meiotic mutants, we performed a phenotype-based, random chemical mutagenesis screen. Two hits we previously described are *rahu*, that was defective for a rodent-specific DNA methyltransferase paralog DNMT3C (Jain et al. 2017), and *ketu*, which was defective for the conserved RNA helicase YTHDC2 (Jain et al. 2018). Here, we describe a new mutant that we named *shani*, for “*Spata22*-affected with hypogonadic testes and infertility.” *Shani*, *Ketu*, and *Rahu* are harbingers of misfortune in Vedic mythology.

shani is a missense mutation in *Spata22*, which encodes a protein that is essential for meiotic recombination (La Salle et al. 2012; Ishishita et al. 2013). The *shani* mutation is expected to alter an amino acid, but surprisingly it causes exon skipping, eventually leading to lack of detectable SPATA22 protein. SPATA22 and its functional collaborator, MEIOB, form a meiosis-specific complex and they resemble subunits of RPA, the ubiquitous ssDNA-binding complex that regulates ssDNA during replication, repair and recombination (Wold 1997; Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014; Ribeiro et al. 2016; Xu et al. 2017; Ribeiro et al. 2018). SPATA22-MEIOB colocalize on meiotic chromosomes with RPA subunits and their null mutants accumulate unrepaired DSBs, suggesting that they perform a critical function(s) during meiotic recombination (La Salle et al. 2012; Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014; Hays et al. 2017). Also, mutations in this complex have been linked to human infertility (Gershoni et al. 2017; Caburet et al. 2019; Gershoni et al. 2019).

Spata22^{*shani/shani*} homozygote mice are both female- and male-sterile. We show that *Spata22*^{*shani/shani*} mutant spermatocytes have defective chromosome synapsis and fail to complete DSB repair during meiotic prophase, like *Spata22*-null mice (Hays et al. 2017). Our results validate previous findings as well as further our understanding of the meiotic role of SPATA22 in mice. Importantly, we have isolated a novel allele of *Spata22* that reveals unexpected post-transcriptional

regulation and may provide insight into how gene expression is regulated more generally during meiosis.

Results

Isolation of the novel meiotic mutant *shani* from a forward genetic screen

To isolate mutants with defects in meiosis, we carried out a phenotype based, random mutagenesis screen in mice (Jain et al. 2017; Jain et al. 2018). We mutagenized male mice with the alkylating agent *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) that predominantly creates single base substitutions. Then we followed a three-generation breeding scheme to recover recessive mutations causing meiotic defects (Caspary 2010; Probst and Justice 2010; Jain et al. 2017; Jain et al. 2018) (Fig. 1a).

We screened third-generation (G3) male offspring for meiotic defects by measuring testes weights. In adult wild-type mice, normal spermatogenesis results in testes populated with spermatogenic cell types spanning all stages of spermatocyte development. Mice with meiotic defects, such as failure to initiate or complete meiotic recombination, display spermatogenic arrest with apoptotic elimination of spermatocytes, resulting in a reduction in testes size or hypogonadism (de Rooij and de Boer 2003). To control for low testes weight due to poor growth and reduction in overall body size, we also measured the body weight and analyzed data as testes-to-body-weight ratios.

In an F1 founder line we named *shani*, four of the G3 males screened (Fig. 1b) showed a 69.6% reduction in testes-to-body-weight ratio compared to littermates (mean ratios were 0.21% for *shani* mutants and 0.69% for wild-type and heterozygous animals; $p < 0.01$, one-sided *t* test; Fig. 1c).

shani maps to a missense mutation in the *Spata22* gene

To identify the causative mutation, we generated additional mutant animals and performed whole-exome sequencing of DNA from five G3 *shani* mutants. Then, we searched for homozygous variants that were shared between all five mutants (Fig. 2a). This revealed three un-annotated DNA sequence variants (Fig. 2a). Two variants were located within introns lacking sequencing read coverage in ENCODE long RNA-sequencing data from adult wild-type testis, making these unlikely phenotype-causing mutations. The third was an exonic variant located in the predicted *Spata22* coding sequence and was spanned by testis transcripts (Fig. 2a, b).

The *Spata22* variant is an A to G nucleotide transition at position Chr11:73336037, resulting in a missense mutation (glutamic acid to glycine) in exon 4 (Fig. 2b, c). *Spata22* RNA is expressed predominantly in the adult testis (Fig. 2d)

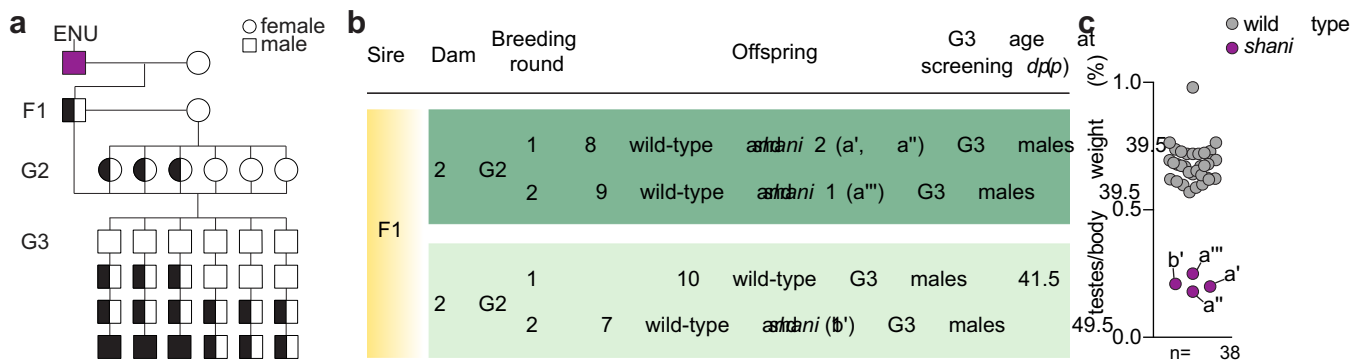


Fig. 1 Mice from the ENU-induced mutant line *shani* have meiotic defects. **a** Breeding scheme. Male mice (C57BL/6J strain) were mutagenized and crossed to wild-type females (FVB/NJ strain) to produce founder (F1) males that were potential mutation carriers. Each F1 male was then crossed to wild-type females (FVB/NJ strain) to generate second generation (G2) offspring and G2 daughters were crossed back to their F1 sire to generate third-generation (G3) offspring. G3 males were screened for meiotic defects. If an F1 male was a carrier of a single autosomal recessive mutation of interest, roughly half of his G2 daughters were expected to be carriers and roughly one eighth of G3 males were

expected to be homozygous. Un-filled shapes represent animals that are wild type for a mutation of interest, half-filled shapes are heterozygous carriers, and filled shapes are homozygotes. **b** Screen results for the *shani* line. The F1 male was harem-bred to four G2 females, yielding 38 G3 males that displayed either a wild-type or *shani* phenotype (a, a', a'', a''', b). Due to the harem-breeding setup we were unable to determine the proportion of G3 animals birthed from any given G2 female. **c** Testes-to-body-weight ratios for G3 mice screened (listed in b). Total number of G3 mice screened (n) is indicated and *shani* mutants (a, a', a'', a''', b) are annotated

and *Spata22*-null mice display meiotic defects with hypogonadism (Hays et al. 2017). This led us to surmise that this ENU-induced point mutation disrupts *Spata22* function and is the cause of the *shani* mutant phenotype.

To characterize the *shani* mutation, we examined conservation of *Spata22*. The mouse *Spata22* transcript encodes a protein of 358 amino acids and 40.17 kDa (presented schematically in Fig. 2e). Searches in protein databases revealed that placental mammals possess a similar SPATA22 protein: 358 to 364 amino acids in length with two well-conserved domains, a short motif located near the N-terminus and a longer region located near the C-terminus (yellow boxes in Fig. 2e). These domains were present in SPATA22 homologs from all vertebrates examined and were separated by a less conserved region of ~190 amino acids. Using these domains to search, SPATA22 homologs were retrieved in invertebrates such as echinoderms, cnidarians and molluscs (Fig. 2e, Table S1). In several distant animals, e.g., arthropods (Arthropoda) and sponges (Porifera), a likely homolog restricted to the C-terminal domain could be retrieved but with substantial divergence from other homologs (Table S1). The conserved C-terminal domain corresponds to the region in mouse that is required for interaction with MEIOB, the functional collaborator and direct binding partner of SPATA22 (Xu et al. 2017; Ribeiro et al. 2018), suggesting that the SPATA22-MEIOB interaction is likely a conserved property of SPATA22.

The *shani* mutation lies outside of the two widely conserved SPATA22 protein domains (Fig. 2e). The mutation-containing region is poorly conserved in vertebrates (Fig. 2e) but shows higher conservation among tetrapods, particularly within mammals (Fig. 2f). We observed that this region is also well conserved at the nucleotide sequence level (Fig.

2f). Moreover, the mutated adenine is invariant in most mammalian genomes examined (except in rat), as well as in sauropsids and amphibians (Fig. 2f).

Spata22^{shani/shani} mutants are sterile due to gametogenic failure

Spata22-null animals display a meiotic recombination defect, leading to meiotic prophase arrest and infertility (Hays et al. 2017), so we evaluated these phenotypes in mice carrying the *Spata22^{shani}* allele. Heterozygotes had normal fertility and transmitted the *shani* mutation in a Mendelian ratio (21.4% *Spata22^{+/+}*, 49.7% *Spata22^{shani/+}* and 28.7% *Spata22^{shani/shani}* from heterozygote × heterozygote crosses; $n = 219$ mice; $p = 0.31$, chi-squared test). *Spata22^{shani/shani}* animals did not display obvious somatic defects. However, homozygous mutant males and females were sterile: none of the three *Spata22^{shani/shani}* males tested sired progeny when bred with wild-type females for 13–17 weeks, and no pregnancies were observed from crosses of three homozygous mutant females to wild-type males (bred for 17 weeks).

In histological sections of adult testes, seminiferous tubules from control animals had the full array of spermatogenic cells, including spermatocytes and spermatids, as expected (Fig. 3a). In contrast, tubules from *Spata22^{shani/shani}* were greatly reduced in diameter and contained only early spermatogenic cells, with no post-meiotic germ cells visible (Fig. 3a). Mutants contained abnormal tubule types: some tubules (“Em” in Fig. 3a) had only a single layer of Sertoli cells and presumptive spermatogonia along the tubule perimeter; and some also had spermatogenic cells that appeared apoptotic (“Apo” in Fig. 3a). Increased apoptosis was

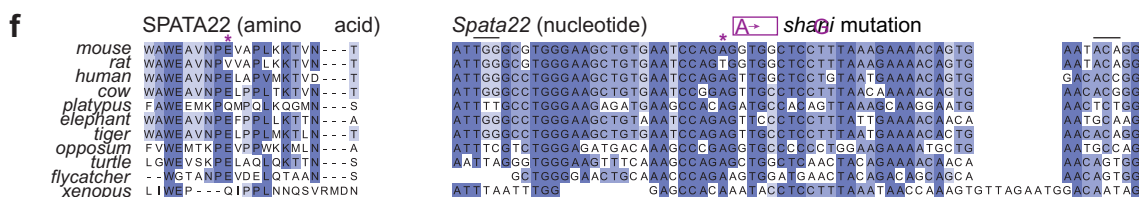
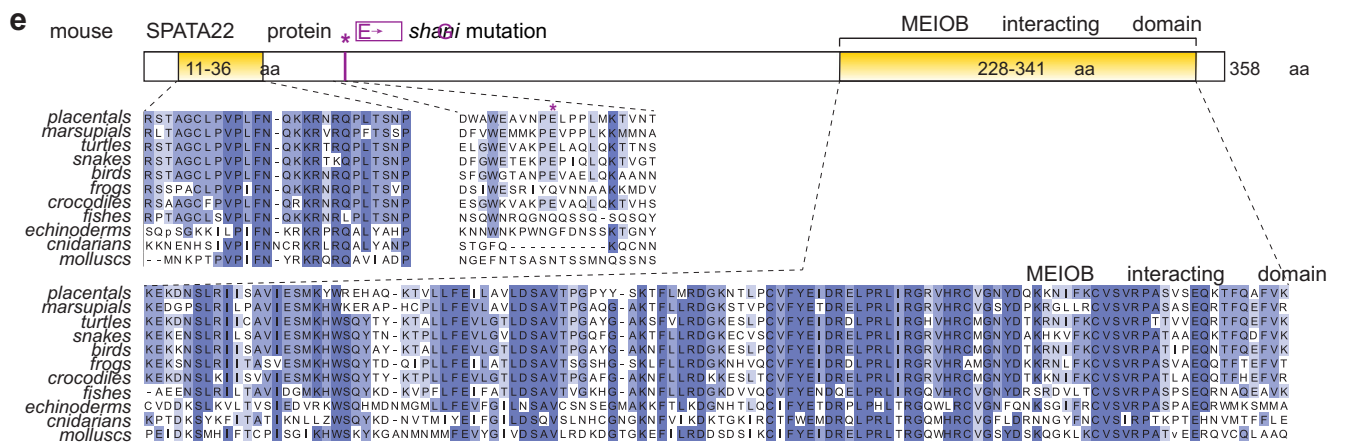
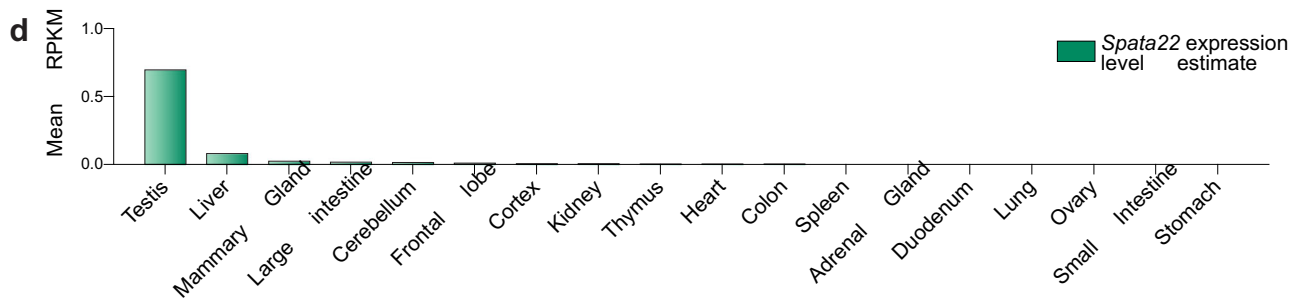
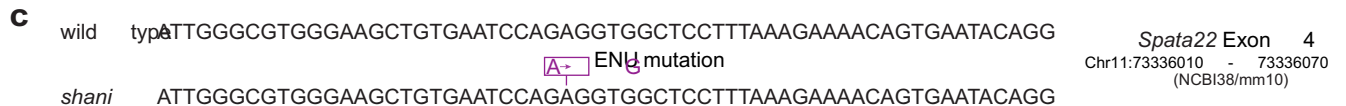
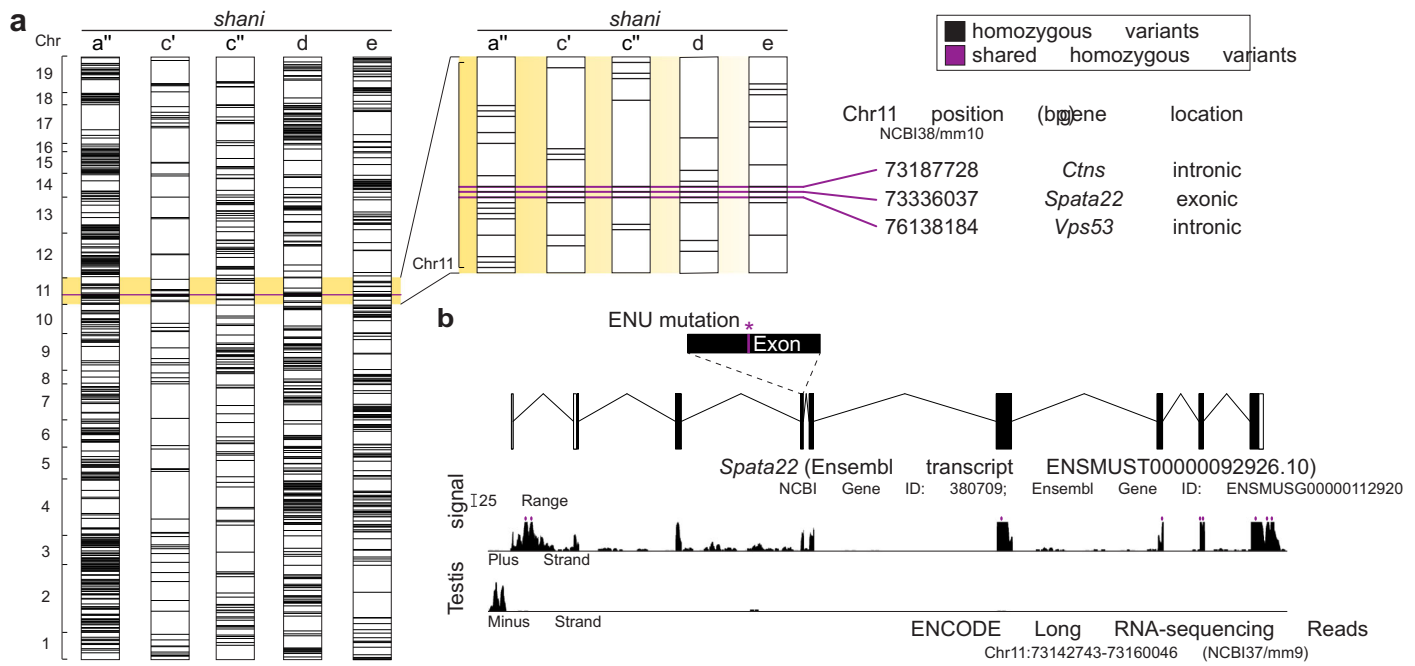


Fig. 2 *shani* mice harbor a point mutation in *Spata22*. **a** Autosomal homozygous variants identified by whole-exome sequencing in five G3 *shani* mutants (a from Fig. 1b and c, c, d, e additional mutants generated using the same breeding strategy). Variants depicted exclude known between-strain SNPs. Vertical axis reflects variant index and chromosomes are not to scale. A detailed view of Chr11 variants is shown on the right. Three homozygous variants that are shared between mutants are highlighted in fuchsia with positions, gene names and genic locations listed. **b** Top: Schematic of *Spata22* (as predicted by Ensembl release 94) with protein-coding regions depicted as filled boxes. Location of the ENU-induced lesion is shown. Bottom: The density of ENCODE long RNA-sequencing reads (release 3) from adult testis within a window spanning from 500 bp upstream to 500 bp downstream of *Spata22*. The vertical viewing range is 0–50; read densities exceeding this range are overlaid in fuchsia. **c** The *shani* allele of *Spata22*. **d** *Spata22* transcript expression level estimate (mean of reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) values provided by ENCODE) in adult tissues. **e** Top: Schematic of mouse SPATA22 showing locations of conserved domains (yellow boxes) and the *shani* mutation. Bottom: Clustal Omega alignment of SPATA22 consensus amino acid sequences. Each line is a consensus sequence for the group and was derived using at least four species per group. Groups used are: placentals (Eutheria), marsupials (Metatheria), turtles (Testudines), snakes (Serpentes), birds (Aves), frogs (Anura), crocodiles (Crocodylia), fishes (Actinopterygii), echinoderms (Echinodermata), cnidarians (Cnidaria), molluscs (Mollusca). **f** Clustal Omega alignment of SPATA22 amino acid and *Spata22* nucleotide sequences from tetrapods corresponding to exon 4 of mouse *Spata22*. Nucleotide sequences encoding the first and last amino acids listed for all species except flycatcher are overlaid in black. Location of the *shani* mutation is indicated. Species used are: mouse (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*), human (*Homo sapiens*), cow (*Bos taurus*), platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), elephant (*Loxodonta Africana*), tiger (*Panthera tigris altaica*), opossum (*Monodelphis domestica*), turtle (*Pelodiscus sinensis*), flycatcher (*Ficedula albicollis*), xenopus (*Xenopus tropicalis*). Amino acid and nucleotide residues are shaded to reflect degree of conservation

confirmed by elevated TUNEL staining in mutants (Fig. 3b, c). These patterns are consistent with spermatocyte arrest and apoptosis during pachytene stage of meiotic prophase, occurring possibly at stage IV of the seminiferous epithelial cycle, which is typical of mutants with meiotic recombination defects (for example *Dmcl1*^{-/-} (Barchi et al. 2005)) and is also observed in *Spata22*-null males (Hays et al. 2017).

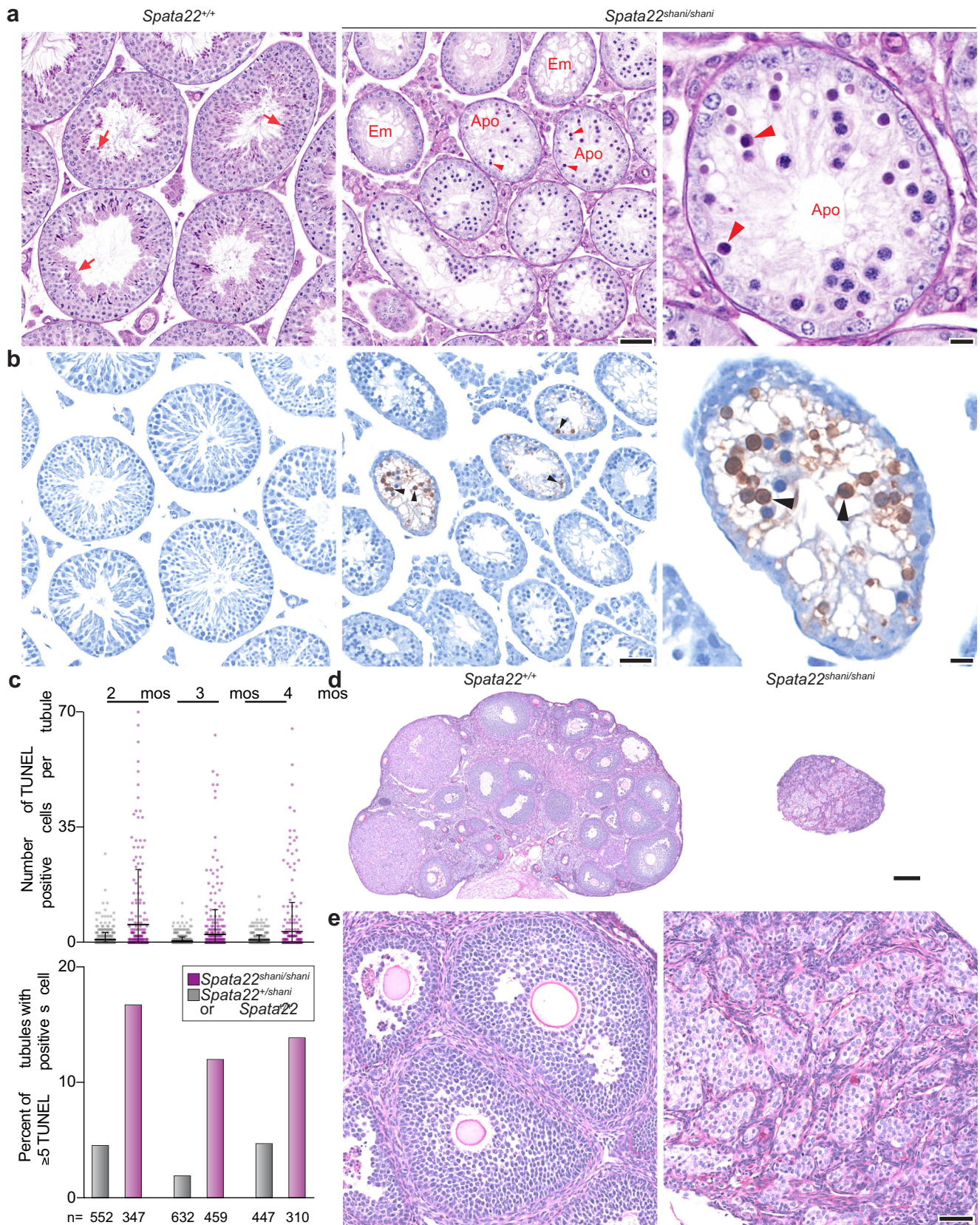
Defects in meiotic recombination in females cause elevated oocyte loss (Hunter 2017) and *Spata22*-null adult females have shrunken ovaries lacking oocytes (Hays et al. 2017). Meiotic recombination in females initiates during fetal development and arrests soon after birth, at which time oocytes mature into follicles that further develop during the reproductive life of the female (Peters 1969; Hunter 2017). As expected, adult wild-type ovaries had abundant developing follicles. In contrast, ovaries from adult *Spata22*^{*shani/shani*} females were dramatically smaller compared to wild-type littermates, and no developing follicles were visible (Fig. 3d, e), like in *Spata22*-null and consistent with the observed infertility.

Spata22^{*shani/shani*} spermatocytes are defective in meiotic DSB repair and chromosome synapsis

Our initial findings showed that *Spata22*^{*shani/shani*} have spermatocyte arrest, apoptosis, and infertility phenotypes similar to that observed in *Spata22*-null animals (Hays et al. 2017). We next examined meiotic recombination events, specifically DSB formation, repair and chromosome synapsis. We immunostained chromosome spreads of spermatocytes for SYCP3, a component of the chromosome axes (Lammers et al. 1994; Zickler and Kleckner 2015), and for γ -H2AX, a phosphorylated form of histone variant H2AX that is generated in response to DSBs (Mahadevaiah et al. 2001) (Fig. 4a). In normal meiosis, sister chromatids begin to form a SYCP3-containing protein axis from which chromatin loops emanate during the leptotene stage of meiotic prophase. During the zygotene stage, axes elongate and homologous chromosome axes begin to align and form stretches of the synaptonemal complex (SC), a tripartite structure comprising the homologous axial elements and the central region connecting them. The SC elongates and connects homologous chromosomes along their lengths in the pachytene stage. The SC disassembles during the diplotene stage (Fig. 4a). DSB formation occurs primarily during leptotene and zygonema, yielding nucleus-wide γ -H2AX staining. The γ -H2AX staining disappears progressively as recombination proceeds and is largely gone from autosomes during pachynema. γ -H2AX is also present on the X and Y chromosomes in the sex body during pachynema and diplonema (Fig. 4a).

Spata22^{*shani/shani*} spermatocytes with SYCP3 staining patterns indicative of leptotene and mid zygonema had pan-nuclear γ -H2AX staining, which is consistent with these cells having initiated meiotic recombination via formation of DSBs (Fig. 4a). *Spata22*^{*shani/shani*} spermatocytes with SYCP3 staining patterns indicative of later stages appeared abnormal, however. Cells with staining showing elongated axes that have begun to align (late zygonema-like) were abundant and retained pan-nuclear γ -H2AX staining (Fig. 4a). There were also rare cells where few homologous chromosomes appeared to be connected along their entire lengths (pachynema-like) (Fig. 4a).

We also tracked synapsis by co-immunostaining for SYCP3 and SYCP1, a SC central region protein (de Vries et al. 2005; Zickler and Kleckner 2015). In wild type, SYCP1 staining appears during zygonema as cells begin to build the SC, it marks autosomes along their lengths during pachynema when the SC connects homologous chromosomes and is largely absent from the autosomes in diplonema when the SC is disassembled (Fig. 4b). In *Spata22*^{*shani/shani*} littermates, leptotene and mid zygonema appeared normal. But later-stage spermatocytes (late zygonema-like and pachynema-like) had SYCP1 patterns indicative of synapsis defects: numerous *Spata22*^{*shani/shani*} spermatocytes possessed



a mix of partially synapsed, fully synapsed and asynaptic chromosomes, along with chromosome tangles (i.e., a mix

of synapsed and unsynapsed axes with partner switches indicative of nonhomologous synapsis; Fig. 4b). These

Fig. 3 *shani* allele of *Spata22* leads to gametogenic failure. **a** Periodic acid-Schiff (PAS)-stained sections of Bouin s-fixed testes from a 3-month-old *Spata22^{shani/shani}* male and a wild-type littermate. Arrows indicate post-meiotic germ cells (spermatids) and arrowheads point to spermatocytes with an apoptotic morphology (condensed and/or fragmented). In the mutant, examples are indicated of apoptotic (“Apo”) tubules containing cells with apoptotic morphology and emptier-looking (“Em”) tubules harboring only cells with spermatogonia-like morphology and Sertoli cells. **b** TUNEL assay on testis sections from mice shown in **a**. Black arrowheads point to TUNEL-positive cells (stained dark brown). **c** Quantification of TUNEL assays performed on testis sections of *Spata22^{shani/shani}* mutants aged 2–4 months (mos) and their wild-type or heterozygous littermates. The number of seminiferous tubules counted from each animal is indicated (n) and lines in the dot plot depict mean \pm SD. **d, e** Paraformaldehyde (PFA)-fixed, PAS-stained ovary sections from a 2-month-old *Spata22^{shani/shani}* female and a wild-type littermate. In **a** and **b**, the scale bars represent 50 μ m and 10 μ m in the lower and higher magnification images, respectively. In **d** and **e**, they represent 200 μ m and 50 μ m, respectively

patterns are typical of recombination- and synapsis-defective mutants such as *Dmc1*^{-/-} (Pittman et al. 1998; Yoshida et al. 1998), and are comparable to that observed in *Spata22*-null spermatocytes (Hays et al. 2017). We conclude that *Spata22^{shani/shani}* spermatocytes have a defect in meiotic DSB repair and chromosome synapsis, leading to meiotic prophase arrest and apoptosis. This culminates in the absence of postmeiotic cells, hypogonadism and sterility.

Recombination dynamics in *Spata22^{shani/shani}* mutants

To evaluate the molecular characteristics of the *Spata22^{shani/shani}* cells with a meiotic recombination defect, we examined behaviors of recombination proteins by immunostaining spread spermatocyte chromosomes. SYCP3 staining patterns were used to define meiotic prophase stages, and only recombination protein foci overlapping with SYCP3-positive axes were counted. We first analyzed DMC1 strand-exchange protein that assembles on ssDNA formed at DSBs and is required for homology search and strand invasion during meiotic recombination (Brown and Bishop 2014). In normal meiosis, DMC1 foci appear in leptotema, accumulate to maximal levels in early to mid zygotema, then decline as DSB repair proceeds through pachytoma (Fig. 5a, b). In *Spata22^{shani/shani}*, DMC1 foci accumulate during early stages but prematurely decline in mid zygotema and are severely reduced in late zygotema compared to wild type (Fig. 5a, b; mean foci count of mid zygotema and late zygotema-like *Spata22^{shani/shani}* = 96 and 27, respectively; mean foci count of mid zygotema and late zygotema wild type = 154 and 101, respectively). These findings are consistent with previous observations of DMC1 behavior in mice lacking MEIOB, the functional collaborator and direct binding partner

of SPATA22 (Souquet et al. 2013). *Spata22^{shani/shani}* DMC1 foci counts in late leptotema and early zygotema, although not statistically significant, were lower compared to wild type (Fig. 5b), suggesting that DMC1 accumulation may also be modestly affected at these stages.

We also examined RPA2, which is a subunit of the ubiquitous, trimeric ssDNA-binding complex RPA (Wold 1997). RPA is present on ssDNA-containing intermediates during DSB metabolism. In wild type, RPA2 foci form during leptotema, increase in early and mid zygotema, and then decrease as DSB repair progresses in late zygotema and early pachytoma (Fig. 5c, d). *Spata22^{shani/shani}* cells accumulate RPA2 foci during early stages and arrest during zygotema with RPA2 foci present (Fig. 5c, d). This is as observed in *Spata22*-mutant rats and *MeioB*^{-/-} mice (Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014), suggesting that arrested cells likely possess ssDNA-containing intermediates. We observed that RPA2 foci counts in mid zygotema and late zygotema were reduced compared to wild type (Fig. 5d; mean foci count of mid zygotema and late zygotema-like *Spata22^{shani/shani}* = 198 and 134, respectively; mean foci count of mid zygotema and late zygotema wild type = 242 and 205, respectively), likely due to defects in recombination intermediate processing during these stages.

We further investigated localization of the RecQ helicase family protein, Bloom syndrome mutated (BLM). BLM and its orthologs process multiple types of recombination intermediates (Singh et al. 2009; De Muys et al. 2012). BLM has been previously reported to form discrete foci on chromosome axes during wild-type meiosis (Moens et al. 2000; Holloway et al. 2010) and to accumulate in recombination-deficient mutants (Holloway et al. 2008; Holloway et al. 2010). In our hands, BLM was barely detectable in most wild-type spermatocytes, with few cells forming clear axis-associated foci that met our immunofluorescence cutoff (Fig. 5e, f). In contrast to wild type, *Spata22^{shani/shani}* had bright and numerous BLM foci on chromosome axes (Fig. 5e, f). RPA has been shown to stimulate BLM activity in vitro and to colocalize with BLM during meiosis (Walpita et al. 1999; Brosh Jr. et al. 2000); therefore, we asked if the BLM foci we see in mutants colocalized with RPA. Most BLM foci also had an RPA2 focus present (Fig. 5g). BLM foci were first detected in early zygotema and levels continued to rise as cells progressed to mid zygotema and late zygotema-like stages (mean foci count of late zygotema-like *Spata22^{shani/shani}* = 55). Our results suggest that in *Spata22^{shani/shani}*, either there is increased BLM recruitment (for example, an increase in the presence or accessibility of BLM targets) or that BLM is abnormally retained. Taken together, our results indicate a failure to repair DSBs appropriately and/or the presence of aberrant DNA structures in *Spata22^{shani/shani}*.

SPATA22 protein is not detected in *Spata22*^{shani/shani} testes

During normal meiosis, SPATA22 appears on chromosome axes as foci that match DSB dynamics: SPATA22 foci are first detectable during late leptotema, focus numbers increase progressively through zygotema, then decrease through pachynema and are no longer detected during diplonema (Fig. 6a, b) (Ishishita et al. 2014; Hays et al. 2017). SPATA22 patterns are similar to those for MEIOB, as

expected for members of a protein complex (Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013).

Since the meiotic recombination defect and spermatocyte arrest in *Spata22*^{shani/shani} phenocopied a null mutation, we asked whether SPATA22 protein was properly localized. In testis sections, SPATA22 staining was prominent in SYCP3-positive spermatocyte nuclei in wild type, but little to no staining was observed in SYCP3-positive nuclei in *Spata22*^{shani/shani} littermates (Fig. 6c). On spread spermatocyte chromosomes, whereas SPATA22 foci were visible along axes in

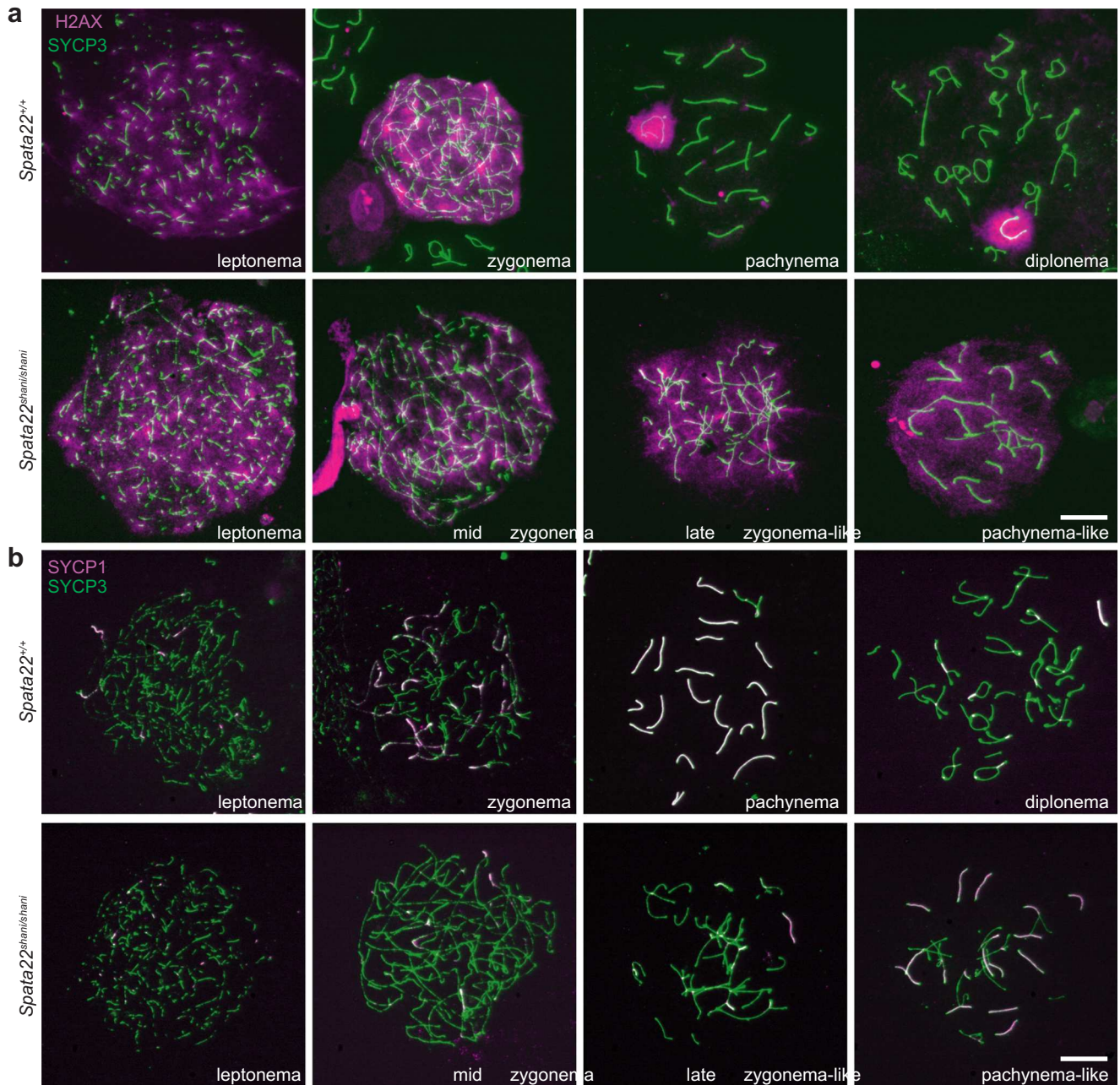


Fig. 4 Meiotic prophase progression is impaired in *Spata22*^{shani/shani}. Representative chromosome spreads from wild-type and *Spata22*^{shani/shani} spermatocyte nuclei assessing H2AX (a) and SC formation (b).

Prophase stages are indicated and mutant spermatocytes were classified based on SYCP3 patterns. Scale bars represent 10 μm

wild type, similarly staged cells from *Spata22^{shani/shani}* littermates showed only weak background staining that did not overlap with axes (Fig. 6d, left panels).

To discern whether the lack of staining in *Spata22^{shani/shani}* spermatocytes was due to protein mis-localization or lack of protein, we performed western blot analysis on whole testis lysates. Because mutants undergo spermatocyte arrest, we examined juvenile mice aged 16 dpp. At this age spermatocytes in meiotic prophase are abundant (Bellve et al. 1977), however we expected that programmed cell death had not yet significantly altered the relative sizes of germ cell subpopulations. While SPATA22 could be detected in wild type at the expected size, no bands were detected in the mutant using a polyclonal antibody (Fig. 6e). Thus, it is likely that the *shani* mutation leads to lack of protein production or to protein destabilization.

Absence of SPATA22 strongly impairs the stability of its partner, MEIOB (Luo et al. 2013; Hays et al. 2017).

Consequently, MEIOB is not detected on chromosome axes in spermatocytes from SPATA22-null mice (Luo et al. 2013; Hays et al. 2017). Similarly, we could not detect MEIOB on chromosome axes in *Spata22^{shani/shani}* spermatocytes (Fig. 6d, right panels). We conclude that the meiotic recombination defect in *Spata22^{shani/shani}* spermatocytes is a consequence of decreased SPATA22 protein levels and decreased SPATA22-MEIOB complex on chromosome axes.

The *shani* mutation leads to defective *Spata22* splicing and RNA instability

To determine how the *shani* mutation leads to decreased SPATA22 protein levels, we examined *Spata22* mRNA by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using primers directed to the 5' and 3' UTRs (primer set X; Fig. 7a, b). *Spata22^{+/+}*, *Meiob^{+/+}*, and *Meiob^{+/-}* adult testes yielded a 1239-bp band, consistent with the predicted length of wild-type *Spata22*

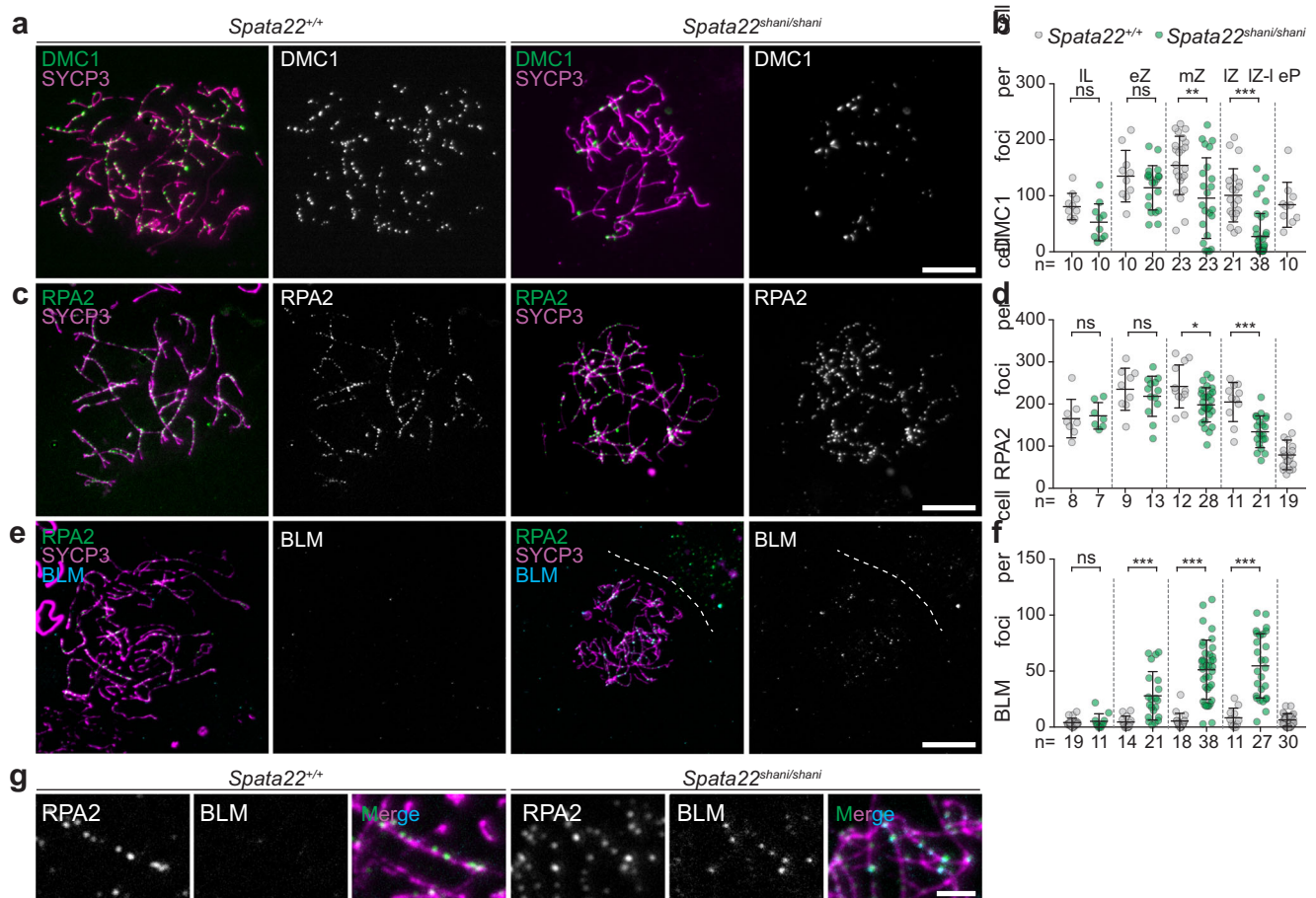


Fig. 5 *Spata22^{shani/shani}* spermatocytes show precocious DMC1 loss and abnormal BLM accumulation. **a, c, e** Immunostained chromosome spreads from wild-type and *Spata22^{shani/shani}* spermatocyte nuclei. Images of representative zygote stages are presented. **b, d, f** Quantification of DMC1, RPA2 and BLM foci. Each point is the count from one spermatocyte and number of spermatocytes analyzed is indicated (n). Lines depict mean \pm SD and the results of two-tailed Mann-

Whitney tests are shown: ns is not significant ($p > 0.05$); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Meiotic prophase stages are as follows: late leptotene (IL), early zygotene (eZ), mid zygotene (mZ), late zygotene (lZ), early pachytene (eP) and late zygotene-like (lZ-l) in mutant. Spermatocytes were classified based on SYCP3 patterns. **g** Higher magnification view of immunostaining shown in **e**. Scale bars represent 10 μ m in **a, c, e** and 2 μ m in **g**

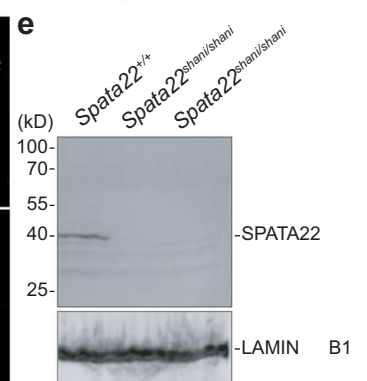
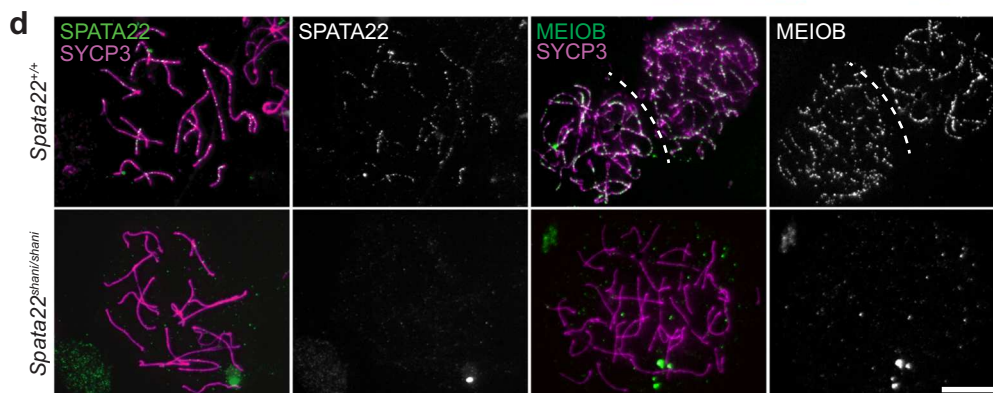
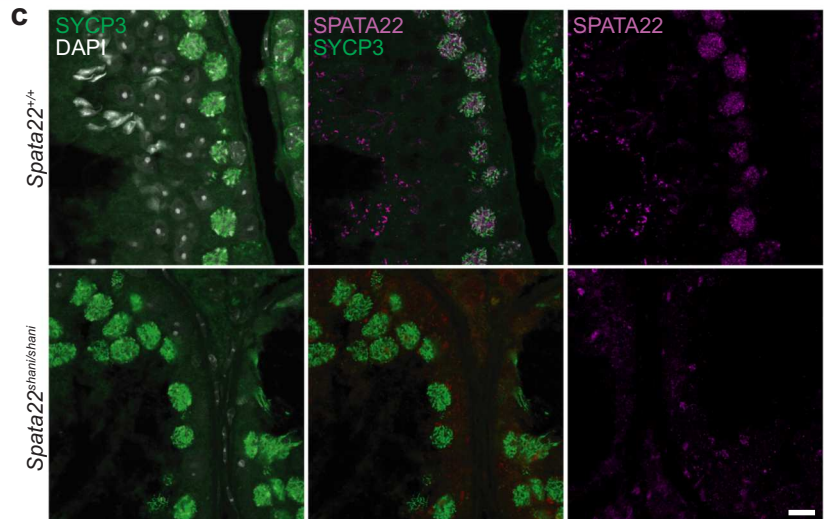
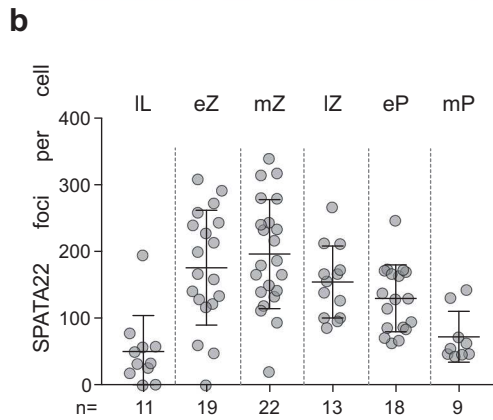
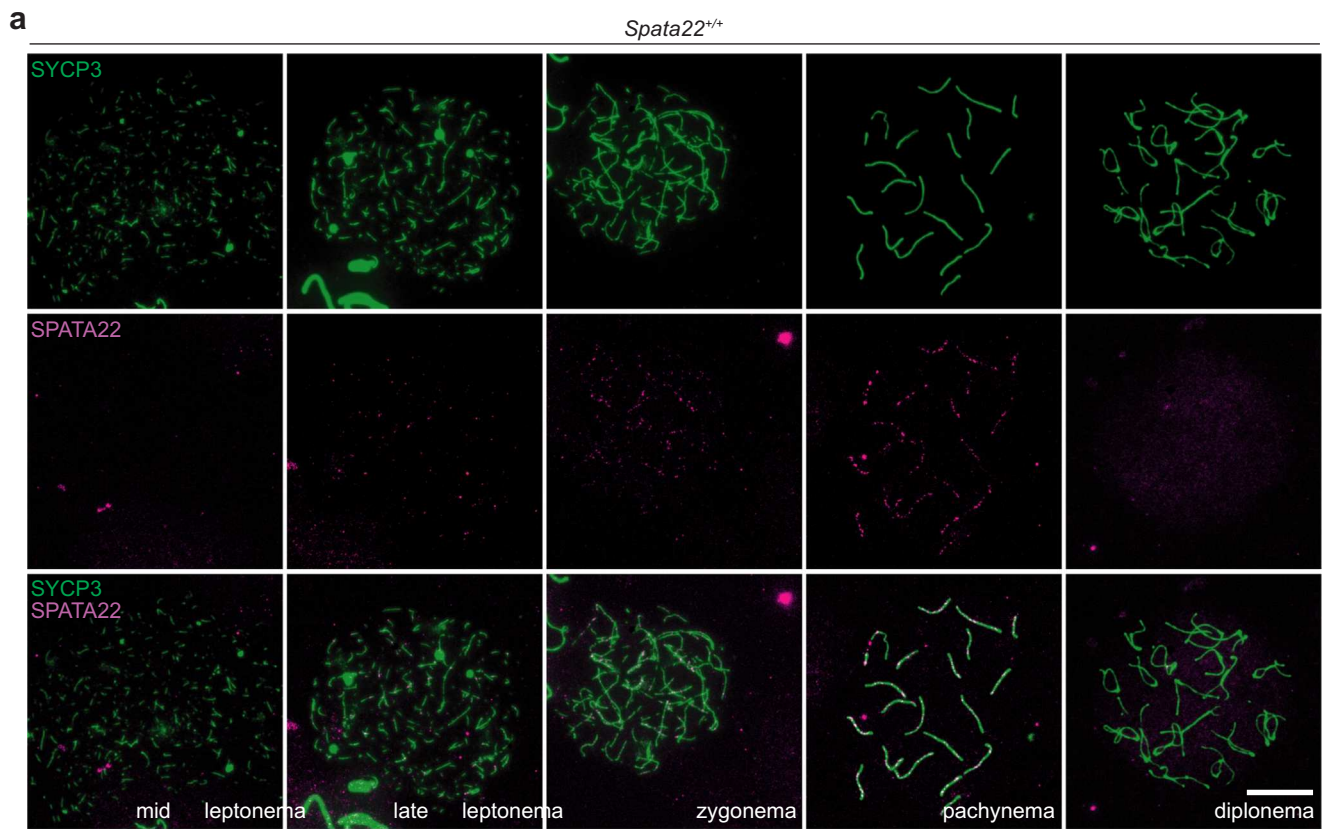


Fig. 6 SPATA22 localization and protein levels in wild-type and *Spata22^{shani/shani}* testes. **a** Representative wild-type chromosome spreads from spermatocyte nuclei. **b** Quantification of SPATA22 foci in wild type. Each point is the count from one spermatocyte and number of spermatocytes analyzed is indicated (n). Lines depict mean \pm SD. Meiotic prophase stages are abbreviated as in Fig. 5b; mid pachynema (mP). **c** SYCP3 and SPATA22 immunofluorescence on testis sections from 11-month-old *Spata22^{shani/shani}* and wild-type males. Sections containing cells with similar SYCP3 profiles are shown and DNA is stained with DAPI. **d** Defective SPATA22 and MEIOB localization in *Spata22^{shani/shani}*. Representative chromosome spreads with similar SYCP3 profiles are shown (late zygonema for *Spata22^{+/+}* and cells arrested at late zygonema-like for *Spata22^{shani/shani}*). **e** Western blot analysis of SPATA22 protein levels in whole-testis lysates from two 16-dpp *Spata22^{shani/shani}* and a wild-type littermate. Scale bars represent 10 μ m in **a**, **c**, **d**

mRNA. PCR products from *Spata22^{shani/shani}* testes were shorter, however (Fig. 7b).

We next assessed mRNA levels by quantitative RT-PCR using three primer sets spanning segments of *Spata22* (primer sets A, B, C; Fig. 7a). We examined animals at 12 dpp when *Spata22*-expressing early meiotic cells are abundant (Bellve et al. 1977) and spermatogenic arrest is not expected to have greatly affected the relative population sizes of germ cell subtypes. We also examined 12 dpp-old *Spo11^{-/-}* mice that lack DSB formation and show a similar arrest as *Spata22^{shani/shani}* (Baudat et al. 2000; Romanienko and Camerini-Otero 2000).

Spata22 mRNA regions A and C had reduced amplification in 12 dpp-old *Spata22^{shani/shani}* (relative quantities were 0.31 and 0.42, respectively; Fig. 7c) while control meiotic transcripts were normal (*Dmc1*, *Sycp3*, *Meiob* and *Vasa*; Fig. 7c), suggesting that *Spata22* mRNA level is decreased in *Spata22^{shani/shani}*. All transcripts assayed were normal in 12 dpp-old *Spo11^{-/-}* mice, confirming that the reduced amplification of *Spata22* mRNA is not due to spermatogenic arrest. Intriguingly, *Spata22* mRNA region B did not yield an amplification product in 12 dpp-old *Spata22^{shani/shani}* (Fig. 7c).

We performed Sanger sequencing on the wild-type *Spata22* cDNA and shorter variant produced in *Spata22^{shani/shani}* (Fig. 7b). cDNA sequence from wild type was as expected but cDNA from mutant testes completely lacked exon 4, with exon 3 and exon 5 spliced together to create a new exon-exon junction (Fig. 7d). This is consistent with the lack of amplification of region B (exon 3-exon 4 junction; Fig. 7a, c). Together these results suggest that the *shani* mutation leads to expression of a less stable and shorter variant of *Spata22* mRNA that lacks exon 4.

Loss of exon 4 predicts a frameshift, resulting in a stop codon within exon 5 and the formation of a truncated protein of 99 amino acids and \sim 11 kDa, with the N-terminal 57 amino acids of wild type sequence (black in Fig. 7e) and the remaining amino acids of alternative sequence (fuschia in Fig. 7e). We were unable to detect a truncated SPATA22 protein by western blot or immunolocalization in *Spata22^{shani/shani}*, but

we do not know whether our SPATA22 antibody would recognize the predicted truncation.

The *shani* mutation on exon 4, if translated, is predicted to lead to a glutamic acid to glycine substitution. While we show that the *shani* mutation acts on the transcript level, we wondered whether the glutamic acid to glycine substitution would compromise protein stability if exon 4 were to be retained on the *Spata22* transcript. To test this, we transfected human cells with either a plasmid expressing wild-type *Spata22* cDNA, or a plasmid expressing *Spata22* cDNA that harbors the *shani* mutation, or an empty plasmid as a control. Western blot analysis of SPATA22 showed a \sim 40 kDa band in wild type, as expected (Fig. 7f). Cells expressing *Spata22* cDNA with the *shani* mutation also had a \sim 40-kDa band which was similar in intensity to that in wild type (Fig. 7f), indicating that the *shani* mutation, when present on a transcript that does not need to be spliced, does not affect production or stability of the SPATA22 protein.

Discussion

This study describes a novel point-mutated allele of the meiotic recombination gene *Spata22* using a phenotype-based forward-genetics screen. *Spata22^{shani/shani}* mutant spermatocytes appear to initiate DSB formation normally during meiotic prophase, but show defects in DSB repair and synapsis, leading to spermatocyte arrest, apoptosis, shrunken gonads, and infertility. We performed molecular characterization of the *shani* mutation and show that it leads to defective splicing of the *Spata22* RNA, ultimately resulting in loss of detectable SPATA22 protein. Consistent with this, *Spata22^{shani}* and *Spata22*-null alleles have similar meiotic phenotypes (Hays et al. 2017). Our work illustrates the power of forward-genetic approaches in exploring the regulation of mammalian meiosis. Moreover, we describe a unique screen design and demonstrate its feasibility: we exploited a hallmark of meiotic recombination defects, hypogonadism, to design an efficient and simple readout based on testes weights. Also, we utilized a new mutation identification strategy that leverages recent genomic advances.

We show that SPATA22 has two well-conserved domains: an N-terminal segment and a longer region located near the C-terminus. Similar findings have been previously reported, although the precise boundary of the conserved C-terminal domain differs (La Salle et al. 2012). The N-terminus of SPATA22 has no predicted structure or known function. The conserved C-terminal region we describe here (228–341 amino acids) closely matches its predicted OB fold-containing domain (277–356 amino acids), which is essential for its interaction with MEIOB (Xu et al. 2017; Ribeiro et al. 2018). Like SPATA22, MEIOB is predicted to have OB fold-containing domains (Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013;

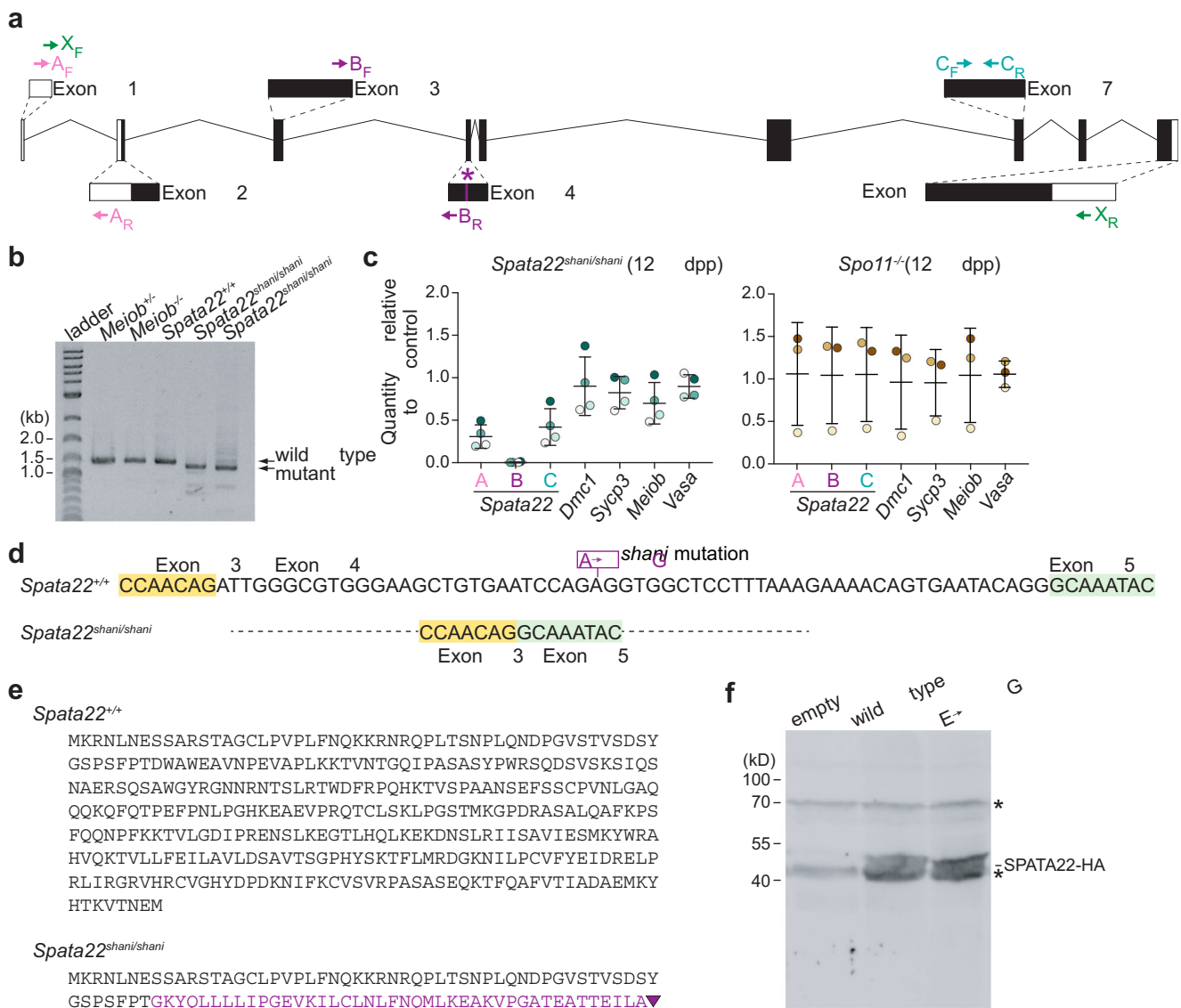


Fig. 7 The *shani* mutation causes defective splicing of *Spata22* RNA. **a** Schematic of the wild-type *Spata22* transcript (same as in Fig. 2b) showing locations of the *shani* mutation (asterisk) and RT-PCR primers. Boxes represent exons with coding regions shown as filled boxes and lines represent introns. Primers X_F (green; spanning exon-exon junction between exons 1 and 2) and X_R (green; located within exon 9) flank the *Spata22* coding region, primers A_F and A_R (pink; located within exons 1 and 2, respectively) flank the exon-exon junction between exons 1 and 2, primers B_F (fuchsia; located within exon 3) and B_R (fuchsia; spanning exon-exon junction between exons 3 and 4) amplify the exon-exon junction region between exons 3 and 4, primers C_F and C_R (blue) are located within exon 7. **b** RT-PCR analysis of *Spata22* in whole-testis RNA samples extracted from two 3-month-old *Spata22*^{shani/shani} males, a 15-month-old *Meio1*^{-/-} male and wild-type or heterozygous littermates. PCR amplification was done using primers flanking the *Spata22* coding region (primers X; shown in green in **a**) and analyzed by gel electrophoresis. Black arrows indicate amplified products. **c** Quantitative RT-PCR analysis of whole-testis RNA samples from 12-dpp *Spata22*^{shani/shani} and 12-dpp *Spo11*^{-/-} mice. Data points represent individual mice normalized

to wild-type or heterozygous littermates and colors identify individual mice. Lines depict mean ± SD. Transcripts analyzed are noted along the x-axis. Three regions of *Spata22* (shown in **a**) were analyzed: exon 1-exon 2 junction (A), exon 3-exon 4 junction (B) and internal region of exon 7 (C). **d** Nucleotide sequence of *Spata22* mRNA spanning exon 4 and flanking regions in wild type and *Spata22*^{shani/shani}. *Spata22* coding region was amplified as described in **b**, gel purified and products were analyzed by Sanger sequencing. Location of the *shani* mutation is indicated. **e** Predicted amino acid sequence of SPATA22 in wild type and *Spata22*^{shani/shani}. Wild-type amino acid sequence is shown in black. Exon 4 loss in mutants is predicted to result in a frameshift, alternative amino acid sequence (fuchsia) and a premature stop codon (triangle). **f** Western blot analysis of HA-tagged human SPATA22 constructs expressed in HEK-293 cells. Constructs carrying wild-type *Spata22* coding sequence, coding sequence with the *shani* mutation (E–G), or an empty construct were expressed and blots probed with anti-HA antibody. Location of SPATA22-HA of wild-type length is indicated and asterisks denote non-specific bands

Ribeiro et al. 2016) and domain architectures of both proteins resemble those of RPA subunits (Luo et al. 2013; Ribeiro et al.

2016; Ribeiro et al. 2018). Also, both proteins interact and colocalize with RPA subunits (Luo et al. 2013; Souquet

et al. 2013; Ishishita et al. 2014; Xu et al. 2017; Ribeiro et al. 2018). These findings lead to the hypothesis that the SPATA22-MEIOB complex collaborates with RPA to regulate meiotic recombination. The precise stoichiometry of the complex and whether it includes RPA subunits or other proteins remains unclear, however. The biochemical role of the SPATA22-MEIOB complex is also unknown. A truncated form of MEIOB has been reported to have exonuclease activity in vitro (Luo et al. 2013) and recent studies show that SPATA22-MEIOB can organize RPA-coated ssDNA in vitro (Ribeiro et al. 2018). How these activities relate to its meiotic recombination function in vivo is unclear.

We show that the initial formation of DMC1 foci appears unaffected or mildly affected in *Spata22*^{shani/shani} and these foci decrease in number as prophase progresses in mice lacking SPATA22; this was also shown previously for DMC1 and RAD51 in mice lacking MEIOB and for RAD51 in rats lacking SPATA22 (Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014). We found that in the absence of SPATA22-MEIOB, DMC1 foci numbers decrease faster than in wild type (this manuscript and Souquet et al. (2013)). This was also observed for RAD51 in mice lacking MEIOB and rats lacking SPATA22 (Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014). One study did not report an earlier loss of strand-exchange proteins (Luo et al. 2013), but they analyzed juvenile mice where recombination foci dynamics have been reported to differ (Zelazowski et al. 2017). We found that RPA2 foci number also decrease earlier than in wild type. Since RPA is thought to decorate multiple recombination intermediates, one possibility is that there is a defect in the formation or stability of a subpopulation of RPA foci. The reduction in RPA2 foci number was not described previously in *Spata22* or *Meiob* mutants (Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014); differences in strain background may explain this discrepancy. The disappearance of DMC1 and RPA during wild-type meiosis is an indicator of repair progression; thus, a simple interpretation of our data is that some repair processes may occur faster or earlier in mutants, at least at some sites.

We found that while RPA2 foci number decrease over the course of meiotic prophase progression in *Spata22* mutants, cells arrest with RPA2 foci present, similar to MEIOB mutants and SPATA22-mutant rats (Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014). The identity of these RPA foci is unknown and may represent a combination of different wild-type and mutant states. Mutants also show persistent H2AX staining (La Salle et al. 2012; Luo et al. 2013; Souquet et al. 2013; Ishishita et al. 2014; Hays et al. 2017). These results indicate that not all sites are properly repaired, if any. It is possible that strand invasion occurs and DMC1 is lost, but that one or more subsequent steps such as D-loop stability or DNA synthesis or second end capture are misregulated. It is also possible that strand-exchange proteins are destabilized or that their ssDNA substrates are reduced, modified, or become

less accessible. All these scenarios may lead to the presence of structures that would be recognized by BLM and could explain the dramatic BLM accumulation we see in mutants. BLM plays multiple roles to eventually prevent formation of potentially toxic structures: BLM disrupts RAD51 nucleoprotein filaments or D-loops, stimulates primer extension and promotes Holliday junction dissolution (Wu et al. 2001; Bugreev et al. 2007). Regardless of the underlying role of BLM in mutants, its accumulation reinforces the requirement of SPATA22-MEIOB in proper processing of recombination intermediates.

Recently, SPATA22 has been shown to immunoprecipitate in testis extracts with MEILB2/HSF2BP (Zhang et al. 2019). MEILB2 interacts with BRCA2, which promotes RAD51/DMC1 nucleoprotein filament formation, and *Meilb2*^{-/-} meiotic cells fail to form RAD51/DMC1 foci (Brandtsma et al. 2019; Zhang et al. 2019). The authors propose that SPATA22-MEIOB may be involved in MEILB2 and BRCA2 recruitment to DNA, which would then facilitate RAD51/DMC1 loading (Zhang et al. 2019). This model predicts that RAD51/DMC1 would not accumulate in SPATA22-MEIOB mutants. We observe only a modest reduction in DMC1 foci numbers during leptotema and early zygonema, but we do not know whether the DMC1 foci we detect at any of these stages are properly organized, stable or functional. Our results support the idea that RAD51/DMC1 filament assembly, stability and disassembly involves a complex regulatory network with cross-talk between multiple factors. The molecular determinants of these interactions remain to be elucidated.

We performed molecular characterization of the *shani* lesion and uncovered surprising regulation of *Spata22* gene expression. The *shani* mutation alters nucleotide sequences within exon 4 that are crucial for accurate splicing of *Spata22*. The splicing regulation we document here has been reported in mammalian genes, where long introns and weakly defined exon-intron boundaries are supported by both exonic and intronic cis-acting elements that either stimulate or repress splicing. One prevalent exonic element, called ESE, serves as a binding site for splicing factors called serine/arginine-rich (SR) proteins to promote exon definition (Blencowe 2000; Cartegni et al. 2002). There are several instances where disease-causing mutations that result in alternative splicing have been proposed to affect ESEs and mutations that abrogate an ESE often cause exon-skipping (Blencowe 2000; Cartegni et al. 2002), akin to that observed in *shani* mutants. We propose that the *shani* mutation possibly alters an ESE element within exon 4 in the *Spata22* transcript, leading to skipping of exon 4 by the spliceosome, making this, to our knowledge, the first description of an ESE element in a murine meiotic gene. While ESE elements lack a well-defined consensus sequence, combinatorial in vivo and in vitro approaches have led to the identification of 6- to 8-nucleotide

long ESE sequence motifs and been used to develop computational ESE-prediction tools (Blencowe 2000; Cartegni et al. 2002). Indeed, the CCAGAGG and CAGAGGT overlapping sequences encompassing the affected adenine in *shani* mutants are recognized as putative ESE motifs by the ESEfinder ESE-prediction web tool (Cartegni et al. 2003).

While the amino acid affected by the *shani* mutation lies outside of the well-conserved SPATA22 protein domains, the affected DNA nucleotide (adenine) appears to be conserved in most tetrapods examined, as is the entirety of exon 4. This indicates that the splicing regulation we describe above may not be restricted to mouse, but rather may be a conserved feature of *Spata22* gene expression regulation. Similar regulation may be important for controlling other meiotic genes, especially given the extensive gene expression modulations that occur during meiosis and germ cell development. Our findings highlight how coding single-nucleotide polymorphisms can deregulate/alter splicing events and lead to phenotypic variability or gene inactivation during development. Moreover, our isolation and characterization of the *shani* allele of *Spata22* demonstrates the power of forward genetic approaches in uncovering unexpected gene regulation in mammals.

Materials and methods

Generation of *shani* mutants

Details of the mutagenesis and breeding for screening purposes are described elsewhere (Jain et al. 2017) and were similar to previously described methods (Casparly 2010; Probst and Justice 2010). We screened G3 males for meiotic defects at 35 dpp, focusing on meiotic recombination. By this age, the testes weight reduction was deemed to be clearly discernible for known meiotic recombination mutants (Yoshida et al. 1998). Thus G3 mutants displaying arrest and spermatocyte elimination similar to that seen in typical meiotic recombination mutants were expected to be identifiable. Testes pairs were dissected, weighed along with the body, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until samples from ~24 or more G3 males had been collected. Then, testes-to-body-weight ratios were evaluated side-by-side for all animals from any given line.

Mice with an obvious reduction in testes-to-body-weight ratio compared to littermates were subjected to secondary screening by histological examination. One frozen testis from potential mutant mice, along with one frozen testis from a wild-type littermate were used for histology and the second testis was reserved for DNA extraction. Immunohistochemical TUNEL assay was performed and seminiferous tubules were evaluated for the presence of TUNEL staining, depletion of seminiferous tubules and absence of spermatids.

Genotyping of *shani* animals was done by PCR amplification using *shani* F1 and *shani* R primers, followed by Sanger sequencing using *shani* F2 primer (oligonucleotide primer sequences are provided in Table S2) or by digestion of the amplified product with MnlI (NEB) or BstNI (NEB). The *shani* mutation eliminates an MnlI restriction site that is present in the wild-type sequence and creates a novel BstNI restriction site.

shani mutation identification and exome sequencing

Genome assembly coordinates are from GRCm38/mm10. We performed whole-exome sequencing on five G3 *shani* mutants (a in Fig. 1b; c, c from a fourth F1xG2 harem-breeding cage that was set up after the initial screen cross; d and e from a fifth and sixth harem-breeding cage set up after the initial screen cross). Genomic DNA was extracted from testes or tail biopsies as described (Jain et al. 2017) and whole-exome sequencing was performed at the MSKCC Integrated Genomics Operation as described (Jain et al. 2018) to generate approximately 80 million 100 bp paired-end reads. Read alignment, variant calling and variant annotation were done as described (Jain et al. 2017).

We expected that lines generated from distinct mutagenized males and mutant lines with distinct phenotypes would likely not share phenotype-causing variants. Thus variants called from distinct mutant lines sequenced in parallel with the *shani* mutant line were filtered out to identify variants that are private to the *shani* line (i.e., found in *shani* mutant mice but not in mice of other mutant lines). If the *shani* mutant phenotype was caused by a single autosomal recessive mutation, *shani* mutant mice were expected to be homozygous for the phenotype-causing mutation and share this mutation. Thus, variants were further filtered to only include those that were called as homozygous, had a minimum sequencing depth of five reads, and were not known between-strain SNPs. Next we searched for variants that were shared between all five G3 *shani* mutant mice. This yielded three single nucleotide substitutions at the following positions: Chr11:73187728 in intron of *Ctns* (A to G substitution), Chr11:73336037 in exon of *Spata22* (A to G substitution), and Chr11:76138184 in intron of *Vps53* (A to T substitution).

ENCODE data analysis

ENCODE long-RNA sequencing data (release 3) for Ensembl Transcript ID: ENSMUST00000092926 with the following GEO accession numbers were used in Fig. 2d: testis GSM900193, liver GSM900195, mammary gland GSM900184, large intestine GSM900189, cerebellum GSM1000567, frontal lobe GSM1000562, cortex GSM1000563, kidney GSM900194, thymus GSM900192, heart GSM900199, colon GSM900198, spleen GSM900197,

adrenal gland GSM900188, duodenum GSM900187, lung GSM900196, ovary GSM900183, small intestine GSM900186, stomach GSM900185.

Phylogenetic analysis

SPATA22 protein sequences were obtained from NCBI or Ensembl. Two conserved domains were identified in ten placental mammals using Multalin (Corpet 1988). Sequences of these two domains were used to search for homologous sequences in other species with tBlastn tool (NCBI) and the following databases: Whole Genome Shotgun contigs (WGS), Transcriptome Shotgun Assembly (TSA), and Sequence Read Archive (SRA). Protein sequences obtained were aligned with Clustal Omega (Sievers et al. 2011; Madeira et al. 2019) and edited with Jalview 2.10.5 (Waterhouse et al. 2009). Then conserved domain boundaries were refined as follows: succession of 10 amino acids in which at least half of them possess 40% identity among all listed species. For graphical representation (Fig. 2e), consensus sequences were defined for closely related species (10 placentals, 6 marsupials, 4 turtles, 4 snakes, 5 birds, 5 frogs, 4 crocodiles, 12 fishes, 5 echinoderms, 6 cnidarians, 15 molluscs) using Multalin, realigned with Clustal Omega and edited with Jalview. Names of species and corresponding sequence IDs are provided in Table S1.

Spata22 nucleotide sequences were obtained from Ensembl or NCBI. Nucleotide sequence of mouse *Spata22* exon 4 was used to search for homologous sequences with BLASTn tool in Ensembl. Retrieved sequences were aligned with Clustal Omega and edited with Jalview (Fig. 2f). Sequences presented correspond to a complete exon and have the following Ensembl exon ID or NCBI gene ID: mouse (ENSMUSE00001408004), rat (ENSRNOE00000381274), human (ENSE00003580316), cow (ENSBTAE00000171295), platypus (ENSOANE00000227841), elephant (ENSLAFE00000151975), tiger (ENSPTIE00000161305), opossum (ENSMODE00000294904), turtle (ENSPSIE00000164161), flycatcher (ENSFALE00000067395), and xenopus (100485180).

Histology

For secondary screening, frozen testes were embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, VWR) and sectioned (5 μ m) at 20 °C. Sections were placed on slides and slides were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature. Slides were subsequently rinsed in water and stored for up to 1 week at 4 °C prior to staining.

For analyses of *Spata22* mutants, testes and ovaries were fixed overnight in 4% PFA at 4 °C, followed by two 5 min washes in water at room temperature and transferred to 70% ethanol. Alternatively, testes were fixed in Bouin's fixative overnight at room temperature, washed in water for 1 h at room temperature, followed by two 1 h washes in 70% ethanol at room temperature. Fixed tissues were stored in 70% ethanol at 4 °C for up to 1 week prior to embedding, embedded in paraffin, and sectioned (5 μ m).

Periodic acid-Schiff (PAS) staining and immunohistochemical TUNEL assay were performed by the MSKCC Molecular Cytology Core Facility. PAS staining was done with hematoxylin counterstain using the Auto-stainer XL automated stainer (Leica Microsystems). TUNEL assay was performed using the Discovery XT processor (Ventana Medical Systems) as previously described (Jain et al. 2017). For immunofluorescent staining, slides were deparaffinized with xylene, rehydrated with serial washes in 100% ethanol and rinsed with water. Antigen retrieval was performed by incubating slides for 10 min at 95–100 °C in 10 mM sodium citrate with 0.05% Tween-20 pH 6. Slides were stored at room temperature until staining.

Chromosome spreads

Spermatocyte spreads were prepared using established methods (Peters et al. 1997; Moens et al. 2000). Briefly, spermatocytes were homogenized in 0.1 M sucrose, then surface spread onto glass slides covered with 1% PFA containing either 0.1% Triton X-100 or 0.25% NP40. Slides were incubated for 2 h in a humid chamber, gently air-dried and rinsed with 0.4% Photo-Flo (Kodak). Slides were subsequently air-dried and stored at 20 °C.

Immunofluorescence

Chromosomes spreads or testis sections were incubated in blocking buffer (1 \times PBS with 0.2% BSA, 0.2% cold water fish skin gelatin, 0.05% Tween-20) for 1 h at room temperature. Slides were incubated with primary antibody overnight at room temperature and washed three times with 1 \times PBS containing 0.05% Tween-20 at room temperature. Secondary antibody staining was done with appropriate Alexa Fluor secondary antibodies for 1 h at 37 °C and slides were washed three times in 1 \times PBS containing 0.05% Tween-20 at room temperature. All antibodies were diluted in blocking buffer. Slides were mounted with coverslips using mountant (ProLong Gold, Life Technologies) containing DAPI and stored at 4 °C until imaging. Antibodies and dilutions used are listed in Table S3.

Image analysis

PAS-stained and TUNEL slides were digitized using Panoramic Flash 250 (3DHitech) with 20×/0.8 NA air objective. Images were produced and analyzed using the Panoramic Viewer software (3DHitech). Immunofluorescence images of testis sections were produced using an SP8 confocal microscope (Leica Microsystems) with 63×/1.4 NA oil-immersion objective. Chromosome spreads were imaged on an AX70 epifluorescent microscope (Olympus) equipped with a CoolSNAP MYO CCD camera (Photometrics) using a 100×/1.35 NA oil-immersion objective.

All histological and cytological data are representative of 2 biological replicates (independent mice) of similar ages. Presence/absence of developing follicles in mutant ovaries (Fig. 3d, e) was assessed by examining 30 sections (spanning 150 μm of ovarian tissue). Quantitative data were acquired by manual scoring. For TUNEL quantification (Fig. 3c), 3 testis sections (50 μm apart) were scored per mouse. For detection of number of foci (Figs. 5 and 6), immunofluorescence staining was adjusted to be above background level (region containing no cells) using Fiji (Schindelin et al. 2012) and only foci that overlapped with SYCP3 staining (axis-associated foci) were counted. Spermatocytes were staged on the basis of SYCP3 staining patterns. Statistical analyses were done using GraphPad Prism 7.

Spata22 coding region amplification and sequencing

Procedures involving commercial kits were performed according to manufacturers instructions. Total RNA was extracted from frozen testes using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and the RNase-Free DNase Set (Qiagen) was used to perform an on-column DNase digestion. cDNA was synthesized from 1 μg of RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) with random primers.

Spata22 coding region was amplified from adult testis cDNA by PCR with *Spata22* coding sequence amplification F and R primers using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) and 0.3 ng/μl of cDNA in GC Buffer. Manufacturer's thermocycling conditions were adapted as follows: denaturation for 10 s, annealing for 30 s at 65 °C and extension for one min for a total of 35 cycles. PCR products were electrophoresed on a 0.8% agarose gel, bands corresponding in size to *Spata22* cDNA were gel purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) and Sanger sequenced using *Spata22* seq1 seq5 primers. Primer sequences are provided in Table S2.

Quantitative RT-PCR

Testis cDNA was obtained as described above. Procedures involving commercial kits were performed according to manufacturers instructions. Quantitative PCR was carried out using QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) for detecting products on a StepOnePlus Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems). Primer sequences are listed in Table S2.

All reactions were done in duplicate (*Dmc1*, *Sycp3*, *Meiob*, *Vasa*) or quadruplicate (*Spata22*). The success of reactions was confirmed by analysis of amplification and melting curves. StepOne Software v2.3 was used to quantify products using the 2^{-Ct} method. Briefly, duplicate or quadruplicate threshold cycle (Ct) values were averaged to obtain mean Ct values and mean Ct value of *Actb* reactions was subtracted to obtain ΔCt values. Then, ΔCt values obtained for mutants were subtracted from those obtained for wild-type or heterozygous littermates to obtain $\Delta\Delta Ct$ values and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values are plotted as relative quantity values (Fig. 7c). For 12 dpp *Spata22*^{shani/shani}, four litters containing one mutant and one wild type each were analyzed. For 12 dpp *Spo11*^{-/-}, one litter containing three mutant and two wild-type animals were analyzed and mean wild-type ΔCt value was used to obtain $\Delta\Delta Ct$ values for the three mutants.

Plasmid construction

Constructs were confirmed by DNA sequencing. The *shani* mutation was introduced into pCMV6-XL5-HsSPATA22 plasmid (Origene, cat# SC123038) by site directed mutagenesis. Wild-type and mutated *Spata22* sequences were PCR amplified from pCMV6-XL5-HsSPATA22, digested with EcoRI (NEB) and BamHI (NEB), and cloned into pKH3 plasmid (Addgene) for protein expression.

Cell culture and plasmid transfection

Cells were cultivated in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C. Human embryonic kidney cells (HEK-293, ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). Cell lines were regularly screened for mycoplasma contamination by DAPI staining. Plasmid transfection was performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Total protein extraction from testes was done, after removing the tunica albuginea, by lysing cells in RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific) using ceramic spheres and FastPrep-24

instrument (MP Biomedicals) with two 20 s pulses. Extracts were then sonicated for 10 min at medium power (30 s on, 30 s off) and centrifuged at 16,200×g for 10 min at 4 °C. For whole cell protein extraction from HEK-293 cells, cells were lysed under native conditions by homogenization in 1× cell lysis buffer (Cell Signaling) supplemented with Complete protease inhibitor tablet (Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma) and 10 mM MG-132 (Sigma), sonicated twice for 10 min each at medium power (30 s on, 30 s off) and centrifuged at 16,200×g for 10 min at 4 °C.

Protein samples were supplemented with Laemmli buffer and dithiothreitol, boiled for 5 min and separated by SDS-PAGE on a 10% gel. Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked in PBST (1× PBS with 0.05% Tween-20) supplemented with 5% non-fat milk for 1 h at room temperature, incubated with primary antibodies in PBST supplemented with 1% non-fat milk overnight at 4 °C and then incubated with appropriate secondary antibodies in PBST supplemented with 1% non-fat milk for 3 h at room temperature. Images were acquired using a Typhoon 5 imager (Amersham Biosciences, GE Healthcare). Antibodies used are listed in Table S3.

Acknowledgments We thank Keeney lab members Luis Torres, Diana Y. Eng, and Jacquelyn Song for assistance with genotyping and mouse husbandry. We thank Keeney lab member Shintaro Yamada for *Spo11* mutant mice. We thank Ning Fan and Dmitry Yarinin at the MSKCC Cytology Core for help with histological analyses. For whole-exome sequencing, we thank the MSKCC Integrated Genomics Operation. We thank members of the Laboratory of the Development of the Gonads as well as Keeney lab members for discussions and technical support. We thank members of the animal housing facility at CEA-FAR and CEA-Saclay. We acknowledge the ENCODE Consortium (Consortium EP 2012) and the ENCODE production laboratory of Thomas Gingeras (Cold Spring Harbor Laboratory) for generating the ENCODE datasets used in this manuscript.

Author contributions CP, VB, JR, EM, and DJ performed research. CP, NL, GL, EM, and DJ analyzed data. GL, SK, EM, and DJ wrote the paper.

Funding information MSKCC core facilities were supported by the National Institutes of Health grant P30 CA008748. Livera lab members were supported by ANR, INSERM, Fondation ARC and La Ligue contre le Cancer. DJ was supported by a fellowship from Human Frontier Science Program. Work in the SK lab was supported by Howard Hughes Medical Institute. CP and JR were supported by a CEA fellowship and JR by La Ligue contre le Cancer.

Data availability Reagents and mouse strains are available upon request.

Compliance with ethical standards All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the regulatory standards and were approved by the Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) and the Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) Institutional Animal Care and Use Committees.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Barchi M, Mahadevaiah S, Di Giacomo M, Baudat F, de Rooij DG, Burgoyne PS, Jasin M, Keeney S (2005) Surveillance of different recombination defects in mouse spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental stage. *Mol Cell Biol* 25:7203–7215. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7203-7215.2005>
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S (2000) Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* 6:989–998
- Baudat F, Imai Y, de Massy B (2013) Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nat Rev Genet* 14:794–806. <https://doi.org/10.1038/nrg3573>
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M (1977) Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* 74:68–85
- Blencowe BJ (2000) Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci* 25:106–110. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01549-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01549-8)
- Brandsma I, Sato K, van Rossum-Fikkert SE, van Vliet N, Sleddens E, Reuter M, Odijk H, van den Tempel N, Dekkers DHW, Bezstarosti K, Demmers JAA, Maas A, Lebbink J, Wyman C, Essers J, van Gent DC, Baarends WM, Knipscheer P, Kanaar R, Zelensky AN (2019) HSF2BP interacts with a conserved domain of BRCA2 and is required for mouse spermatogenesis. *Cell Rep* 27:3790–3798.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.096>
- Brosh RM Jr, Li JL, Kenny MK, Karow JK, Cooper MP, Kureekattil RP, Hickson ID, Bohr VA (2000) Replication protein A physically interacts with the Bloom syndrome protein and stimulates its helicase activity. *J Biol Chem* 275:23500–23508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001557200>
- Brown MS, Bishop DK (2014) DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a016659. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016659>
- Bugreev DV, Yu X, Egelman EH, Mazin AV (2007) Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom syndrome helicase. *Genes Dev* 21:3085–3094. <https://doi.org/10.1101/gad.1609007>
- Caburet S, Todeschini AL, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, Livera G, Younis JS, Shalev S, Veitia RA (2019) A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine* 42:524–531. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.075>
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3:285–298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568–3571. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg616>
- Caspary T (2010) Phenotype-driven mouse ENU mutagenesis screens. *Methods Enzymol* 477:313–327. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)77016-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)77016-6)
- Consortium EP (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489:57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16:10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.02.020>
- de Rooij DG, de Boer P (2003) Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res* 103:267–276. <https://doi.org/10.1159/000076812>
- de Vries FA, de Boer E, van den Bosch M, Baarends WM, Ooms M, Yuan L, Liu JG, van Zeeland AA, Heyting C, Pastink A (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* 19:1376–1389. <https://doi.org/10.1101/gad.329705>
- Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, Pietrokovski S, Kleiman SE (2017) A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet Med* 19:998–1006. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.225>
- Gershoni M, Hauser R, Barda S, Lehavi O, Arama E, Pietrokovski S, Kleiman SE (2019) A new MEIOB mutation is a recurrent cause for azoospermia and testicular meiotic arrest. *Hum Reprod* 34:666–671. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez016>
- Hassold T, Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2:280–291. <https://doi.org/10.1038/35066065>
- Hays E, Majchrzak N, Daniel V, Ferguson Z, Brown S, Hathorne K, 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. <https://doi.org/10.1111/andr.12315>
- Holloway JK, Booth J, Edelman W, McGowan CH, Cohen PE (2008) MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genet* 4:e1000186. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000186>
- 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. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909048>
- Hunter N (2015) Meiotic recombination: the essence of heredity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016618>
- Hunter N (2017) Oocyte quality control: causes, mechanisms, and consequences. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 82:235–247. <https://doi.org/10.1101/sqb.2017.82.035394>
- Ishishita S, Inui T, Matsuda Y, Serikawa T, 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. <https://doi.org/10.1538/expanim.62.219>
- 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. <https://doi.org/10.1038/srep06148>
- Jain D, Meydan C, Lange J, Claeys Bouuaert C, Lailier N, Mason CE, Anderson KV, Keeney S (2017) Rahu is a mutant allele of Dnm3c, encoding a DNA methyltransferase homolog required for meiosis and transposon repression in the mouse male germline. *PLoS Genet* 13:e1006964. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006964>
- Jain D, Puno MR, Meydan C, Lailier N, Mason CE, Lima CD, Anderson KV, Keeney S (2018) Ketu mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient RNA helicase YTHDC2. *Elife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.30919>
- 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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.095752>
- Lammers JH, Offenberger HH, van Aalderen M, Vink AC, Dietrich AJ, Heyting C (1994) The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* 14:1137–1146
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms3788>
- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS (2001) Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 27:271–276. <https://doi.org/10.1038/85830>
- 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(Pt 4):663–672
- Page SL, Hawley RS (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301:785–789. <https://doi.org/10.1126/science.1086605>
- Peters H (1969) The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol* 62:98–116. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0620098>
- Peters AH, Plug AW, van Vugt MJ, de Boer P (1997) A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosom Res* 5:66–68
- 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. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80069-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80069-6)
- Probst FJ, Justice MJ (2010) Mouse mutagenesis with the chemical supermutagen ENU. *Methods Enzymol* 477:297–312. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)77015-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)77015-4)
- Ribeiro J, Abby E, Livera G, Martini E (2016) RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* 125:265–276. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0552-7>
- Ribeiro J et al. (2018) MEIOB and SPATA22 resemble RPA subunits and interact with the RPA complex to promote meiotic recombination. *bioRxiv*
- Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 6:975–987
- Sasaki M, Lange J, Keeney S (2010) Genome destabilization by homologous recombination in the germ line. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:182–195. <https://doi.org/10.1038/nrm2849>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Singh DK, Ahn B, Bohr VA (2009) Roles of RECQ helicases in recombination based DNA repair, genomic stability and aging. *Biogerontology* 10:235–252. <https://doi.org/10.1007/s10522-008-9205-z>
- Souquet B, Abby E, Hervé 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784>
- Walpita D, Plug AW, Neff NF, German J, Ashley T (1999) Bloom's syndrome protein, BLM, colocalizes with replication protein a in meiotic prophase nuclei of mammalian spermatocytes. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 96:5622–5627. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5622>
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ (2009) Jalview version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>
- Wold MS (1997) Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 66:61–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.61>
- Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID (2001) Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem* 276:19375–19381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009471200>
- Xu Y, Greenberg RA, Schonbrunn E, Wang PJ (2017) Meiosis-specific proteins MEIOB and SPATA22 cooperatively associate with the single-stranded DNA-binding replication protein A complex and DNA double-strand breaks. *Biol Reprod* 96:1096–1104. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox040>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80070-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80070-2)
- Zelazowski MJ, Sandoval M, Paniker L, Hamilton HM, Han J, Gribbell MA, Kang R, Cole F (2017) Age-dependent alterations in meiotic recombination cause chromosome segregation errors in spermatocytes. *Cell* 171:601–614.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.042>
- Zhang J, Fujiwara Y, Yamamoto S, Shibuya H (2019) A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nat Commun* 10:722. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08676-2>
- Zickler D, Kleckner N (2015) Recombination, pairing, and synapsis of homologs during meiosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article 2: The meiosis-specific MEIOB–SPATA22 complex cooperates with RPA to condense single-stranded DNA

The meiosis-specific MEIOB–SPATA22 complex cooperates with RPA to condense single-stranded DNA

Jonathan Ribeiro ¹, Cynthia Petrillo ¹, Pauline Dupaigne ², Cécile Ducrot ¹, Clotilde Duquenne ¹, Xavier Veaute ³, Carole Saintomé ⁴, Didier Busso ⁵, Raphaël Guerois ⁵, Emmanuelle Martini ^{1,#}, and Gabriel Livera ¹

¹ Laboratory of Development of the Gonads, UMR E008 Genetic Stability Stem cells and Radiations, Université de Paris, Université Paris Saclay, CEA, F-92265 Fontenay aux Roses, France

² Laboratoire de Microscopie Moléculaire et Cellulaire, UMR 8126, Interactions Moléculaires et Cancer, CNRS– Université Paris Sud–Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France

³ CIGEx, UMRE008 Stabilité Génétique Cellules Souches et Radiations, Université de Paris, Université Paris-Saclay, CEA, Inserm, U1274, F-92260 Fontenay-aux-Roses, France

⁴ MNHN - CNRS UMR 7196 / INSERM U1154 - Sorbonne Universités, 75231 Paris, France

⁵ CNRS I2BC UMR 9198, iBiTec-S / SB³SM CEA SACLAY, 91191 Gif sur Yvette, France

Correspondance: Emmanuelle Martini, +33 (1) 46 54 80 04, emmanuelle.martini@cea.fr

Authors contribution : JR, PD, XV, EM, GL Conceptualization; JR,CP,PD,XV,CD,CD, CS, EM Data curation; JR, RG, EM,GL Formal analysis; EM,GL Funding acquisition; JR, EM Roles/Writing - original draft; JR,EM,GL Writing - review & editing.

Abstract

During meiosis, programmed double-strand breaks are repaired by homologous recombination (HR) to form crossovers that are essential to homologous chromosome segregation. Single-stranded DNA (ssDNA) containing intermediates are key features of HR, which must be highly regulated. RPA, the ubiquitous ssDNA binding complex, was thought to play similar roles during mitotic and meiotic HR until the recent discovery of MEIOB and its partner, SPATA22—two essential meiosis-specific proteins. Here, we show that like MEIOB, SPATA22 resembles RPA subunits and binds ssDNA. We studied the physical and functional interactions existing between MEIOB, SPATA22, and RPA, and show that MEIOB and SPATA22 interact with the preformed RPA complex through their interacting domain and condense RPA-coated ssDNA *in vitro*. In meiotic cells, we show that MEIOB and SPATA22 modify the immunodetection of the two large subunits of RPA. Given these results, we propose that MEIOB–SPATA22 and RPA form a functional ssDNA-interacting complex to satisfy meiotic HR requirements by providing specific properties to the ssDNA.

Keywords: meiosis; meiotic recombination; gametogenesis; OB domain

1. Introduction

Single-stranded DNA (ssDNA) is generated during DNA replication, repair, and homologous recombination (HR) and is a key player for proper completion of these processes [1]. Dysfunctional HR leads to genome instability, cancer development, and male and female infertility. During HR, ssDNA is produced at different steps [1]. After double-strand breaks (DSB) formation, ends are resected to free 3'-ssDNA tails, which are then coated by the RecA family recombinases to promote the invasion of homologous sequences. This invasion induces displacement of the noncomplementary strand of the template DNA, generating a loop of ssDNA. The displacement loop (D-loop) can either be reversed or stabilized. Depending on the D-loop outcome, recombination intermediates give rise to crossover or non-crossover products that are, respectively, associated or not to reciprocal exchanges of chromosome arms. Indeed, D-loop reversion leads to double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing (SDSA) and non-crossover product, whereas D-loop stabilization leads to the formation of a double Holliday junction resolved as crossover or non-crossover products. [2]. Mitotic and meiotic HR differ in that mitotic HR mainly occurs between sister chromatids and generates mostly non-crossovers products, whereas meiotic HR occurs between homologous chromosomes with the obligation to form at least one crossover per bivalent, essential for chromosome segregation during the first meiotic division in most organisms. Meiotic HR relies on the combined action of ubiquitous and meiosis-specific factors. Therefore, studying physical and functional interactions of ubiquitous and meiosis-specific factors is essential for proper understanding of meiotic HR.

During mitotic HR, the main ssDNA binding protein, replication protein A (RPA), an essential and evolutionarily conserved trimeric complex composed of RPA1, RPA2, and RPA3, binds resected DNA to prevent degradation and secondary structure formation [3–5]. Next, RPA is replaced by the RAD51 recombinase to form the presynaptic recombinogenic filament [6]. During strand invasion, RPA can also stimulate RAD51-dependent strand exchange by coating and stabilizing the D-loop to prevent its dismantlement [7,8]. Beside its structural role with ssDNA, RPA interacts with numerous factors to regulate DNA metabolism [9].

We and another group identified MEIOB (MEIosis Specific With OB Domains), a conserved meiotic paralog of RPA1 [10,11]. Several lines of evidence suggest that during meiosis, MEIOB forms a complex with SPATA22, a meiosis-specific factor with unknown function [11]. Regions involved in MEIOB–SPATA22 interactions have been identified by over-expressing truncated forms of the murine proteins in human cells [12]. In rodents, the

absence of MEIOB or SPATA22 causes sterility in males and females as a result of the accumulation of unrepaired DSBs during meiotic prophase I [10,11,13,14]. *In vivo* analysis of meiotic chromosomes showed that MEIOB and SPATA22 colocalize with the subunits of RPA during meiotic prophase I progression, suggesting that MEIOB–SPATA22 and RPA could work together. However, whether MEIOB–SPATA22 interacts with the preformed RPA complex and the putative role of this interaction during meiotic HR remain unknown.

In this work, we demonstrate that MEIOB and SPATA22 share structural features and interaction patterns with the RPA subunits, and show that the C-terminal OB-fold (five- or six-stranded closed β -barrels)-containing domains of MEIOB and SPATA22 are sufficient for their interaction. We also demonstrate that this MEIOB–SPATA22 interacting domain is mandatory to interact with the preformed RPA complex. Finally, we show that MEIOB–SPATA22 changes the conformation of the RPA-coated ssDNA *in vitro* and alter immunodetection of the RPA subunits *in vivo*, suggesting that the MEIOB–SPATA22 complex works with RPA to provide specific properties to ssDNA-containing HR intermediates essential for meiotic HR. Altogether, our results provide new insights into the properties and roles of MEIOB and SPATA22 and how meiosis-specific proteins can interact with ubiquitous proteins to specify homologous recombination during meiosis.

2. Results

MEIOB and SPATA22 share structural features with subunits of the RPA complex

Crystal structures have been solved for portions of the RPA complex from various species [15–18]. We previously showed that MEIOB is a paralog of RPA1 [9,10], the largest subunit of the trimeric RPA complex. Indeed, MEIOB possesses three OB-fold-containing domains (OBCDs) consisting of an OB-fold (five- or six-stranded closed β -barrels) and supplementary secondary structures. We modeled the structure of human MEIOB (HsMEIOB) using the protein structure prediction server RaptorX [19], which selected RPA1 from *Ustilago maydis* (UmRPA1) as the best template (Fig. 1A) [18]. Structure prediction revealed the presence of a zinc ribbon, a helix-turn-helix motif, and a c-terminal helix in the predicted OBCD3 of MEIOB (Fig. 1A; HsMEIOB). These specific features are also present in the OBCD1 of RPA1

Given the strong structural similarities between MEIOB and RPA1, we asked whether SPATA22 also possesses similarities to RPA subunits. The RaptorX server selected UmRPA2 from *Ustilago maydis* as the best template to model the structure of SPATA22 and predicted the presence of a single OBCD in the C-terminal part of human SPATA22 (HsSPATA22) (Fig. 1B, left panel) [19]. Figure 1B highlights the structural similarities between HsSPATA22 and HsRPA2 [20]. Of note, the OBCD is predicted to contain a C-terminal helix, as observed in the OBCDs of the RPA subunits and MEIOB.

Given the similarities between SPATA22 and RPA subunits, we next asked whether SPATA22 directly interacts with ssDNA. Human versions of HA-tagged SPATA22 or MYC-FLAG-tagged MEIOB were expressed *in vitro* in a cell-free system and pulled down with either a biotinylated 59-mer ssDNA or a biotinylated 59-mer dsDNA (Fig. 1C). MEIOB was preferentially pulled down by ssDNA, as previously reported [10,11], as was SPATA22 (Fig 1C). This observation shows that both MEIOB and SPATA22 bind ssDNA.

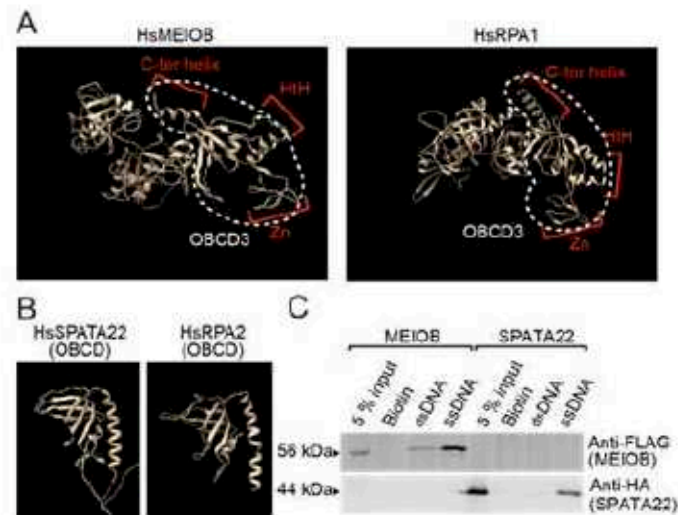


Figure 1. MEIOB and SPATA22 have OB-fold-containing domains and structural similarities to RPA.

(A) Structure prediction of HsMEIOB and structure of HsRPA1 using the structure prediction software RaptorX. White dotted lines highlight the OB-fold of HsRPA1 and HsMEIOB. Red brackets highlight the C-terminal helix (C-ter helix), the helix-turn-helix (HTH), and the zinc ribbon domains (Zn) in OB-fold of MEIOB and RPA1. (B) Structure prediction of the predicted OB-fold of human SPATA22 (HsSPATA22) and structure of the OB-fold of HsRPA2 using the structure prediction software RaptorX. (C) Tagged versions of full-length human MEIOB or SPATA22 were expressed in a cell-free system and mixed with biotin alone or with biotinylated double-stranded or single-stranded 59-mer DNA (59-mer dsDNA or 59-mer ssDNA, respectively). Precipitated proteins were detected using anti-FLAG (MEIOB) or anti-HA (SPATA22) antibodies. The data are representative of three independent experiments.

MEIOB and SPATA22 C-terminal OB domains are necessary and sufficient for their interaction

To study MEIOB and SPATA22 interactions, we took advantage of the similarities that these proteins share with the RPA subunits. Previous structural studies revealed that the three subunits of RPA interact via OB-folds that form the minimum component of their interaction or trimerization core (Fig. 2C) [17,18,21–24]. Given that similar domains are present in MEIOB and SPATA22, we hypothesized that these domains may be involved in MEIOB–SPATA22 interactions.

To test this hypothesis, we constructed wild-type and truncated forms of tagged human MEIOB and tagged human SPATA22 and transiently expressed them in cultured HEK293 cells (Fig. 2A). The interactions between these two proteins were tested by co-immunoprecipitation (co-IP) using antibodies directed against their tags, with strong nuclease treatment to avoid aberrant interactions due to oligonucleotide bridges (see material and methods section). MEIOB and SPATA22 immunoprecipitated with each other, consistent with previous data obtained using murine and human proteins (Fig. 2B, lane 6, and 2C, lane 6;

see Fig. S1A, and B for input) [12,25]. Because RPA subunits interact via their C-terminal OBCD domains, we examined whether MEIOB and SPATA22 C-terminal OBCDs were necessary and sufficient for their interaction (Fig. 2B and 3A). Co-IP results showed that the C-terminal OBCDs of MEIOB (MEIOB OBCD3) and SPATA22 (SPATA22 OBCD) are necessary to ensure their interaction (Fig. 2B, lane 7, 2C, lane 7, and Fig. S1A,B). These results are consistent with previous works underlying the importance of the integrity of the C-terminal part of MEIOB and SPATA22 for their interaction [12,25]. Next, we asked whether the C-terminal OBCDs of MEIOB and SPATA22 were sufficient to ensure their interaction, as suggested by their structural similarity to RPA. By co-expressing and immunoprecipitating (i) the OBCD3 of MEIOB with full-length SPATA22, (ii) the OBCD of SPATA22 with full-length MEIOB, or (iii) the OBCD3 of MEIOB and the OBCD of SPATA22, we observed that the OBCD3 of MEIOB and the OBCD of SPATA22 are sufficient to ensure the interaction between MEIOB and SPATA22 (Fig. 2B, lane 8, 2C, lane 8, 3A, lane 6, and S1A,B). A published analysis of the crystal structure of RPA highlighted the role of OBCD C-terminal helices in RPA complex formation [17]. Interestingly, the predicted structures of MEIOB and SPATA22 suggest the existence of such helices flanking their C-terminal OB folds (Fig. 1A,B). Deletion of the SPATA22 C-terminal helix abolishes MEIOB–SPATA22 interaction (Fig. 2C, lane 9, and S1B). However, deletion of the MEIOB C-terminal helix does not abolish this interaction (Fig. 2B, lane 9, and S1A). These results are expected as truncating part of the C-terminal domain of RPA1, which contains the helix, is insufficient to abolish its interaction with RPA2 [21]. Altogether, our observations demonstrate that similar to RPA, the OBCD3 of MEIOB and the OBCD of SPATA22 are necessary and sufficient for their interaction (Fig. 3C).

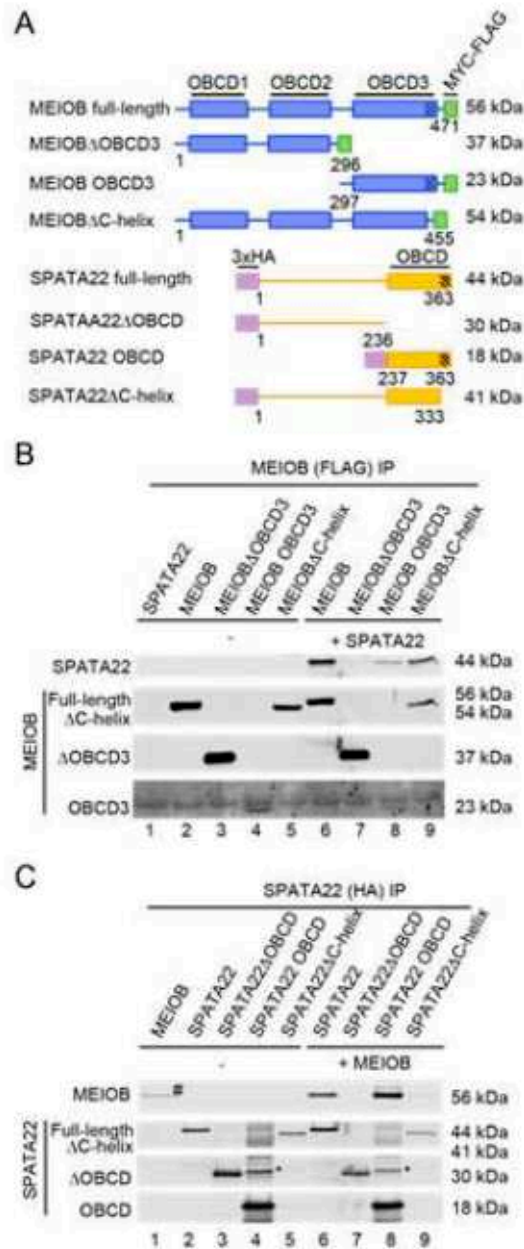


Figure2. MEIOB and SPATA22 C-terminal domains are sufficient for their interaction.

(A) Schematic representation of full length and truncated forms of human tagged MEIOB and human tagged SPATA22 used in this study. OBCDs of MEIOB are blue boxes, OBCD of SPATA22 is the yellow box and MYC-FLAG and 3xHA are shown in green and purple respectively. (B) MEIOB and/or SPATA22 were transfected in HEK293 cells, and MEIOB was immunoprecipitated (MEIOB (FLAG) IP) using anti-FLAG antibody. Full-length and truncated forms of MEIOB were expressed alone (lanes 2 to 5) or coexpressed with SPATA22 (lanes 6 to 9). SPATA22 immunoprecipitated proteins was detected by western blotting using anti-HA antibodies. Tagged-full length MEIOB, Δ OBCD3, OBCD3 and Δ 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 HEK293 cells and SPATA22 (SPATA22 (HA) IP) was immunoprecipitated with anti-HA antibody. Full-length or truncated forms of SPATA22 were expressed alone (lanes 2 to 5) or coexpressed with MEIOB (lanes 6 to 9). MEIOB immunoprecipitated proteins was detected by western blotting using anti-FLAG antibody. Tagged full-length SPATA22, Δ OBCD, OBCD and Δ C helix were detected with anti-HA and displayed expected sizes of 44, 30, 18 and 41 kDa. (*) represents a non-specific band or a post-translational modification of SPATA22 OBCD that displays a molecular weight greater than 30 kDa. (#) MEIOB is retained slightly in a non-specific manner on the anti-HA column. The data are representative of a minimum of two independent experiments.

RPA is thought to exist primarily as a complex containing its three subunits, and no functional sub-complexes have been described to our knowledge. This assumption is reinforced by the fact that the absence of RPA1 induces the disappearance of RPA2 and RPA3 in spermatocytes [26]. Based on ectopic expressions in human cells, murine MEIOB and SPATA22 have been shown to co-immunoprecipitate with individual subunits of murine RPA (MmMEIOB interacts with MmRPA1, and MmSPATA22 with MmRPA1 and MmRPA2) [12]. However, whether and how MEIOB and SPATA22 together can interact with the RPA complex containing the three subunits has not been addressed. We took advantage of the fact that the HsRPA complex is constitutively present in human cultured cells to seek whether RPA co-immunoprecipitates with HsMEIOB and/or HsSPATA22. Endogenous subunits of RPA did not co-immunoprecipitate with HsMEIOB or HsSPATA22 alone (Fig. 3A, lane 2, 3B, lane 7, S1A, lane 2, and S1B, lane 2). MEIOB and SPATA22 need to be co-expressed to co-immunoprecipitate endogenous RPA1 and RPA2, irrespective of whether MEIOB or SPATA22 is co-immunoprecipitated (Fig. 3A, lane 5, and 3B, lanes 4 and 9, and Fig. S1A, lane 6, and S1B, lane 6). Unfortunately, we were not successful in detecting RPA3 in co-IP experiments, likely due to the sensitivity of the RPA3 antibody. We further looked at the modality of these interactions, and demonstrated that the OBCD of SPATA22 and OBCD3 of MEIOB were necessary (Fig. S1A, lane 7, 2B,C, lane 7, and Fig. S1B, lane 7) and sufficient (Fig. 3A, lane 6, and Fig. S1A,B, lane 8), not only to interact with each other (see above), but also to interact with endogenous RPA. Xu et al. showed that MEIOB and SPATA22 interacted with RPA subunits through domains falling outside of their dimerization core. They used individually overexpressed RPA subunits, whereas we worked in the presence of the endogenous three subunits. Together, these results could suggest that the modality of interaction of MEIOB and SPATA22 with single subunits differ from that with the full RPA complex. To test this hypothesis, we expressed exogenous HsRPA1, the large subunit of RPA, with HsMEIOB and/or HsSPATA22 (Fig. 3B). We failed to detect an overexpression of RPA1 in the extract, likely due to its poor stability, but were able to co-IP RPA1 when expressed with MEIOB full-length or MEIOB Δ OBCD3 alone (Fig. 3B, lanes 2 and 3). Interestingly, when RPA1 was overexpressed, we were also able to co-IP endogenous RPA2, suggesting that overexpressed RPA1 tended to form a complex with other RPA subunits, likely to be stabilized in cells. These results suggest that, as previously observed, when overexpressed, RPA1 can interact with OBCD2 of MEIOB [12]. However, within the four attempts we did, we had reproducible issues and found that this interaction appeared weak and variable. Fig. 3B shows the best results that we obtained, whereas an example of weaker signals is presented Fig. S2. On the contrary, we obtained a robust and reproducible co-IP of endogenous RPA when MEIOB and SPATA22 were expressed together, regardless of over-expression of RPA1 (Fig. 3A,C). These results demonstrate that C-terminal OBCDs

of MEIOB and SPATA22 are essential and sufficient to form the MEIOB–SPATA22 complex and represent the principal site of interaction with the RPA complex (Fig. 3C).

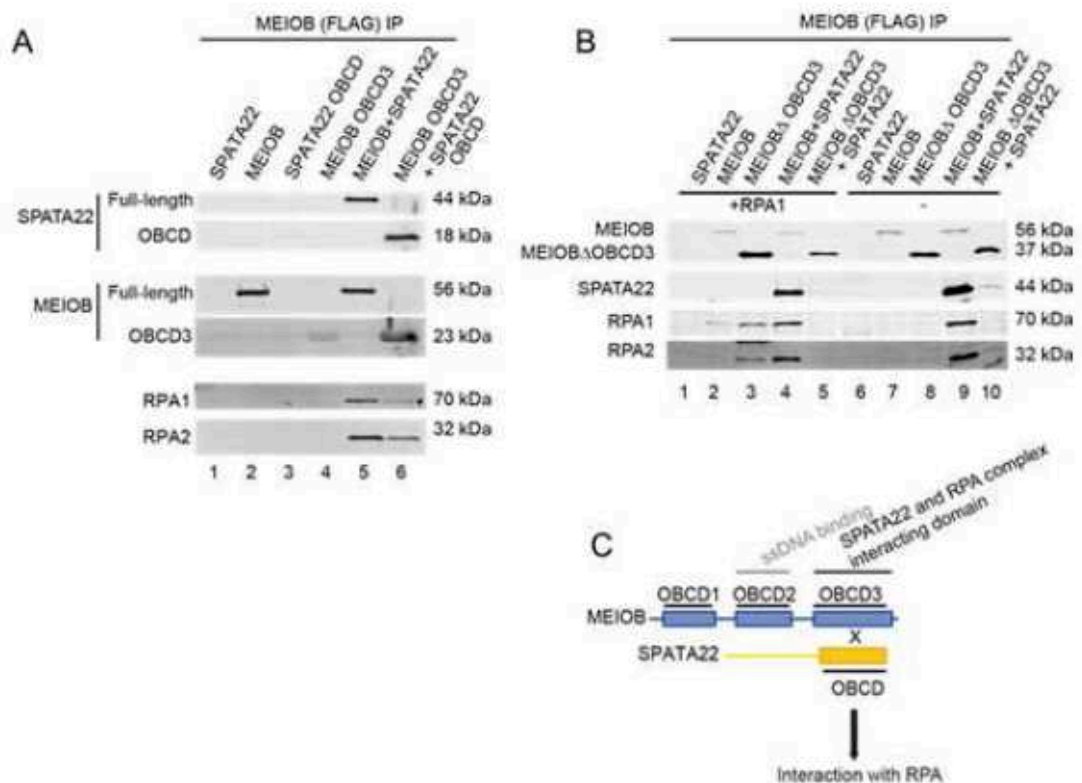


Figure 3. MEIOB and SPATA22 interacts with RPA with their dimerization core.

(A) MEIOB and/or SPATA22 were transfected in HEK293 cells, and MEIOB was immunoprecipitated (MEIOB (FLAG) IP) using anti-FLAG antibody. Full-length SPATA22 and full-length MEIOB were expressed alone (lanes 1 and 2) or coexpressed (lane 5). SPATA22 OB CD and MEIOB OB CD3 were expressed alone (lanes 3 and 4) or coexpressed (lane 6). MEIOB, SPATA22, RPA1 and RPA2 immunoprecipitated proteins were detected anti-FLAG, anti-HA, anti-RPA1 or anti-RPA2 antibodies respectively. The data are representative of two independent experiments. (B) SPATA22 and/or full length or truncated MEIOB with or without RPA1 were transfected in HEK293 cells, and MEIOB was immunoprecipitated (MEIOB (FLAG) IP) using anti-FLAG antibody. MEIOB, SPATA22, RPA1 and RPA2 immunoprecipitated proteins were detected with anti-FLAG, anti-HA, anti-RPA1 or anti-RPA2 antibodies respectively. (C) Model of interactions between MEIOB, SPATA22 and RPA, this work and [11].

MEIOB–SPATA22 directly binds and changes the structure of the RPA-coated ssDNA

To gain insight into the role of the interaction of MEIOB–SPATA22 with RPA, we attempted to purify MEIOB and SPATA22 for *in vitro* assays. Despite numerous attempts, we failed to purify MEIOB or SPATA22 individually, but we achieved co-purification by GST pulldown after their co-expression in insect cells (Fig. 4A). We compared protein-coated ssDNA containing RPA and/or MEIOB–SPATA22 by transmission electron microscopy

(TEM). Under saturating conditions, human RPA uniformly coated circular ssDNA (Fig. 4B). In contrast, MEIOB-SPATA22 did not distribute uniformly, but rather accumulated locally when added to circular ssDNA (Fig. 4B). When MEIOB-SPATA22 was added to the preformed RPA-coated ssDNA, the circular nucleoprotein complex became thicker and its contour length decreased (Fig. 4B,C). Importantly, the addition of MEIOB-SPATA22 did not modify the preformed nucleoprotein complexes of ssDNA and SSB, a bacterial ssDNA-binding protein, confirming specificity of the functional interaction between MEIOB-SPATA22 and RPA (see Fig. 4B,C for quantification). These results suggest that MEIOB-SPATA22 interacts specifically with RPA-coated ssDNA to change its conformation (Fig. 4D).

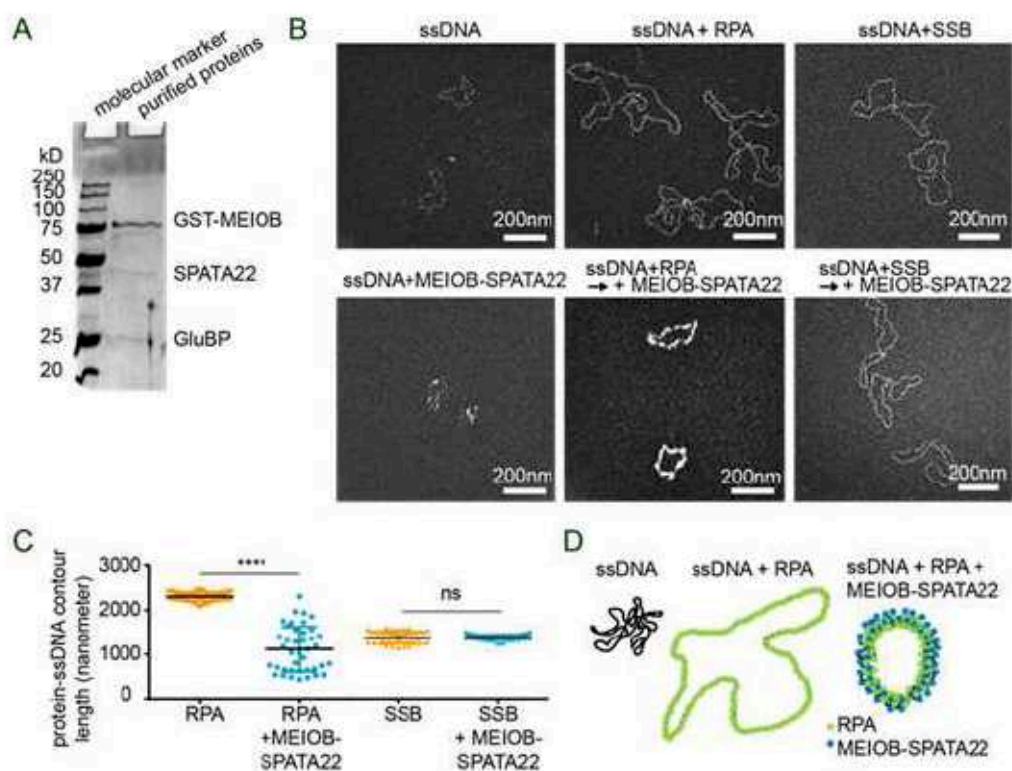


Figure 4. MEIOB/SPATA22 condenses the ssDNA-RPA filament.

(A) Purified GST-MEIOB-SPATA22 analyzed by SDS-PAGE (1.2 g of protein). GluBP: endogenous glutathione-binding protein from insect host cells that coelutes with MEIOB-SPATA22. (B) Transmission electron microscopy (TEM) images of circular ssDNA (X174 viroion) incubated alone, with RPA, or with SSB are shown in the top panel. Bottom panel shows images of ssDNA incubated with MEIOB-SPATA22, with or without prior incubation with RPA/SSB (approximately one RPA per 20 nucleotides, one SSB tetramer per 10 nucleotides, and one MEIOB-SPATA22 per 400 nucleotides). The incubation of MEIOB-SPATA22 with ssDNA forms heterogeneous bright structures, suggesting that MEIOB-SPATA22 forms aggregates in the presence of ssDNA. RPA covers the circular ssDNA to form a homogeneous complex. The addition of MEIOB-SPATA22 to preformed RPA-ssDNA complexes condenses the RPA-coated ssDNA. (C) Quantification of protein-coated ssDNA contour length in the presence of RPA or SSB alone, or with the addition of MEIOB-SPATA22. Lines depict mean \pm SD, n=42 molecules for RPA, n=40 molecules for RPA+MEIOB-SPATA22, n=41 molecules for SSB and n=42 molecules for SSB+MEIOB-SPATA22; **** represents $p < 0.0001$ (two tailed, Mann-Whitney test); ns: nonsignificant. (D) Model showing ssDNA covered with RPA or with RPA and MEIOB-SPATA22. RPA binds ssDNA and prevents the formation of secondary structures. MEIOB-SPATA22 condenses RPA-coated ssDNA.

To verify that MEIOB–SPATA22 and RPA subunits coexist on ssDNA, we performed electrophoretic mobility shift assays and immunoblot analyses. Increasing amounts of MEIOB–SPATA22 were incubated with a Cy5-labeled 46-mer ssDNA that either was or was not preincubated with a saturating amount of RPA (Fig. 5A). The altered migration of ssDNA induced by the addition of proteins was visualized on non-denaturing acrylamide gels (Fig. 5B). The addition of increasing amounts of MEIOB–SPATA22 in the absence of RPA induced multiple band shifts (Fig. 5B, short and long migration, lanes 3–5). This result shows that the MEIOB–SPATA22 complex binds ssDNA. Due to experimental limitations, we were unable to obtain a concentration of MEIOB–SPATA22 that would allow us to reach saturating conditions in this assay (i.e., free ssDNA remains after the addition of the highest amount of MEIOB–SPATA22; Fig. 5B, short migration, lane 5). Interestingly, when increasing amounts of MEIOB–SPATA22 were added to ssDNA that had been preincubated with RPA, we detected an accumulation of molecules with lower mobility compared to RPA-coated ssDNA molecules (asterisk in Fig. 5B, long migration, lanes 6–9). To verify that MEIOB and SPATA22 were present, along with RPA, in these super-shifted bands, the migration products were transferred to a membrane and immunostained for MEIOB, SPATA22, and RPA subunits. To allow multiple independent immunostainings, samples were loaded twice. Immunostaining for MEIOB or SPATA22 alone without ssDNA revealed that the two proteins migrated as a complex (Fig. 5C, lane 1). They did not migrate as a single discrete band, but showed a long smear, suggesting that the complex may adopt different structures (Fig. 5C, lane 1). MEIOB and SPATA22 were both detected on shifted ssDNA in the absence of RPA, which shows that MEIOB–SPATA22 binds ssDNA (Fig. 5C, lanes 3–5). In the presence of RPA, MEIOB and SPATA22 were both detected on molecules with the lowest mobility (asterisk in Fig. 5C, lanes 7–9). Immunostaining of the RPA subunits RPA1, RPA2, and RPA3 showed that they were also present on these molecules, supporting the idea that MEIOB–SPATA22 and RPA coexist on ssDNA (asterisk in Fig. 5C, lanes 7–9). As expected, RPA subunits were detected on shifted ssDNA in the absence of MEIOB–SPATA22 (Fig. 5C, lane 6, shifts 1 and 2). The fact that these molecules persisted after the addition of increasing amounts of MEIOB–SPATA22 suggests that a large portion of the RPA-coated ssDNA remained unbound by MEIOB–SPATA22 under our experimental conditions (Figures 5C, lanes 7–9, shifts 1 and 2, and Fig. SI, S3).

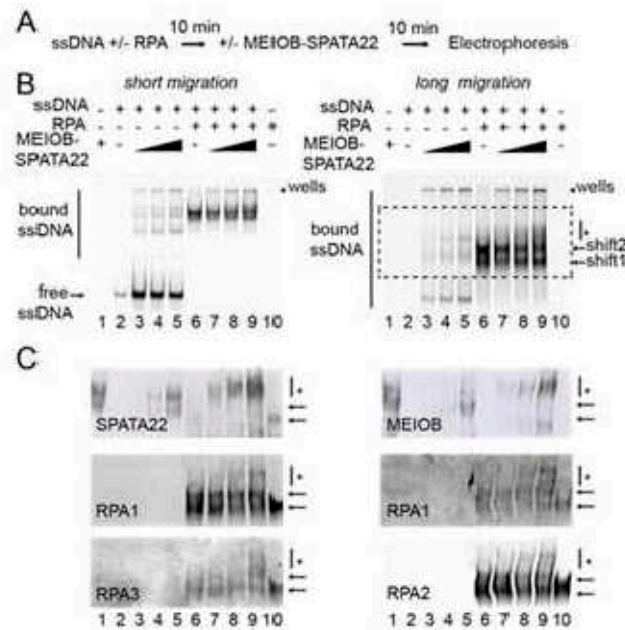


Figure 5. MEIOB-SPATA22 coexists with RPA on ssDNA.

(A) Schematic representation of the gel shift assay performed. A Cy5-labeled 46-mer ssDNA was incubated with or without RPA. Increasing amounts of MEIOB-SPATA22 was added to the reactions, and protein-ssDNA complexes were resolved by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis. (B) Gel shift assay with a short gel migration time (left panel) and a longer migration time (right panel) for the same gel. The addition of RPA to ssDNA induces two shifted bands (arrows 1 and 2). The addition of MEIOB-SPATA22 to preformed RPA-coated ssDNA induces additional smeared shifted bands (* in right panel). (C) Proteins within the dotted rectangle in panel B (long migration) were detected using anti-RPA1, anti-RPA2, anti-MEIOB, or anti-SPATA22 antibodies. Full-size scans are presented in SI Appendix, Fig. S3. RPA1, in the left and right panels, was detected with two different antibodies due to experimental limitations. Data are representative of two independent experiments. MEIOB and SPATA22 comigrate with ssDNA and RPA subunits in the smeared shifted bands (*).

MEIOB-SPATA22 changes the dynamic of detection of the subunits of RPA in vivo

Results obtained *in vitro* demonstrate that the presence of MEIOB-SPATA22 can change the conformation of the RPA-coated ssDNA. Such modifications could consequently change the accessibility of the RPA subunits *in vivo*. To test this hypothesis, we compared the intensity of the signal of RPA1 foci to the one of RPA2 foci in the presence or absence of MEIOB-SPATA22 *in vivo*. We first looked at RPA foci formed on DNA lesions induced by Camptothecin exposure in cultured human cells (Fig. 6A). As expected, RPA1 and RPA2 appeared as bright, colocalized foci with correlated intensities (Fig. 6A, offset and graph). Interestingly, during wild-type meiosis, the RPA1 foci intensity did not correlate with the RPA2 foci intensity, whereas during meiosis in *Meiob*^{-/-} mice, good correlation was observed with a similar profile to that in culture cells (Fig. 6B, offsets and graphs). These results indicate that the presence of MEIOB-SPATA22 changes RPA detection, possibly due to the conformational shape of the protein-coated ssDNA.

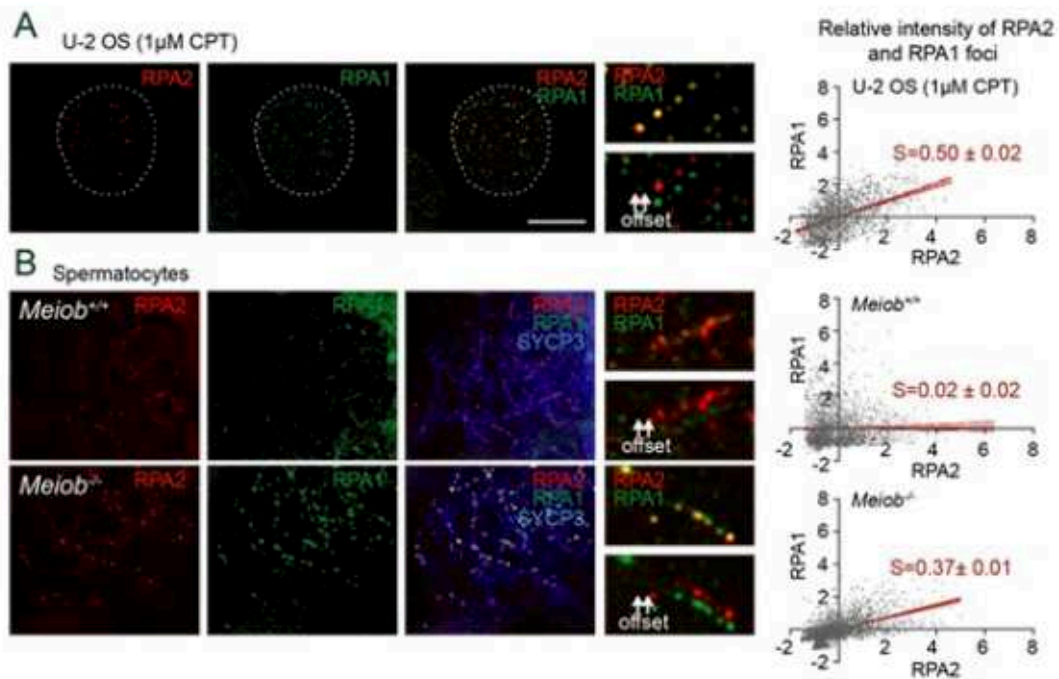


Figure6. MEIOB-SPATA22 changes the dynamic of detection of the subunits of RPA *in vivo*.

(A) Representative U-2 OS cell treated with 1 μ M camptothecin and immunostained for RPA1 (green) and RPA2 (red). The white dashed line highlights the nucleus. Right panels show magnified views of representative regions containing RPA1 and RPA2 foci (merges (up) and offsets (down)). The relative intensity of RPA1 foci as a function of the relative intensity of RPA2 foci is presented in the plot after Z-score standardization. Each point represents one focus ($n=2023$ foci, S =slope of the linear regression with 95% intervals shown in red, $R^2=0.24$). (B) Representative wild-type and *MeioB*^{-/-} spermatocyte nuclei immunostained for RPA1 (green) and RPA2 (red). Right panels show magnified views of representative RPA1 and RPA2 foci-containing regions (merges (up) and offsets (down)). RPA intensities are plotted as described for panel A. *MeioB*^{+/+} (two mice, $n=2131$ foci, $R^2=0.0004$); *MeioB*^{-/-} (two mice, $n=2763$ foci, $R^2=0.29$).

3. Discussion and conclusion

RPA interacts primarily with the dimerization core of MEIOB–SPATA22

Herein, we deciphered the modalities and the role of MEIOB, SPATA22, and RPA interactions. We took advantage of the current knowledge of the RPA structure to evidence that MEIOB and SPATA22 share many structural features with the RPA subunits (Fig. 1). The similarities existing between MEIOB and RPA1 are reinforced by the fact that specific features of RPA1 OBCD3, namely, the insertion of a zinc ribbon and helix-turn-helix motif, are found in MEIOB OBCD3. These observations support the idea that MEIOB originates from a duplication of RPA1 (Fig 1A; HsRPA1). Interestingly, we showed that SPATA22 possesses, in its C-terminal part, a putative OBCD that resembles that of RPA2 or RPA3. Based on these homologies, we demonstrated that MEIOB and SPATA22 interact with each other in an RPA-like manner (Fig. 3). In particular, we showed that the last OBCD (OBCD3) of MEIOB and the OBCD of SPATA22 are not only necessary, but are also sufficient for their interaction, and consequently form a minimum dimerization core. Previously, Xu et al. identified MEIOB and SPATA22 mutations that abolished their interaction. In agreement with our results, these mutations fall into the OBCD3 of MEIOB and the OBCD of SPATA22, likely disturbing the folding of these domains required for the interaction [12]. The importance of this interaction has been also evidenced by a recent report of a human mutation that induces primary ovarian failure (POI) [25]. This mutation is predicted to induce the formation of a MEIOB protein that lacks most of its OBCD3 domain, preventing its interaction with SPATA22 [25].

We demonstrated that MEIOB and SPATA22 need to interact with each other to interact with the preformed endogenous RPA complex through their dimerization core (Fig. 3A). When expressed alone, MEIOB and SPATA22 poorly interact with RPA. When RPA1 and MEIOB are co-expressed, the two proteins may co-immunoprecipitate, as described previously (Fig. 3C) [12]. However, this interaction is really weak compared to the interaction between MEIOB–SPATA22 and endogenous RPA (Fig. 3C). We therefore propose that MEIOB–SPATA22 interacts with the preformed RPA complex primarily through the MEIOB–SPATA22 dimerization core, and their interaction may be further stabilized by secondary independent contacts between RPA1 and/or RPA2 and the regions of MEIOB and SPATA22 that are located outside of their dimerization core.

MEIOB–SPATA22 and RPA form with ssDNA a highly compacted protein-coated ssDNA

To address the molecular properties of MEIOB and SPATA22, we attempted to purify the two proteins. As they are strongly insoluble, we failed to purify individual MEIOB and SPATA22, but managed to purify them together. Although we could not recover a large amount of proteins, we were able to perform informative small-scale analysis by transmission electron microscopy. Given that, we showed that MEIOB–SPATA22 and RPA coexist on ssDNA and form highly compacted protein-coated ssDNA compared to RPA-coated ssDNA. Interestingly this property is specific of RPA, as no change was observed on the SSB-coated ssDNA when MEIOB–SPATA22 was added. While the band shift assay demonstrates the coexistence of MEIOB, SPATA2, and RPA on ssDNA, and RPA subunits are believed to be essentially complexed into RPA, we cannot rule out the possibility that there are mixed individual complexes containing MEIOB, SPATA22, and/or RPA2 or RPA3. The existence of such complexes can also explain the disparity in RPA1 and RPA2 immunodetection in *Meiob*^{+/+} spermatocytes (Fig. 6B). Another possible explanation could be that the detection of the complex MEIOB–SPATA22–RPA–ssDNA by specific antibodies becomes difficult and stochastic because of its high condensation.

Why would RPA-coated ssDNA need to be modified during meiotic HR?

We previously showed that MEIOB was loaded onto meiotic chromosomes in *Dmc1*^{-/-} mice that are unable to perform strand invasion of the homolog, and therefore proposed that MEIOB could play a role in modulating presynaptic recombinogenic filaments [10]. Several RPA-interacting proteins have been shown to modulate the ssDNA-binding activity of RPA [27]. For example, BRCA2, with the help of DSS1, locally displaces RPA and overcomes RPA inhibition of RAD51- and DMC1-loading onto ssDNA [28–31]. One possibility is that MEIOB–SPATA22 limits RPA displacement by reducing its accessibility to specific factors and preventing extensive polymerization of one or both recombinases. Recent biochemical data demonstrated that DMC1 displaces more efficiently RPA from ssDNA compared to RAD51, and that they form homotypic extended filaments [32]. These data support the idea that MEIOB–SPATA22 may function to reinforce RPA–ssDNA binding to prevent excessive DMC1 loading during meiosis. Such a scenario would suggest that specific proteins may be necessary to help BRCA2 to remove MEIOB–SPATA22 from ssDNA. MEILB2/HSF2BP, a newly identified interactant of BRCA2 and SPATA22, would be a good candidate for this function [33,34].

The fact that MEIOB, SPATA22, and RPA foci persist longer than the recombinase foci is consistent with a potential role during the maturation of D-loops. Indeed, in addition to its role in recombinogenic filament formation, RPA binds the displaced strand (D-loop) to facilitate strand invasion [5] [7]. MEIOB, SPATA22, and RPA colocalize and form bright foci in the late zygotene and early pachytene stages, which is consistent with their loading onto D-loops during meiotic recombination [10] [11]. It is tempting to speculate that the compaction of RPA-coated ssDNA by MEIOB–SPATA22 provides D-loops with specific properties that are essential for meiotic recombination. These properties could influence D-loop stabilization, migration, or extension. They could also change the affinity of RPA-coated ssDNA for partners. A tempting hypothesis would be that stabilizing the D-loop could favor paralogous and formation of double Holliday junctions to ensure crossovers.

To conclude, we propose that RPA, MEIOB, and SPATA22 work closely together during meiotic recombination. Their combined action may have evolved to satisfy the requirements of meiotic homologous recombination as a means of formation and regulation of a mixed recombinogenic filament and/or specific D-loop outcomes, both hypotheses being non-exclusive. Further cellular approaches and biochemical assays with purified factors will be necessary to better characterize their roles.

4. Materials and methods

Protein structures

Models were obtained using the RaptorX server [19]. Molecular graphics were performed with the UCSF Chimera package [35]. Chimera is developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (supported by NIGMS P41-GM103311).

Cell culture and plasmid transfections

Cells were cultivated in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C. Human Embryonic Kidney cells (HEK-293, ATCC) and U-2 OS cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco). Each cell line was regularly screened for the absence of mycoplasma contamination by DAPI staining. Plasmid transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

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 [10]. The mice used in this study were on a 129/Sv x C57BL/6 x NMRI mixed background and were previously described in [10]. To minimize variability from the strain background, experimental animals were compared to littermate controls. The 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 were published in [10].

Plasmid constructions

Before use, all constructs were validated by DNA sequencing. To express 3xHA N-terminal-tagged full-length human SPATA22, Δ OBCD SPATA22, Δ C helix SPATA22, and OBCD domain variants in human cells for co-IP, we generated pKH3-HsSPATA22 in full length, Δ OBCD, Δ C helix, and OBCD-only variations. The desired fragments of human SPATA22 cDNA were amplified by PCR

from pCMV6-XL5-HsSPATA22 (Origene, cat# SC123038), and PCR products were digested by EcoRI and BamHI and cloned into pKH3 plasmid (Addgene [36]). To express 3xHA N-terminal tagged HsSPATA22 in a cell-free system, we generated pcDNA3.1(-) 3xHA-HsSPATA22. pKH3-HsSPATA22 plasmid was digested with *Xba*I and *Eco*RI, and the digested fragment was cloned into pcDNA3.1(-) plasmid (Invitrogen). To express the truncated forms of MEIOB in human cell lines for co-IP, pCMV6-HsMEIOB-MYC-FLAG (Origene, cat# RC228391) was amplified by PCR and ligated to generate pCMV6-HsMEIOB Δ OBCD3-MYC-FLAG, pCMV6-HsMEIOB Δ Chelix-MYC-FLAG, and pCMV6-HsMEIOB OBCD3-only-MYC-FLAG.

pFBGW-GST-HsMEIOB/His6-HsSPATA22/HsRPA2, a vector to enable the concomitant expression of the three proteins in insect cells, was constructed in three steps. First, the human MEIOB coding sequence was amplified from pCMV6-HsMEIOB-MYC-FLAG (Origene, cat# RC228391). The resulting PCR product was then cloned using the Gateway system (Invitrogen); it was inserted in pDONOR207 during the Gateway BP reaction, and subsequently transferred into 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 the human MEIOB by PCR. Second, the human SPATA22 coding sequence was released from pET15b-HsSPATA22 by *Nde*I-*Bam*HI digestion and inserted into pFCHGW plasmid (obtained from D. Busso). The sequence corresponding to the His6-HsSPATA22 coding sequence was digested by *Not*I-*Xba*I for insertion into the previously obtained vector encoding GST-HsMEIOB. Finally, the human RPA2 coding sequence was released from pET3a-HsRPA2 (kindly provided by MS. Wold) by *Nde*I-*Bam*HI digestion and inserted into pFC0GW plasmid (obtained from D. Busso). The sequence corresponding to the human RPA2 coding sequence was digested by *Not*I-*Xba*I for insertion into 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 the p10 promoter, and allowed the expression of His6-HsSPATA22 and HsRAP2 under the control of the pH promoter. Recombinant baculovirus was constructed using the MultiBac system [37].

Protein purification

High Five cells were infected with recombinant baculovirus at a multiplicity of infection of 5×10^3 . After incubation at 27 °C for 5 days, cells were harvested, resuspended at 1.7×10^7 cells.ml⁻¹ in 50 mM pH 7.2 phosphate buffer, 130 mM NaCl, 1 mM 1,4-dithiothreitol, 1X Triton X-100, 1 mM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 2 μ M pepstatin, and 5 μ g.ml⁻¹ leupeptin, and then disrupted by sonication. The extract was cleared by centrifugation at 150,000x 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 5 mM glutathione (GSH). Purified GST–MEIOB/His–SPATA22 complex was stored at 4 °C. Although MEIOB, SPATA22, and RPA2 were co-expressed, only MEIOB and SPATA22 were retained on the GSH column, as confirmed by the Western blot analysis of band shift assays in Fig 5C (right panel, lanes 1–5). The purified complex was analyzed by SDS-PAGE (Fig 4C; 1.2 µg of total proteins). After staining with Coomassie Blue, the gel was scanned using a Gel DocTM EZ from BioRad and visualized with Image LabTM software. Note that a high amount of endogenous glutathione-binding protein was co-purified with the GST–MEIOB/His–SPATA22 fraction and is present in the electron microscopy experiments and electrophoretic mobility shift assays. However, the addition of this protein alone was insufficient to induce the condensation of the RPA-coated ssDNA. Recombinant human RPA was purified as previously described [38].

ssDNA pulldown assay

ssDNA and dsDNA pulldown assays were performed as previously described with some modifications [10]. The HPLC-purified biotinylated 59-bp-long oligonucleotide 5'-GAT CTG CAC GAC GCA CAC CGG ACG TAT CTG CTA TCG CTC ATG TCA ACC GCT CAA GCT GC-3'-biotin-TEG and its complementary oligonucleotide were used for the pulldown assay. Double-strand hybridization was performed in 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer with the biotinylated oligonucleotide and its complementary oligonucleotide at 1:1.5 ratio by denaturing for 3 min at 94 °C and allowing a slow progressive return to room temperature. Human recombinant MEIOB–MYC–FLAG and 3xHA-tagged SPATA22 were produced in a cell-free system. The TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) was used with pCMV6–HsMEIOB–MYC–FLAG and pcDNA3.1(-)3xHA–HsSPATA22 full-length plasmids in a 50 µl reaction according to the manufacturer's instructions. Twenty microliters of recombinant HsSPATA22 or HsMEIOB from cell-free extracts and 500 µg of Dynabeads M-280 Streptavidin (Life Technologies) with immobilized ssDNA or dsDNA were incubated in 430 µl 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 β-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, beads were washed twice in 500 µl binding buffer without BSA and then washed once in 500 µl rinsing buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 0.05% Tween 20, 10% glycerol, 1 mM β-mercaptoethanol, complete protease inhibitor without EDTA (Roche)). Bound proteins were eluted directly in Laemmli buffer and boiled for 5 min at 95 °C before magnetic separation of beads and Western blotting.

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 μ M MG-132 (Sigma-Aldrich), followed by 10 min of medium sonication (30 sec on, 30 sec off) and centrifugation at 16,200x g for 10 min at 4 °C. Extracts were diluted 4-fold in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol except for HA IP, 10 mg/ml BSA, complete protease inhibitor without EDTA, Roche, 10 μ M MG-132, and 90 U/ml Benzonase nuclease, Novagen). Extracts from $\sim 5 \times 10^6$ cells were used for IP with 25 μ l 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, beads were washed twice with Benzonase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM MgCl₂, 1 mM beta-mercaptoethanol except for HA IP, 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 μ l of Laemmli buffer and boiled for 5 min at 95 °C before magnetic separation of beads and Western blotting.

Western blotting

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 for FLAG IPs, HA IPs, and ssDNA pulldown assays, respectively. Separated proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare) before hybridization with appropriate primary antibodies and fluorescent dye-coupled secondary antibodies (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 or a Typhoon 5 imager (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

Transmission electron microscopy (TEM) analysis

ϕ X174 ssDNA (30 μ M (nucleotide), New England Biolabs, N3023) was incubated with 1.5 μ M hRPA (one protein heterotrimer per 20 nucleotides), 1.5 μ M SSB (one protein homotetramer per 10 nucleotides), or no protein in buffer containing 10 mM Tris (pH 7.5) and 150 mM NaCl for 3 min at 37 °C. Then, 75 nM GST-MEIOB/His-SPATA22 (approximately one protein heterodimer per 400 nucleotides) was added to the reaction and incubated for 7 min at 37 °C. TEM samples were prepared by positive staining as previously described [39]. Five microliters of diluted DNA-protein reaction was deposited onto a 600 mesh copper grid coated with a thin carbon film that was previously

activated by glow discharge in the presence of pentylamine (Merck, France). After 1 min, grids were washed with aqueous 2% (w/vol) uranyl acetate (Merck, France) and then dried with ashless filter paper (VWR, France). TEM was performed 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). Contour length measurements of the molecules were made with the iTEM software.

Electrophoretic mobility shift assays

The 5' end-Cy5-labeled 46-mer ssDNA (2.5 μ M nucleotides) was incubated for 10 min at 37 °C alone or with 0.5 μ M of human RPA (one protein heterotrimer per 5 nucleotides) in buffer containing 50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM 1,4-dithiothreitol, and 10 % glycerol. Then, varying amounts of GST-MEIOB/His-SPATA22 (0.08, 0.17, and 0.3 μ M corresponding to approximately one heterodimer per 10 nucleotides) were added and incubated for 10 min at 37 °C. Protein-DNA complexes were fixed with 0.01% glutaraldehyde. The reaction products were then analyzed using 5 % polyacrylamide gels (acrylamide/bisacrylamide = 79:1) in 1x Tris Borate EDTA at 4 °C. Images were acquired using a Typhoon 5 imager (GE Healthcare Life Science). Western blot analysis was performed as follows. Briefly, polyacrylamide gels were washed three times with transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 0.2 M glycine, 0.015% SDS) for 10 min. Proteins were transferred onto PVDF membranes with a semidried blotter (Biorad) at 15 V for 1.25 h. Membranes were saturated with PBS containing 0.05% Tween-20 and 5% milk. Hybridizations were performed with appropriate primary antibodies and fluorescent dye-coupled or HRP-coupled secondary antibodies (see Table S1 for antibodies). Images were acquired using a Typhoon 5 scanner for fluorescent staining (GE Healthcare Life Sciences) and analyzed with ImageJ software. Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (ThermoFisher Scientific) was used to visualize proteins.

Drug treatments and Immunofluorescence on U-2 OS

U-2 OS cells were grown on glass cover slides for 24 h before experiments. Cells were treated with 1 μ M camptothecin (Sigma-Aldrich) for 1 h and allowed to recover for 3 h. To specifically analyze chromatin-associated proteins, cells were permeabilized with Triton X-100 before fixation with paraformaldehyde as previously described [40]. Briefly, cells were washed with PBS supplemented with 500 μ M MgCl₂ and 500 μ M CaCl₂ (PBS-S), then washed with CSK buffer (10 mM PIPES, pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂) 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 then washed again with PBS-S. Before staining, cells were blocked with PBS-S containing 0.1% Tween-20 (PBS-S-T) and 5% BSA. Cells were incubated with primary antibodies in PBS-S-T containing 5% BSA and then washed with PBS-S-T and incubated with the appropriate fluorescent dye-coupled secondary antibodies (see Table S1 for

antibodies). After two washes in PBS-S, cover slides 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 and a 100x Olympus objective (UPlan Apo 1.35 oil immersion). Images were analyzed using ImageJ software. Quantification of RPA1 and RPA2 foci intensity was done with ImageJ using images acquired with an epi-fluorescence microscope. Areas of RPA2 foci were selected with the software, subjected to a threshold, and intensities of RPA1 and RPA2 signals corresponding to the selected areas were quantified. For each slide, the signal was z-score standardized $((\text{data} - \text{mean})/\text{standard deviation})$.

Immunofluorescence on preparations of chromosome spreads

Chromosome spreads of spermatocytes were performed as previously described with modifications [41]. 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 then washed with H₂O plus 0.4% Photo-Flo (Kodak) after soft drying. For immunofluorescence analyses, spreads were blocked in blocking buffer containing 0.2% BSA, 0.2% cold-water fish skin gelatin, and 0.05% Tween 20 in PBS. Slides were incubated with primary and secondary antibodies in blocking buffer and rinsed 3 times with 0.05% Tween 20 in PBS. Primary antibodies were incubated overnight at room temperature. 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. Chromosome spreads were visualized with an AX70 epi-fluorescent microscope as described above. Images were analyzed using ImageJ software. Quantification of RPA1 and RPA2 foci intensity was performed as described above.

Acknowledgements : We thank members of the Laboratory of the Development of the Gonads for discussions and technical support, and are especially grateful to M.J Guerquin for data analysis. We thank members of the animal housing facility at iRCM, in particular V. Neuville and S. Vincent-Naulleau. We thank M.S. Wold for RPA plasmids and P. Drevet for development of the baculovirus system. 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.

The authors declare that they have no conflict of interest. Reagents and mouse strains are available upon request. All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the regulatory standards and were approved by the Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) Institutional Animal Care and Use Committees.

Table S1. Antibody table.

primary antibodies					
Target	Species	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	1:1000
HA tag	Rabbit	Ab9110	Abcam	-	1:1000
FLAG tag	Chicken	Ab1170	Abcam		1:1000
MEIOB	Rabbit	Ab178756	Abcam	-	1:500
SPATA22	Rabbit	16989-1-AP	Proteintech		1:1000
SYCP3	Rabbit	NB300-232	Novus	1 :500	

References

- [1] A. Mehta, J.E. Haber **Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6 (2014), pp. a016428, 10.1101/cshperspect.a016428
- [2] W.D. Heyer **Regulation of recombination and genomic maintenance.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (2015), pp. a016501, 10.1101/cshperspect.a016501
- [3] E. Alani, R. Thresher, J.D. Griffith, R.D. Kolodner **Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein** *J Mol Biol*, 227 (1992), pp. 54-71, 0022-2836(92)90681-9 [pii]
- [4] T. Sugiyama, E.M. Zaitseva, S.C. Kowalczykowski **A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein** *J Biol Chem*, 272 (1997), pp. 7940-7945,
- [5] X. Wang, J.E. Haber **Role of *Saccharomyces* single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair.** *PLoS Biol*, 2 (2004), pp. E21, 10.1371/journal.pbio.0020021
- [6] P. Sung, L. Krejci, S. Van Komen, M.G. Sehorn **Rad51 recombinase and recombination mediators.** *J. Biol. Chem.*, 278 (2003), pp. 42729-42732, 10.1074/jbc.R300027200
- [7] A.L. Eggler, R.B. Inman, M.M. Cox **The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A.** *J Biol Chem*, 277 (2002), pp. 39280-39288, 10.1074/jbc.M204328200
- [8] J.L. Sneeden, S.M. Grossi, I. Tappin, J. Hurwitz, W.D. Heyer **Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins.** *Nucleic Acids Res*, 41 (2013), pp. 4913-4925, 10.1093/nar/gkt192
- [9] J. Ribeiro, E. Abby, G. Livera, E. Martini **RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination.** *Chromosoma*, 125 (2016), pp. 265-276, 10.1007/s00412-015-0552-7
- [10] B. Souquet, E. Abby, R. Herve, F. Finsterbusch, S. Tourpin, R. Le Bouffant, C. Duquenne, S. Messiaen, E. Martini, J. Bernardino-Sgherri, A. Toth, R. Habert, G. Livera **MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination.** *PLoS Genet*, 9 (2013), pp. e1003784, 10.1371/journal.pgen.1003784
- [11] M. Luo, F. Yang, N.A. Leu, J. Landaiche, M.A. Handel, R. Benavente, S. La Salle, P.J. Wang **MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination.** *Nat Commun*, 4 (2013), pp. 2788, 10.1038/ncomms3788
- [12] Y. Xu, R.A. Greenberg, E. Schonbrunn, P.J. Wang **Meiosis-specific proteins MEIOB and SPATA22 cooperatively associate with the single-stranded DNA-binding replication protein A complex and DNA double-strand breaks.** *Biol Reprod*, 96 (2017), pp. 1096-1104, 10.1093/biolre/iox040
- [13] S. La Salle, K. Palmer, M. O'Brien, J.C. Schimenti, J. Eppig, M.A. Handel **Spata22, a novel vertebrate-specific gene, is required for meiotic progress in mouse germ cells.** *Biol Reprod*, 86 (2012), pp. 45, 10.1095/biolreprod.111.095752

- [14] E. Hays, N. Majchrzak, V. Daniel, Z. Ferguson, S. Brown, K. Hathorne, S. La Salle **Spermatogenesis associated 22 is required for DNA repair and synapsis of homologous chromosomes in mouse germ cells.** *Andrology*, 5 (2017), pp. 299-312, 10.1111/andr.12315
- [15] A. Bochkarev, R.A. Pfuetzner, A.M. Edwards, L. Frappier **Structure of the single-stranded-DNA-binding domain of replication protein A bound to DNA** *Nature*, 385 (1997), pp. 176-181, 10.1038/385176a0
- [16] A. Bochkarev, E. Bochkareva, L. Frappier, A.M. Edwards **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 (1999), pp. 4498-4504, 10.1093/emboj/18.16.4498
- [17] E. Bochkareva, S. Korolev, S.P. Lees-Miller, A. Bochkarev **Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA.** *EMBO J*, 21 (2002), pp. 1855-1863, 10.1093/emboj/21.7.1855
- [18] J. Fan, N.P. Pavletich **Structure and conformational change of a replication protein A heterotrimer bound to ssDNA.** *Genes Dev*, 26 (2012), pp. 2337-2347, 10.1101/gad.194787.112
- [19] M. Kallberg, H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu, J. Xu **Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server.** *Nat Protoc*, 7 (2012), pp. 1511-1522, 10.1038/nprot.2012.085
- [20] E. S. Burgie, Bingman, C.A., Phillips Jr., G.N., Fox, B.G., Makino, S.-I **X-ray Crystal Structure of the Human Replication Protein A Complex from Wheat Germ Cell Free Expression**
- [21] D.K. Kim, E. Stigger, S.H. Lee **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 (1996), pp. 15124-15129,
- [22] X.V. Gomes, M.S. Wold **Functional domains of the 70-kilodalton subunit of human replication protein A.** *Biochemistry*, 35 (1996), pp. 10558-10568, 10.1021/bi9607517
- [23] Y.L. Lin, C. Chen, K.F. Keshav, E. Winchester, A. Dutta **Dissection of functional domains of the human DNA replication protein complex replication protein A.** *J Biol Chem*, 271 (1996), pp. 17190-17198,
- [24] E. Bochkareva, S. Korolev, A. Bochkarev **The role for zinc in replication protein A.** *J. Biol. Chem.*, 275 (2000), pp. 27332-27338, 10.1074/jbc.M000620200
- [25] S. Caburet, A.L. Todeschini, C. Petrillo, E. Martini, N.D. Farran, B. Legois, G. Livera, J.S. Younis, S. Shalev, R.A. Veitia **A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks.** *EBioMedicine*, 42 (2019), pp. 524-531, 10.1016/j.ebiom.2019.03.075
- [26] B. Shi, J. Xue, H. Yin, R. Guo, M. Luo, L. Ye, Q. Shi, X. Huang, M. Liu, J. Sha, P.J. Wang **Dual functions for the ssDNA-binding protein RPA in meiotic recombination.** *PLoS Genet*, 15 (2019), pp. e1007952, 10.1371/journal.pgen.1007952

- [27] E. Fanning, V. Klimovich, A.R. Nager **A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways.** *Nucleic Acids Res*, 34 (2006), pp. 4126-4137, 10.1093/nar/gkl550
- [28] S.C. Kowalczykowski **An Overview of the Molecular Mechanisms of Recombinational DNA Repair.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (2015), 10.1101/cshperspect.a016410
- [29] J.S. Martinez, C. von Nicolai, T. Kim, A. Ehlen, A.V. Mazin, S.C. Kowalczykowski, A. Carreira **BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2016), 10.1073/pnas.1601691113
- [30] J. Liu, T. Doty, B. Gibson, W.D. Heyer **Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA.** *Nat Struct Mol Biol*, 17 (2010), pp. 1260-1262, 10.1038/nsmb.1904
- [31] R.B. Jensen, A. Carreira, S.C. Kowalczykowski **Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination.** *Nature*, 467 (2010), pp. 678-683, 10.1038/nature09399
- [32] J.B. Crickard, K. Kaniecki, Y. Kwon, P. Sung, E.C. Greene **Spontaneous self-segregation of Rad51 and Dmcl DNA recombinases within mixed recombinase filaments.** *J. Biol. Chem.*, (2018), 10.1074/jbc.RA117.001143
- [33] J. Zhang, Y. Fujiwara, S. Yamamoto, H. Shibuya **A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination.** *Nat Commun*, 10 (2019), pp. 722, 10.1038/s41467-019-08676-2
- [34] I. Brandsma, K. Sato, S.E. van Rossum-Fikkert, N. van Vliet, E. Sleddens, M. Reuter, H. Odijk, N. van den Tempel, D.H.W. Dekkers, K. Bezstarosti, J.A.A. Demmers, A. Maas, J. Lebbink, C. Wyman, J. Essers, D.C. van Gent, W.M. Baarends, P. Knipscheer, R. Kanaar, A.N. Zelensky **HSF2BP Interacts with a Conserved Domain of BRCA2 and Is Required for Mouse Spermatogenesis.** *Cell Rep*, 27 (2019), pp. 3790-3798.e7, 10.1016/j.celrep.2019.05.096
- [35] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin **UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.** *J Comput Chem*, 25 (2004), pp. 1605-1612, 10.1002/jcc.20084
- [36] R.R. mattingly, I.G. Macara **Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits.** *Nature*, 382 (1996), pp. 268-272,
- [37] C. Bieniossek, T. Imasaki, Y. Takagi, I. Berger **MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes.** *Trends Biochem. Sci.*, 37 (2012), pp. 49-57, 10.1016/j.tibs.2011.10.005
- [38] X.V. Gomes, L.A. Henriksen, M.S. Wold **Proteolytic mapping of human replication protein A: evidence for multiple structural domains and a conformational change upon interaction with single-stranded DNA.** *Biochemistry*, 35 (1996), pp. 5586-5595, 10.1021/bi9526995
- [39] P. Dupaigne, C. Le Breton, F. Fabre, S. Gangloff, E. Le Cam, X. Veaute **The Srs2 helicase activity is stimulated by Rad51 filaments on dsDNA: implications for crossover incidence during mitotic recombination** *Molecular Cell*, 29 (2008), pp. 243-254,

- [40] E. Martini, D.M. Roche, K. Marheineke, A. Verreault, G. Almouzni **Recruitment of phosphorylated chromatin assembly factor 1 to chromatin after UV irradiation of human cells** *J Cell Biol*, 143 (1998), pp. 563-575,
- [41] P.B. Moens, R. Freire, M. Tarsounas, B. Spyropoulos, S.P. Jackson **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 (2000), pp. 663-672,

Article 3: A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks

EBioMedicine 42 (2019) 524–531
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.075>



A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks

Sandrine Caburet^{a,b,1}, Anne-Laure Todeschini^{a,b,1}, Cynthia Petrillo^{b,c,d}, Emmanuelle Martini^{b,c,d}, Nada D. Farran^e, Bérange Legois^{a,b}, Gabriel Livera^{b,c,d}, Johnny S. Younis^{f,*}, Stavit Shalev^{e,g,2}, Reiner A. Veitia^{a,b,*,2}

^a Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, CNRS UMR7592, Paris 75013, France

^b Université Paris Diderot-Paris 7, 75205 Paris Cedex 13, France

^c UMR1274, Genetic Stability Stem Cells and Radiation, CEA/DRF/IRCM/SCSR/LDG, Fontenay aux Roses F-92265, France

^d Université Paris-Sud, Paris, Saclay, France

^e OBGYN Department, Genetic Institute, Haemek Medical Center, Afula, Israel

^f Baruch Padeh Medical Center, Poriya, The Azrieli Faculty of Medicine, Bar-Ilan University, Safed, Israel

^g Genetic Institute, Emek Medical Center, Israel

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2019

Received in revised form 20 March 2019

Accepted 26 March 2019

Available online 15 April 2019

Keywords:

Exon skipping

Female infertility

MBOB

Meiotic recombination

Primary ovarian insufficiency

ABSTRACT

Background: Primary Ovarian Insufficiency (POI), a major cause of infertility, affects about 1–3% of women under forty years of age. Although there is a growing list of causal genetic alterations, POI remains mostly idiopathic. **Methods:** We performed exome sequencing (WES) of two sisters affected with POI, one unaffected sister and their mother from a consanguineous family. We assessed the impact of the identified MEIOB variant with a minigene assay and by sequencing illegitimate transcripts from the proband's leukocytes. We studied its functional impact on the interaction between MEIOB with its partner SPATA22 and their localization to DNA double-strand breaks (DSB).

Findings: We identified a homozygous variant in the last base of exon 12 of MEIOB, which encodes a factor essential for meiotic recombination. This variant was predicted to strongly affect MEIOB pre-mRNA splicing. Consistently, a minigene assay showed that the variant induced exon 12 skipping, which was confirmed *in vivo* in the proband's leukocytes. Aberrant splicing leads to the production of a C-terminally truncated protein that cannot interact with SPATA22, abolishing their recruitment to DSBs.

Interpretation: This truncating MEIOB variant is expected to provoke meiotic defects and a depleted follicular stock, as in *Meiob*^{-/-} mice. This is the first molecular defect reported in a meiosis-specific single-stranded DNA-binding protein (SSB) responsible for POI. We hypothesize that alterations in other SSB proteins could explain cases of syndromic or isolated ovarian insufficiency.

Fund: Université Paris Diderot, Fondation pour la Recherche Médicale, Fondation ARC contre le cancer, Commissariat à l'Energie Atomique and Institut Universitaire de France.

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Primary ovarian insufficiency (POI) affects about 1–3% of women under 40 years of age. POI patients have amenorrhea for at least

6 months and high FSH levels. POI stems from a depletion of the ovarian follicle pool and can be observed isolated or in syndromic conditions. About 10–15% of POI cases have a genetic etiology but most cases remain idiopathic [1,2]. However, an increasing number of genetic alterations have been described in women with POI [3]. In particular, pathogenic variants in genes involved in DNA replication, recombination or repair, such as *STAG3*, *SYCE1*, *MCM8*, *MCM9*, and *HFM1*, have been formally implicated in this condition [4–8].

Here, we have applied exome sequencing (WES) to a consanguineous family of Arab origin with two sisters affected with POI. This analysis allowed us to identify a damaging homozygous variant in the last base

* Corresponding authors at: J.S Younis, Baruch Padeh Medical Center, Poriya, The Azrieli Faculty of Medicine, Bar-Ilan University, Safed, Israel; R.A. Veitia, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, CNRS UMR7592, Paris 75013, France

E-mail addresses: jsy@netvision.net.il (J.S. Younis), reiner.veitia@ijm.fr (R.A. Veitia).

¹ Equally contributing authors

² co-last authors

Research in context

Evidence before the study

Primary Ovarian Insufficiency (POI), also called premature menopause, is a condition that affects about 1–3% of women under forty years of age. It is accompanied by infertility, hormonal changes and steroid-deprivation symptoms such as osteoporosis and neurodegenerative diseases. The causes of this condition are unknown in most cases but genetic factors appear to play an important role. Indeed, there is a growing, yet incomplete, list of genetic alterations that lead to POI.

Added value of this study

To get insights into this disorder, we have sequenced the coding part of the genome of two sisters affected with POI, one unaffected sister and their unaffected mother, all belonging to a consanguineous family where the parents are double first cousins. As a result of our genomic exploration, we found a DNA alteration in the *MEIOB* gene, which leads to the production of a truncated protein in the two patients. This gene is basically expressed in the oocyte and is involved in the recombination of the genetic material. Our analyses show that the mutated protein is unable to play its normal role, potentially leading to DNA repair defects that end up causing POI. Our results are consistent with the infertility observed in female mice without *Meiob*.

Implications of all the available evidence

We have uncovered the first cases implicating *MEIOB* biallelic alterations in POI. Our findings further support a genetic link between female infertility and DNA recombination and increase the number of genes whose alterations are involved in POI. They will improve the diagnosis and counselling of patients with POI and their families.

of exon 12 of the *MEIOB* gene. *MEIOB* encodes a meiosis-specific factor involved in homologous recombination. This protein is conserved among metazoan species and contains single-stranded DNA (ssDNA) binding domains similar to those of RPA1 (Replication protein A1), the large subunit of the ubiquitous single-stranded DNA-binding (SSB) protein complex RPA [9,10]. *MEIOB* is involved in ssDNA binding during the repair of meiotic double strand breaks (DSB). It is required for proper meiotic recombination in complex with SPATA22 (spermatogenesis associated 22), and has been shown to interact with RPA [11,12]. Minigene assays and the analysis of illegitimate *MEIOB* transcripts in the proband's leukocytes showed that the pathogenic variant leads to exon 12 skipping, leading to the production of a truncated protein which cannot be recruited to DSBs. Our findings are consistent with the phenotype of the *Meiob*^{-/-} mouse that displays infertility in both sexes due to meiotic arrest. This is the first report of a clearly pathogenic variant of an SSB protein leading to female infertility.

2. Materials and methods

2.1. Exome sequencing

This study was approved by the Ethical Committee of the Emek Medical Center (EMC-0044-16). Written informed consent was obtained from all individuals included in the study. Genomic DNA was extracted from fresh blood samples by standard methods. Library preparation, exome capture, sequencing, and data analysis were performed by IntegraGen SA (Evry, France). Sequence capture, enrichment,

and elution were performed according to manufacturer's instructions and protocols (SureSelect Clinical Research Exome V2, Agilent Technologies) without modification except for library preparation performed with NEBNext® Ultra kit (New England Biolabs®). For library preparation, 600 ng of each genomic DNA was fragmented by sonication and purified to yield fragments of 150–200 bp. Paired-end adaptor oligonucleotides from the NEB kit were ligated onto the repaired fragments then purified and enriched with 8 PCR cycles. 1200 ng of purified libraries were then hybridized to the SureSelect oligo probe capture library for 72 h. After hybridization, washing, and elution, the eluted fraction was PCR-amplified (9 cycles), purified and quantified by qPCR to obtain sufficient template DNA for downstream applications. Each eluted-enriched DNA sample was then sequenced on an Illumina HiSeq4000 as Paired End 75 bases reads. Image analysis and base calling was performed using Illumina Real Time Analysis (2.7.7) with default parameters. For detailed explanations of the process, see Gnirke et al. [13].

2.2. Bioinformatics

Base-calling was performed by using the Real-Time Analysis software sequence pipeline (2.7.7) with default parameters. Sequence reads were mapped onto the human genome build (hg38/GRCh38) by using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA) tool. Duplicated reads (e.g. paired-end reads in which the insert DNA molecule showed identical start and end locations in the human genome) were removed using sambamba tools. The Whole Exome Sequencing metrics are provided in Table S1.

Variant calling, allowing the identification of SNV (Single Nucleotide Variations) and small insertions/deletions (up to 20 bp) was performed via the Broad Institute GATK Haplotype Caller GVCF tool (3.7) for constitutional DNA. Ensembl's VEP (Variant Effect Predictor, release 87) program was used for initial variant annotation. This tool takes into account data available in dbSNP (dbSNP147), the 1000 Genomes Project (1000G_phase3), the Exome Variant Server (ESP6500SI-V2-SSA137), the Exome Aggregation Consortium (ExAC r3.0), and IntegraGen in-house databases. For missense changes, two bioinformatic predictions for pathogenicity are available: SIFT (SIFT.2.2), PolyPhen (2.2.2). Other information like quality score, homozygote/heterozygote status, count of variant allele reads, presence of the variant in the COSMIC database (version79) are reported. Additional annotation data was retrieved using dbNSFP (version 3.4, <https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>) and Varsome (<https://varsome.com/>). Minor allele frequencies were manually verified on GnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>), ISB Kaviar (<http://db.systemsbiology.net/kaviar/>), and Great Middle Eastern variant database GME Variome: (<http://igm.ucsd.edu/gme/>).

Variant filtering was performed on the following criteria:

- minimum depth at variant position of 5,
- correct segregation in the family, on the basis of homozygosity by descent: variants should be homozygous in both affected sisters III-10 and III-11, heterozygous in the mother II-8 (obligate carrier), heterozygous or homozygous for Reference allele in the fertile sister III-13,
- absence in unrelated in-house fertile controls,
- Minor Allele Frequency (MAF) below 1% both in global and in each population in the GnomAD database,
- presence in the coding sequence (i.e not in UTRs, introns, intergenic, ...)
- high predicted functional impact on the protein. Impact was evaluated based on the nine predictors included in dbNSFP [14..16] plus M-CAP [17] (considered as pathogenic when the majority of the predictors agreed). For splicing-altering variants, we kept the variants with a predicted impact on splicing using ADA Score and Random Forest (RF) probabilities above 0.6 [18]. The numbers of variants

fulfilling those criteria are given in Table S2. Visual inspection of the variant was performed using the IGV viewer (see Fig. S1a).

2.3. Variant confirmation by Sanger sequencing

The genomic region including the variant c.1218G>A was PCR-amplified (see Table S3 for all primers used in this study), sequenced with the Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems), and analysed using the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The chromatograms are displayed in Fig. S1b.

2.4. In vitro analysis of exon skipping

2.4.1. miniMEIOB expression constructs

The plasmids driving the expression of wild-type MEIOB minigene (miniMEIOB) were constructed by fusion PCR. Briefly, four PCRs were performed to generate each exon (from Exon 11 to 14) surrounded by 200bp of intron sequence (as the full intron sequences could not be amplified). PCRs were performed using DNA from the genomic Clone IMG5B737G051023D (CTD-2522J7, Source BioScience) as a template. After purification, the PCR products were mixed in equimolar amounts and allowed to undergo ten cycles of PCR in the absence of primers, to generate the full-length miniMEIOB. Then, a final PCR reaction was performed using the forward and reverse MEIOB primers (see Table S3 for primers, purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO)). The amplified miniMEIOB was cloned in a pcDNA3.1 TOPO-TA vector from Invitrogen. The variant 1218G>A was then introduced in miniMEIOB WT gene by fusion PCR. First, two PCR reactions were performed to generate the 5 and 3' fragments of the mutated miniMEIOB gene using MEIOBForward primer and the corresponding mutagenic R primer MEIOB-Fusion-R and mutagenic MEIOB-Fusion-F primer along with MEIOBReverse (subsequent steps: as described above). All constructs were verified by Sanger sequencing to exclude the presence of PCR-induced mutations.

2.4.2. Cell culture and minigene assays

HeLa cells were used for minigene assays (CLS Cat# 300194/p772_HeLa, RRID:CVCL_0030). Cells were grown in DMEM-F12 medium (Gibco®, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen-Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Cells were seeded 16 h before transfection to be at 80% of confluence at the time of transfection and transfected with 6250 ng of total DNA per well (6-well plates) using the calcium phosphate method [19] and rinsed 24 h after transfection. Forty-eight hours after transfection, cells were washed with phosphate-buffered saline before mRNA extraction with TRI Reagent® (MRC, Euromedex) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis was performed using M-MLV (Invitrogen) and random hexamers. Altered splicing/exon skipping was assessed by RT-PCR on miniMEIOB mRNA with MEIOBForward and MEIOBReverse primers.

2.5. In vivo illegitimate MEIOB mRNA expression assays

2.5.1. RNA isolation and RT-PCR

Total RNA extractions from the proband and a fertile control fresh blood samples were performed using the TRI reagent (Sigma). For RT-PCR reactions, 1 µg of total RNA was amplified using the qScript cDNA Synthesis Kit (Quanta bio) in a final volume of 20 µl. The final mixture was incubated for 5 min at 22 °C, 30 min at 42 °C, and 5 min at 85 °C to inactivate the enzymes.

2.5.2. Expression analysis

Nested PCR was used to evaluate the expression profile of the wild-type and mutated transcripts. PCR were carried out with two nested

pairs of primers to amplify the MEIOB cDNA between exons 11 and 14, expected to amplify 501 bp (external PCR, wild-type allele) and 386 bp (nested PCR, wild-type allele, see Table S3). Amplification was performed for 40 cycles, 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s and 72 °C for 1 min. PCR products were verified by Sanger sequencing. Longer fragments of the sequencing chromatograms are displayed in Fig. S2.

2.6. Biochemical assays

2.6.1. Cell culture and plasmid transfections

Cells were cultivated in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C. Human embryonic kidney cells (HEK-293, ATCC, CLS Cat# 300192, RRID:CVCL_0045) and HeLa cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco). Plasmid transfection was performed with Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions.

2.6.2. Plasmid constructs

All enzymes are from New England Biolabs (Ipswich, MA), antibiotics and primers from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Primer sequences are provided in Table S3. All PCR were performed using Phusion DNA polymerase. All constructs were Sanger-sequenced. To express 3xHA N-terminal-tagged full-length human SPATA22, the desired fragment of human SPATA22 cDNA from pCMV6-XL5- HsSPATA22 (Origene, cat# SC123038) was amplified by PCR and the PCR product digested by EcoRI and BamHI and cloned into a pKH3 plasmid (Addgene). Human MYC-FLAG tagged MEIOB was expressed using pCMV6-HsMEIOB-MYC-FLAG (Origene, cat# RC228391).

2.6.2.1. pCIG-MCS-IRES (SC0583 plasmid). pCIG plasmid containing MEIOB from pCMV6-HsMEIOB-MYC-FLAG (Origene, cat# RC228391) was modified to remove the EGFP coding sequence and to introduce multiple cloning site (MCS) sequences upstream and downstream of the IRES sequence. In order to add MCS sequences, the pCIG plasmid was amplified with primers SP0629 and SP0630. The resulting PCR product was used as a template for an additional amplification with SP0631 and SP0632 adding homology sequences to pCIG plasmid. After purification (GeneJet PCR...ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), the PCR product was treated with T4 DNA polymerase for complementary single-strand annealing cloning with T4-DNA-polymerase-treated pCIG plasmid already digested by XhoI + BglII. The resulting plasmid was called pCIG-MCS-IRES (SC0583 plasmid).

2.6.2.2. pCIG-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-HsSPATA22-1-363 (SC0585); expression vector for SPATA22 and the wild-type form of MEIOB. First, the HsSPATA22-1-363 coding sequence was amplified from pET15b-HsSPATA22-1-363 (obtained by subcloning HsSPATA22-1-363 from pCMV6-XL5- HsSPATA22 (Origene, cat# SC123038 with NdeI and BamHI) with SP0636 and SP0637 primers. The resulting PCR product was digested by MscI + BglII and ligated in the SC0583 plasmid digested by the same enzymes and treated with Fast-AP (Alkaline Phosphatase, ThermoFisher), thus generating pCIG-MCS-IRES-HsSPATA22-1-363 plasmid. Then, the HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag coding sequence was amplified from pCMV6-HsMEIOB-1-471 (Origene, cat# RC228391) with SP0633 and SP0635. The resulting PCR product was digested by EcoRI-HF + XmaI and ligated in pCIG-MCS-IRES-HsSPATA22-1-363 digested by the same enzymes and treated with Fast-AP (ThermoFisher) generating pCIG-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-HsSPATA22-1-363 (SC0585 plasmid).

2.6.2.3. pCIG-HsMEIOB-1-344-WYMSFLQ-cMyc-Flag-IRES-HsSPATA22-1-363 (SC0896); to express SPATA22 and the truncated form of MEIOB. The HsMEIOB-1-344-WYMSFLQ coding sequence was synthesised with additional homologous sequences to SC0585 and sub-cloned into a pUC57-like plasmid (Proteogenix, Schiltigheim, France). The sequence of interest was released by BbsI digestion and cloned instead of the

HsMEIOB-1-471 wild-type sequence by complementary single-strand annealing cloning in SC0585 digested by *EcoRI*-HF and *MluI*-HF, thus generating SC0896.

2.6.3. Co-immunoprecipitation

HEK-293 cells were lysed under native conditions by homogenisation in 1× cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands) supplemented with complete protease inhibitor (Roche), PMSF, and 10 μM MG-132 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), 2 × 10 min of medium sonication (30 s on, 30 s off), and centrifugation at 16,200g for 10 min at 4 °C. Extracts were diluted 4× in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol, 10 mg/ml BSA, complete protease inhibitor without EDTA (Roche), 10 μM MG-132, and 90 U/ml Benzonase nuclease (Novagen, Darmstadt, Germany), PMSF). Extracts from ~5 × 10⁶ cells were used for IP with 25 μl of anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Cat# M8823, RRID:AB_2637089). The protein/beads mixture was incubated for 16 h at 4 °C with gentle agitation. To optimise 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 MgCl₂, 1 mM beta-mercaptoethanol, 10 mg/ml BSA, complete protease inhibitor without EDTA, Roche) and incubated in Benzonase buffer supplemented with 90 U/ml Benzonase nuclease for 30 min at 37 °C before being washed three times with rinsing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM beta-mercaptoethanol, complete protease inhibitor without EDTA, triton 0.25%). Immunoprecipitated proteins were eluted directly in 18 μl of Laemmli buffer 1.5× supplemented with 0.5% beta-mercaptoethanol and boiled for 5 min at 95 °C before magnetic separation of beads and western blotting of the samples.

2.6.4. Western blotting

Prior to migration, protein samples were supplemented with Laemmli buffer and dithiothreitol 1 M, boiled for 5 min at 95 °C and resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 12%), along with the ProSieve QuadColor protein marker 4.6 kDa–300 kDa (Lonza). Separated proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membranes (GE Healthcare) before protein detection with appropriate primary antibodies and fluorescent dye-coupled secondary antibodies (see Table S4 for details about antibodies). When the proteins could be distinguished by size, a same dye was used for different primary antibodies. Images were acquired using a Typhoon 5 imager (Amersham Biosciences, GE Healthcare).

2.6.5. DNA damage induction

Prior to fixation, HeLa cells were incubated with 25 μM etoposide (Sigma-Aldrich) for 1 h, rinsed with culture medium and maintained for 3 h in culture medium.

2.6.6. Immunofluorescence on HeLa cells

For immunolocalisation, HeLa cells were cultured on 170 μm-thick coverslips (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) 24 h before transfection. After etoposide treatment, cells were washed twice with PBS with 500 μM MgCl₂ and 500 μM CaCl₂ (PBS-S). For whole cell detection, cells were directly fixed with 4% PFA after PBS-S washes. To detect the chromatin-associated fraction and to observe DNA damage foci, cells were permeabilised before fixation as follows: after PBS-S washes, cells were washed once with CSK buffer (10 mM Pipes, pH 7.0, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose and 3 mM MgCl₂) and incubated 10 min with CSK buffer containing 0.5% Triton X-100, 0.3 mg/ml RNase A (ThermoFisher Scientific) and complete protease inhibitor (Roche). Cells were then 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 (Table S4) in PBS-S-T/5% BSA and then washed with PBS-S-T and incubated with appropriate fluorescent dye-coupled secondary

antibody. After washes in PBS-S-T, coverslips were mounted on glass slides using ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Life Technologies). Imaging was performed using an AX70 epi-fluorescence microscope (Olympus) equipped with a Photometrics CoolSNAP MYO CCD camera. Images were analysed using ImageJ software.

3. Results

The consanguineous family analysed here comprises two sisters affected with POI whose parents are double first cousins (Fig. 1). The proband III-10 had a normal medical history, except for a uterine septum that was removed by surgery at age 20. She presented with infertility, secondary to a severe reduction of ovarian reserve. Married at 18, she had a molar pregnancy at 20 and a subsequent pregnancy ended spontaneously very early. At age 24, oligomenorrhea appeared, and FSH levels rose to 25.36 IU/l at age 25 after one year without hormonal treatment (normal range, 2 to 24 IU/l), with AMH levels at 0.22 ng/ml (normal range 2.2–6.8 ng/ml) and Antral Follicular Count (AFC) = 3. Her husband is healthy, with a normal spermogram. Her sister III-11 presented with secondary amenorrhea. She had normal sexual development during teenage years after normal menarche at 14. Oligomenorrhea developed when she was 16 years old, leading to amenorrhea at age 19, with elevated FSH at 22.7 IU/l rising to 48.8 IU/l, AMH levels below 0.1 ng/ml and AFC = 0. Hormonal replacement therapy induced normal menses, but withdrawal resulted in amenorrhea. Therapeutic trial with high doses of gonadotropins failed to yield follicles. Hormonal dosages at age 30 confirmed the diagnosis of POI (Table 1). Physical examination was normal, with a height of 162 cm and a weight of 83 kg, and the uterus appeared normal on imaging. Her husband is healthy and fertile, with offspring from previous marriages.

WES for the two affected sisters III-10 and III-11, one unaffected sister III-13 and the unaffected mother II-8 generated 51 to 67 million reads per sample with a mean coverage of 67 to 74×. Variant calling identified over 100,000 variants per sample (Tables S1–S2). As it is frequent in consanguineous families, a recessive pathology can emerge because of identity by descent: the children of a consanguineous marriage inherit two copies of an ancestral variant, one through the maternal branch and the other through the paternal branch. Therefore, we filtered variants on the basis of their homozygosity in both patients, heterozygosity in the mother, heterozygosity or absence in the non-affected sister and absence in unrelated fertile in-house controls. Furthermore, we kept variants with a possible impact on the coding sequence and a minor allele frequency (MAF) < 0.01 in databases such as GnomAD. Further filtering on available functional data regarding a possible role in reproduction and fertility yielded only one plausible

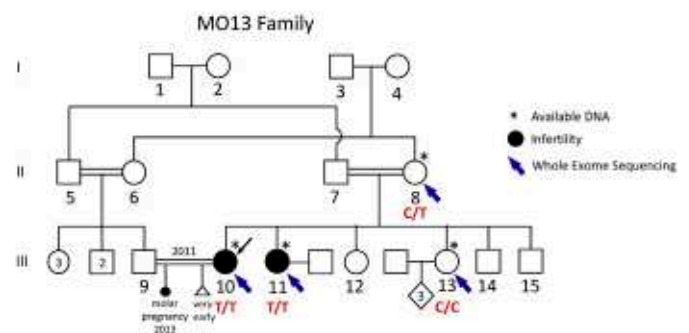


Fig. 1. Identification of a splicing-altering mutation in the coding sequence of MEIOB in a consanguineous POF family. Pedigree of the MO13 family. Double lines indicate consanguineous unions. The black arrow indicates the proband and blue arrows point to the family members that could be analysed by exome sequencing. The genotypes for the mutation in the MEIOB gene are indicated below each person, as confirmed by Sanger sequencing (asterisks).

Table 1
Hormonal dosage results for the M013 patient III-11 at age 30 (May 2017).

Hormones	Dosages in patient	Normal ranges			
		Follicular phase	Ovulatory phase	Luteal phase	Menopause
FSH (IU/l)	48.8	2.9–12	6.3–24	1.5–7	17–95
LH (IU/l)	46.4	1.5–8	9.6–80	0.2–6.5	8–33
Estradiol (nmol/l)	0.149	0.06–0.54	0.16–0.78	0.34–2.1	< 0.2
AMH (ng/ml)	< 0.1	2.2–6.8			
Progesterone (nmol/l)	2.2	0.3–3	2–9	15–60	0.3–3
Testosterone (nmol/l)	0.8	0.4–2			
Prolactin (ng/ml)	6.55	0.7–25			

TSH, free T3 and T4, SHBG, free androgen, androstenedione and DHEA sulfate were within normal ranges.

candidate variant (Table S2). This variant is rs1010446295 in *MEIOB* (annotated as chr16:g.1839255C>T (hg38), NM_001163560.2:c.1218G>A, Fig. 2a), which is predicted to alter splicing of exon 12 with high probability (*i.e.*, $p = 0.99$ according to AdaBoost and 1 according to Random Forest) [18]. Its MAF in GnomAD database is 0.000018, with only 4 heterozygous individuals and no homozygotes detected in >110,000 genomes. It was absent from the GME Variome dedicated to Middle East populations. Sanger sequencing confirmed that the two

affected sisters were indeed homozygous for the *MEIOB* variant, whereas the unaffected family members were either heterozygous or homozygous for the wild-type allele (Fig. S1). *MEIOB* encodes a meiosis-specific factor that binds ssDNA. Our previous expression data in human and mouse show that *MEIOB/Meiob* is strongly expressed in the developing ovary during meiosis [9]. Furthermore, its expression profile follows those of typical meiotic genes during ovary development in mice (Fig. S3). We have proposed that *MEIOB* is a meiotic functional equivalent of RPA1, a mitotic OB domain-containing ssDNA-binding protein [9].

Given the predicted impact of the variant on *MEIOB* pre-mRNA splicing, we considered three potential scenarios according to which the mutation could alter splicing. First, exon 12 bearing the variant could be skipped. Alternatively, the intron downstream of exon 12 could be retained in the mRNA and would be available for translation. Finally, the alteration would induce the removal of both exons 12 and 13 (an exon that can be alternatively spliced out, as in NM_152764) leading to piecing exons 11 and 14 together. In all cases the resulting protein products would be truncated because of frameshifts introducing premature termination codons (PTC). A minigene assay clearly indicated that the mutation induced skipping of exon 12 (Fig. 2b, left panel). This was confirmed *in vivo* by analyzing the illegitimate *MEIOB* transcripts in the leukocytes of proband III-10 (Fig. 2b, middle and right panels, and Fig. S2). Exon 12 skipping disrupts the reading frame, which leads to a frameshift and to the occurrence of a PTC (p.NP_001157032

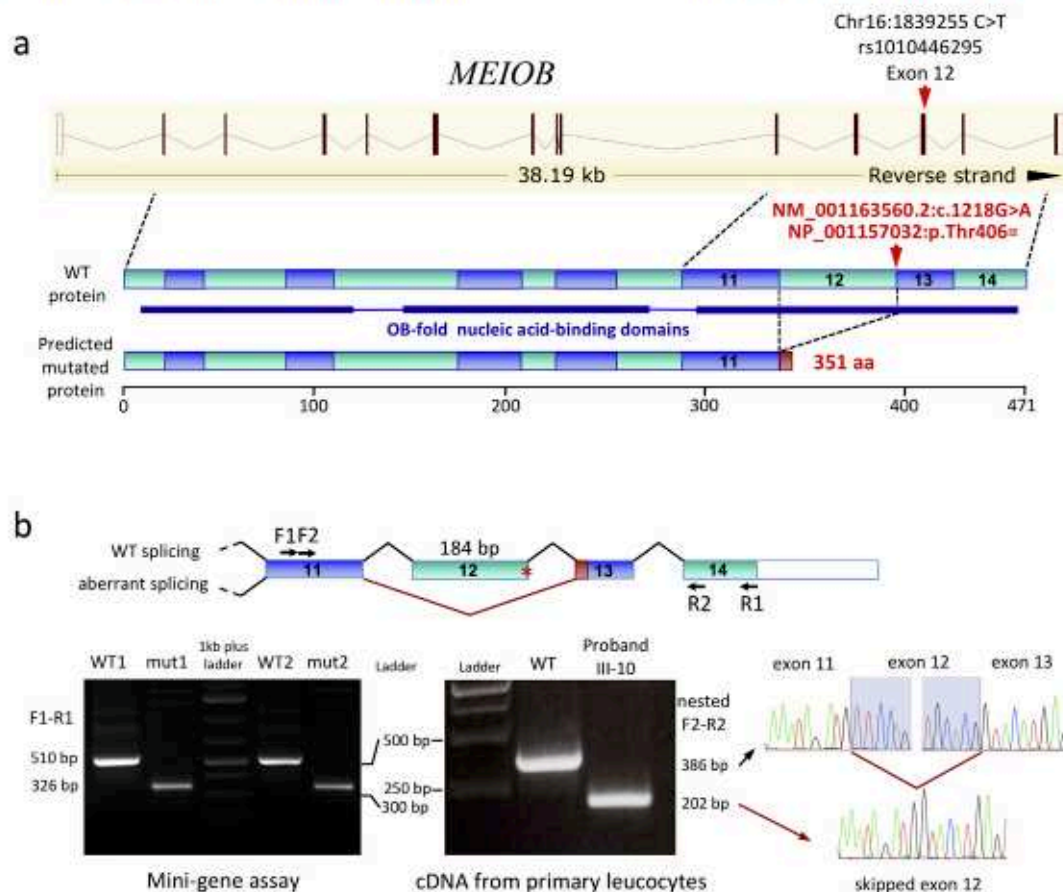


Fig. 2. Exon 12 skipping induced by the *MEIOB* pathogenic variant. a- Representation of the human *MEIOB* gene and its mutated form (from Ensembl, reference transcript NM_001163560.2). The structure of the normal protein is shown below for the longest isoform of 471 amino acids, with coding exons as bars with alternate colours. The mutation (red arrow) lies at the very end of exon 12, which encodes 61 amino acids at the centre of the third OB domain. The second protein structure corresponds to the mutated protein, induced by exon 12 skipping and premature stop codon. The 7-amino acid part of exon 13 read in frameshift is highlighted in red. kb: kilobases. b- Schematic representation of the exon 12 skipping (upper panel) induced by the mutation (red star), along with the detection of aberrant splicing in the *in vitro* minigene assay (bottom panel, left), *in vivo* in the proband's primary leukocytes (bottom panel, center) and the Sanger sequencing of the resulting normal and mutated transcripts. The PCR primers used to amplify the spliced products are located on the exon structure and indicated beside both assays. WT1/mut1 and WT2/mut2 represent 2 independent transfections of the same WT and mutated vectors respectively. WT: wild-type; bp: basepairs, cDNA: complementary DNA.

Cys345Trpfs8). The resulting truncated MEIOB^{MF-mut} protein is expected to contain 351 amino acids, with a normal sequence up to position 344, and would lack most of the third OB-fold and part of its SPATA22-binding domain.

Because the action of MEIOB during meiotic recombination requires its interaction with SPATA22 and the C-terminal part of MEIOB has been shown to mediate such interaction [11,12], we predicted that truncated MEIOB would not interact with SPATA22. To test this, we co-expressed untagged or HA-tagged SPATA22 and the two MYC-FLAG-tagged MEIOB versions in HEK-293 cells that do not express neither MEIOB nor SPATA22 ([11] and <https://www.proteomicsdb.org/>). As expected, co-immunoprecipitation confirmed the interaction between the full-length MEIOB and SPATA22. By contrast, SPATA22 and truncated MEIOB were barely co-immunoprecipitated, demonstrating that the mutation affected their interaction (Fig. 3).

To test whether the truncation of MEIOB also affected its recruitment to DNA lesions, we mimicked meiotic DSB with etoposide treatment. Etoposide inhibits topoisomerase II, which remains attached to the 5' extremities of the DSBs it creates. Specifically, we co-expressed HA-tagged SPATA22 and the wild type MYC-FLAG-tagged version of MEIOB (MEIOB^{MF}) or the truncated MYC-FLAG-tagged version of MEIOB (MEIOB^{MF-mut}) in HeLa cells, that do not express neither MEIOB nor SPATA22 (<https://www.proteomicsdb.org/>). We confirmed by western blot that both versions of MEIOB were indeed expressed (Fig. 4a). After etoposide treatment, the wild-type MEIOB^{MF} and SPATA22 accumulated in the nuclei (Fig. 4b). When MEIOB^{MF-mut} was expressed with SPATA22, SPATA22 remained diffuse in the entire cell (cytoplasm and nucleus) and MEIOB tended to accumulate in the cytoplasm (Fig. 4b). To focus on proteins recruited to DNA damages, we permeabilised the cells before fixation to retain only the chromatin-associated fraction. The DNA-damage sites were spotted by RPA staining, known to form discrete foci at DSBs. MEIOB^{MF} and SPATA22

colocalised with RPA, confirming their recruitment to etoposide-induced DSBs. Of note, this recruitment to DSBs was detected only when the two proteins were co-expressed (Fig. 4c and d). This confirms the mandatory interaction of the two partners for being recruited at DSBs. In contrast, when the truncated MEIOB^{MF-mut} was co-expressed with SPATA22, their localization to DSBs was lost (Fig. 4d).

Finally, we estimated the probability of finding other POI cases caused by bi-allelic pathogenic variants in MEIOB. For this, we gathered the MAF of all the variants in the coding region of MEIOB referenced in GnomAD (as of February 2019). We focused on those variants predicted to be pathogenic or possibly damaging by at least 6 out of 11 predictors of functional impact. The cumulative MAF of the 149 predicted pathogenic variants was 0.01349. This corresponds to one woman out of about 11,000 (*i.e.*, $2/0.01349^2$), who would be either homozygous or compound heterozygous for MEIOB damaging variants.

4. Discussion

Our genetic analysis allowed us to identify a variant in the MEIOB gene responsible for POI in a consanguineous family. Our study of the impact of the mutation on MEIOB pre-mRNA splicing *in vitro* and *in vivo* showed that exon 12 was skipped. In principle, we cannot exclude a nonsense-mediated decay (NMD) of the mutated transcripts, because the PTC does not lie in the last exon. However, NMD is not certain because of the small size of exon 13 (87 bases). In such conditions, the ribosome might still be able to remove the Exon Junction Complex at the boundary between exons 13 and 14 when reaching the PTC (thus abrogating NMD). The fact that the wild-type and mutated cDNAs from the patient's leukocytes yielded PCR bands of similar intensities when amplified in similar conditions from similar amounts of cDNA indeed argues against NMD of the mutated transcript. However, even in

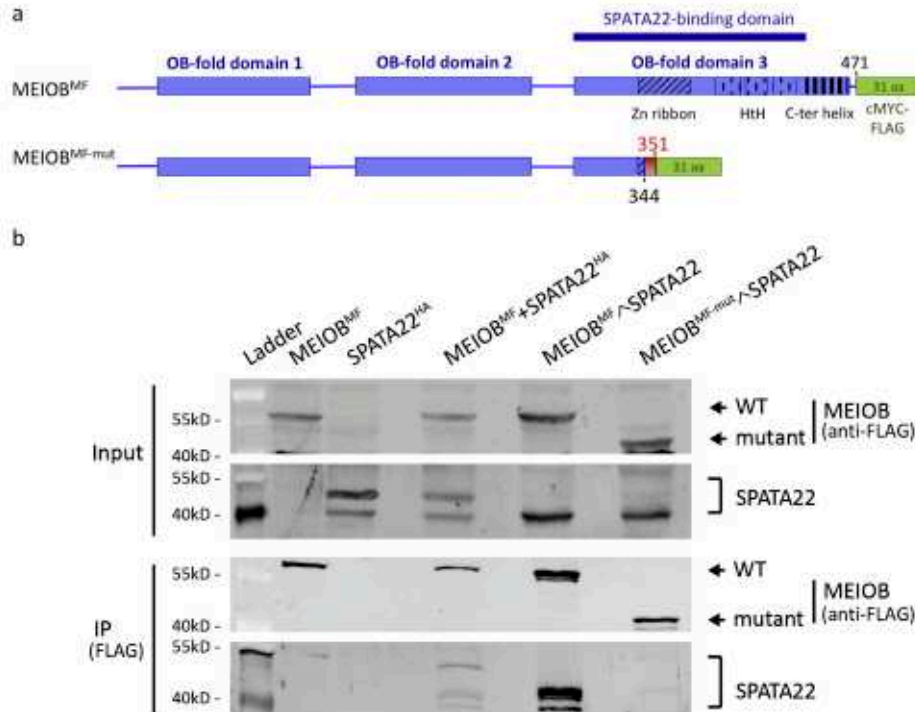


Fig. 3. The MEIOB-truncating mutation disrupts MEIOB-SPATA22 interaction. a- Schematic representation of MEIOB constructs. The wild-type MEIOB^{MF} contains 3 OB-fold domains and a C-terminal cMyc-FLAG tag (in green). The third OB-fold domain contains an additional Zinc ribbon domain and a helix-turn-helix (Hth), encoded by the end of exon 11 and exons 12, 13, and part of exon 14, and corresponds to the SPATA22-binding domain [11,12]. The truncated MEIOB^{MF-mut} contains the wild-type sequence up to position 344 encompassing only the beginning of the zinc ribbon domain plus seven residues read in frameshift (in red) before the cMyc-FLAG tag. b- SPATA22 co-immunoprecipitation with MEIOB is lost in MEIOB mutant. MEIOB^{MF} or MEIOB^{MF-mut}, HA-tagged SPATA22 (SPATA22^{HA}), or untagged SPATA22 (SPATA22) were expressed in HEK-293 cells. MEIOB^{MF}~SPATA22 indicates that MEIOB^{MF} and SPATA22 were expressed from a single plasmid. MEIOB is immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody (IP-FLAG). MEIOB is revealed with an anti-FLAG antibody and SPATA22 with an anti-SPATA22 antibody. The ProSieve QuadColor protein marker 4.6 kDa–300 kDa (Lonza) was run on the left (Ladder).

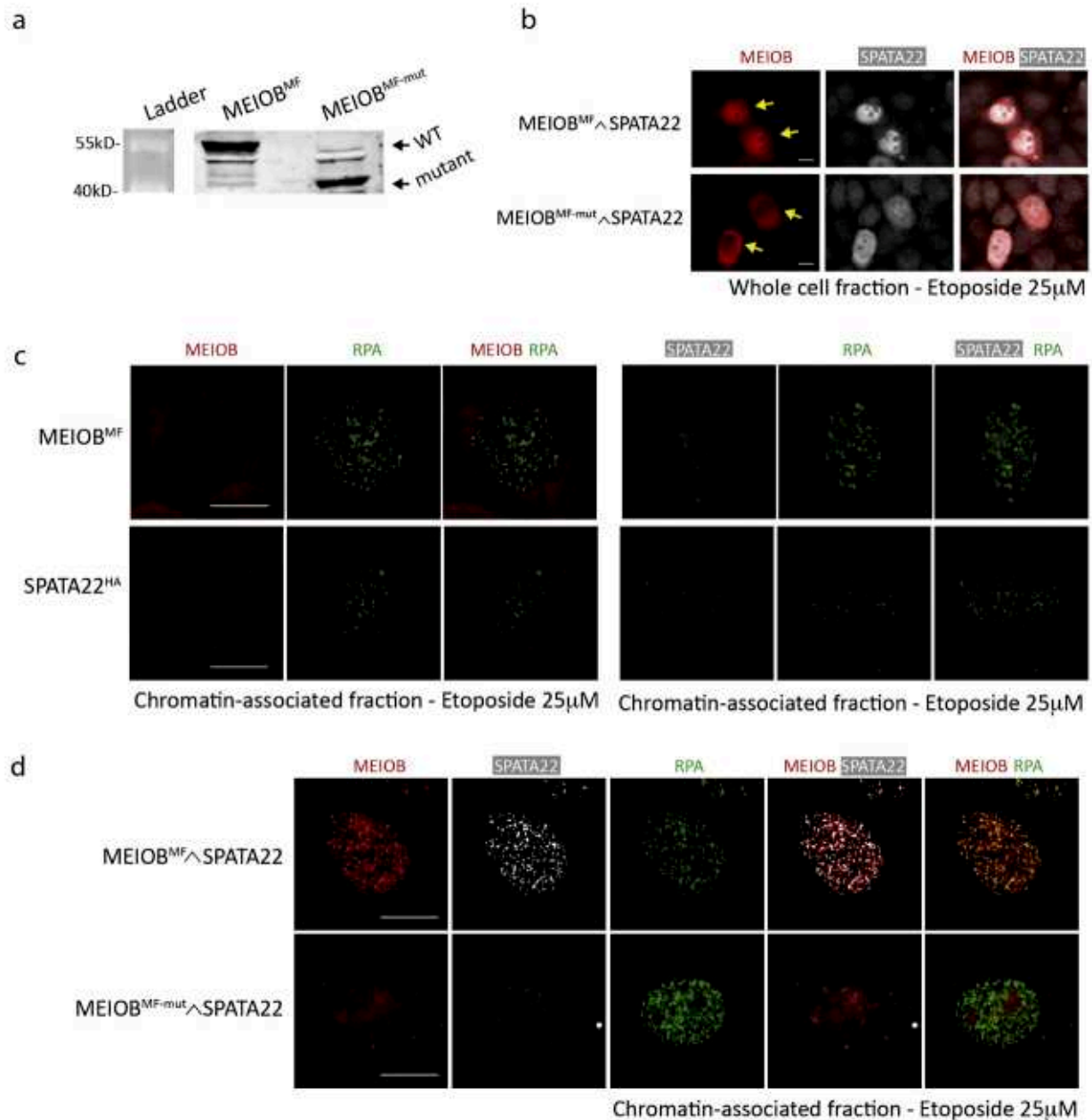


Fig. 4. The MEIOB-truncating mutation disrupts MEIOB-SPATA22 recruitment to DNA damage foci. a–b–The truncated form of MEIOB is stable when expressed in HeLa cells. a– Western blot showing the expression of the wild-type (MEIOB^{MF}) and the truncated forms (MEIOB^{MF-mut}) of MEIOB transfected in HeLa cells. The ProSieve QuadColor protein marker 4,6 kDa–300 kDa (Lonza) was run on the left (Ladder). b– MEIOB^{MF} or MEIOB^{MF-mut} and SPATA22 were co-expressed from a single plasmid MEIOB^{MF}ΔSPATA22 in HeLa cells before exposure to etoposide (25 μM). Cells were fixed in PFA without pre-permeabilisation to retain both cytoplasmic and nuclear fractions. Antibodies were used to immunostain MEIOB (red) and SPATA22 (white). Yellow arrows highlight transfected cells expressing both MEIOB and SPATA22. c–d– The truncation prevents MEIOB recruitment with SPATA22 to DSBs. MEIOB^{MF} or MEIOB^{MF-mut} and SPATA22^{HA} were expressed in HeLa cells before exposure to etoposide. Cells were permeabilised before fixation in PFA to analyse the chromatin-associated fraction of proteins. RPA foci are formed at DNA damage sites. c– MEIOB or SPATA22 alone are not recruited to DNA damage sites. d– When co-expressed, MEIOB^{MF} and SPATA22 are recruited to DNA-damage sites and colocalise with RPA. This colocalisation is not observed for the truncated MEIOB^{MF-mut}. Antibodies are used to immunostain MEIOB (red), SPATA22 (white), and RPA (green). Scale bar = 10 μm in all panels.

the presence of NMD, the conclusion pointing to the causality of the variant would hold.

Recent studies identified the C-terminal part of MEIOB between positions 294 and 450 as the SPATA22-binding domain of the protein, which is required for the interaction between the two proteins and for their recruitment to DSBs [11,12]. In the present study, we show that the truncation induced by the mutation strongly affects this interaction and prevents the recruitment of both MEIOB and SPATA22 to DSBs.

Meiob knock-out mice are infertile and unable to complete meiotic recombination, as shown by the persistence of unrepaired DNA breaks. Indeed, the mutated ovaries are completely devoid of oocytes by early

postnatal days [9,10]. The results described here are consistent with the phenotype observed in *Meiob*^{-/-} female mice and highlight the importance of the MEIOB-SPATA22 interaction *in vivo*. Recently, a homozygous missense (N641) was reported in a consanguineous Israeli Arab family with 4 azoospermic brothers [20]. This missense substitution concerned a highly conserved residue within a DNA binding domain of the protein. Although this variant is likely to be causal, it is always difficult to provide such a proof for a missense mutation, especially when the status of unaffected family members cannot be assessed and/or in the absence of a knock-in model. Causality is more obvious for a truncating mutation, as the one described here or as the homozygous

frameshift mutation very recently reported in two azoospermic brothers from a consanguineous family and an unrelated azoospermic patient [21]. This mutation is predicted to induce the truncation of the C-terminal part of MEIOB, and the complete impairment of spermatocyte maturation in these patients.

Our study increases the number of genes whose products are involved in meiotic recombination as a cause of female infertility [4,7,22,23]. It also provides the first example of a pathogenic variant in a gene encoding a SSB protein involved in POI. Although we report only one family with two POI cases, we think that we provide the level of evidence required to formally implicate MEIOB in POI. We expect pathogenic variants in MEIOB to be a rare cause of POI, as reported for all known POI genes for obvious Darwinian reasons. Based on available data, we estimated the cumulative frequency of all known MEIOB variants predicted to be pathogenic. This analysis yielded an estimate of 1 woman out of 11,000 who would be either homozygous or compound heterozygous for MEIOB clearly damaging variants. We hope that the publication of the first pathogenic variant in MEIOB will trigger interest in this gene. Finding novel supporting cases will help improve the diagnosis and counselling of patients with POI. Finally, we hypothesise that mutations in other SSB proteins could explain other cases of ovarian insufficiency, be it syndromic (when the protein is not meiosis-specific) or isolated.

Acknowledgements

SC and RAV express their sincere thanks to the family for their participation in this research. We acknowledge the CIGEX (CEA, Fontenay aux Roses, France) for plasmid construction and J. Ribeiro for the initial characterization of MEIOB-SPATA22 interaction.

Funding sources

This study was supported by Université Paris Diderot (SC, BL, ALT, RAV, GL), the Fondation pour la Recherche Médicale (Labelisation Equipes DEQ20150331757, SC, BL, ALT, RAV), the Fondation ARC pour la recherche contre le cancer (CP, EM, GL), the Commissariat à l'Energie Atomique (CP, EM), and the Institut Universitaire de France (GL). The funders had no role in study design, data collection, data analysis, interpretation or writing of the report.

Declaration of interests

The authors declare no conflict of interest.

Data sharing

Non-identifying data supporting the claims made in this paper are available upon request after its publication. Requests should be addressed to the corresponding authors of this paper: Profs. R. A. Veitia (reiner.veitia@ijm.fr) or to J.S. Yunis (jsy@netvision.net.il).

Author contributions

RAV, JSY and SS conceived and headed the project. JSY performed the patient recruitment and phenotyping. SC performed the WES data analysis and variant interpretation. BL and ALT set up and performed the *in vitro* functional assay. BL performed the genomic DNA sequencing. NDF performed the patient's illegitimate MEIOB mRNA splicing analysis. CP, EM and GL set up and performed the functional assays in cells. SC and RAV drafted the manuscript with input from all authors. All authors approved the final version of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.075>.

References

- [1] Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clin Genet* 2017;91:183–98. <https://doi.org/10.1111/cge.12921>.
- [2] Persani L, Rossetti R, Cacciarelli C. Genes involved in human premature ovarian failure. *J Mol Endocrinol* 2010;45:257–79. <https://doi.org/10.1677/JME-10-0070>.
- [3] Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, et al. Advances in the molecular pathophysiology, genetics, and treatment of primary ovarian insufficiency. *Trends Endocrinol Metab* 2018;29:400–19. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.03.010>.
- [4] Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med* 2014;370:943–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1309635>.
- [5] AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, Yatsenko SA, Jeffries EP, Surti U, et al. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest* 2015;125:258–62. <https://doi.org/10.1172/JCI78473>.
- [6] Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet* 2014;95:754–62. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.11.002>.
- [7] Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu B-L. Primary ovarian insufficiency collaboration. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med* 2014;370:972–4. <https://doi.org/10.1056/NEJMcl1310150>.
- [8] de Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E2129–32. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1268>.
- [9] Souquet B, Abby E, Hervé R, Finsterbusch F, Tourpin S, Le Bouffant R, et al. MEIOB targets single-strand DNA and is necessary for meiotic recombination. *PLoS Genet* 2013;9:e1003784. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003784>.
- [10] Luo M, Yang F, Leu NA, Landaiche J, Handel MA, Benavente R, et al. MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nat Commun* 2013;4:2788. <https://doi.org/10.1038/ncomms3788>.
- [11] Xu Y, Greenberg RA, Schonbrunn E, Wang PJ. Meiosis-specific proteins MEIOB and SPATA22 cooperatively associate with the single-stranded DNA-binding replication protein a complex and DNA double-strand breaks. *Biol Reprod* 2017;96:1096–104. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox040>.
- [12] Ribeiro J, Dupaigne P, Duquenne C, Veaute X, Petrillo C, Saintome C, et al. MEIOB and SPATA22 resemble RPA subunits and interact with the RPA complex to promote meiotic recombination. *BioRxiv* 2018:358242. <https://doi.org/10.1101/358242>.
- [13] Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 2009;27:182–9. <https://doi.org/10.1038/nbt.1523>.
- [14] Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP: a lightweight database of human nonsynonymous SNPs and their functional predictions. *Hum Mutat* 2011;32:894–9. <https://doi.org/10.1002/humu.21517>.
- [15] Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Hum Mutat* 2013;34:E2393–402. <https://doi.org/10.1002/humu.22376>.
- [16] Liu X, Wu C, Li C, Boerwinkle E. dbNSFP v3.0: a one-stop database of functional predictions and annotations for human nonsynonymous and splice-site SNVs. *Hum Mutat* 2016;37:235–41. <https://doi.org/10.1002/humu.22932>.
- [17] Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, et al. M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nat Genet* 2016;48:1581–6. <https://doi.org/10.1038/ng.3703>.
- [18] Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res* 2014;42:13534–44. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1206>.
- [19] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- [20] Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, et al. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet* 2017;19:998–1006. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.225>.
- [21] Gershoni M, Hauser R, Barda S, Lehavi O, Arama E, Pietrokovski S, et al. A new MEIOB mutation is a recurrent cause for azoospermia and testicular meiotic arrest. *Hum Reprod* 2019. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez016>.
- [22] Qin Y, Guo T, Li G, Tang T-S, Zhao S, Jiao X, et al. CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure. *PLoS Genet* 2015;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005419>.
- [23] Zangen D, Kaufman Y, Zeligson S, Perlberg S, Fridman H, Kanaan M, et al. XX ovarian dysgenesis is caused by a PSMC3IP/HOP2 mutation that abolishes coactivation of estrogen-driven transcription. *Am J Hum Genet* 2011;89:572–9. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.09.006>.

Résultats supplémentaires : étude de l'influence potentielle de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans certains cancers

I) Matériels et méthodes des résultats supplémentaires

A) Analyse bioinformatique de l'expression transcriptionnelle de *MEIOB* et *SPATA22*

- Analyse des transcrits dans les tissus humains sains et les tissus tumoraux associés:

Les profils d'expression différentielle des transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* et leurs corrélations d'expression dans les tissus humains (sains et tumoraux) ont été établis à l'aide du logiciel internet GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) (Tang, Z et al. 2017) (gepia.cancer-pku.cn). GEPIA est un logiciel interactif accessible en ligne permettant l'analyse de séquençages ARN (RNA-Seq) provenant de 9 736 échantillons de tumeurs et de 8 587 échantillons de tissus sains à partir des projets TCGA et GTEx. Le projet GTEx (Genotype-Tissue Expression) consiste à établir une base de données et une banque de tissus associés permettant l'étude de la relation entre la variation génétique et l'expression génique dans les tissus humains (détaillé dans GTEx consortium, Nat Genet, 2013 (DOI : 10.1038/ng.2653)). Le projet TCGA (The Cancer Genome Atlas) est un programme de caractérisation moléculaire et génomique des cancers. Il collecte des données génomiques, épigénomiques, transcriptomiques et protéomiques provenant de 20 000 échantillons de tissus cancéreux primaires (33 types de cancers différents) et des tissus sains associés.

Les profils d'expression différentielle des transcrits *MEIOB* et *SPATA22* sont analysés séparément dans 33 types de tissus normaux (sains) et tumoraux associés et exprimés en TPM (Transcrits Par Million) (**Tableau 1** et le **Tableau 2**). Les courbes de corrélation des expressions des transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus normaux (sains) ou tumoraux sont établies à partir des données des projets TCGA et GTEx. Le test de Pearson est utilisé pour établir les corrélations d'expression (R).

- Analyse des transcrits dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines:

Les expressions des transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* ont été analysées grâce au logiciel internet d'analyse transcriptomique ATLAS Expression accessible en ligne (www.ebi.ac.uk) à partir des données de séquençages ARN de 934 lignées cellulaires cancéreuses humaines provenant de la base de données Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). Les analyses sont réalisées selon les caractéristiques pré-établies suivantes : organisme *Homo Sapiens*, référence 22460905, fournisseur de données brutes NIH Genomic Data Common. Les profils d'expression des transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* sont établis avec un niveau d'expression minimal de 0,1 TPM pour chaque gène et exprimés en TPM (**Tableau 3**).

gène	MEIOB		SPATA22	
	normal	tumeur	normal	tumeur
ACC	0.03	0.2	0.15	0
BLCA	0.02	0.01	0.09	0
BRCA	0.07	0.03	0.51	0.07
CESC	0.06	0.05	0.18	0
CHOL	0.14	0.02	0	0
COAD	0.06	0	0.15	0
DLBC	0	0	0	0
ESCA	0.07	0.04	0.05	0.01
GBM	0.25	0.07	0.37	0.73
HNSC	0.03	0.02	0.04	0.02
KICH	0.31	0.01	0.1	0
KIRC	0.26	0.03	0.09	0.09
KIRP	0.3	0.18	0.04	0
LAML	69.66	0.07	0.33	0
LGG	0.25	0.09	0.37	0.6
LIHC	0.09	0.04	0.03	0
LUAD	0.04	0.05	0.13	0
LUSC	0.04	0.06	0.13	0.02
OV	0.19	0.2	0.15	0
PAAD	0.02	0.03	0.04	0.05
PCPG	0	0.02	0.12	0.02
PRAD	0.06	0.02	0.1	0
READ	0.06	0	0.16	0
SARC	0.19	0.04	0.08	0.05
SKCM	0.27	0.03	0.12	0.05
STAD	0	0.02	0.06	0.02
TGCT	49.29	5.11	169.25	7.4
THCA	0.13	0.02	0.13	0.02
THYM	0	2.37	0	0.03
UCEC	0.07	0.01	0.14	0
UCS	0.07	0.07	0.15	0.06

Tableau 1 : Le niveau d'expression des transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus humains sains (normaux) et tumoraux

Le logiciel en ligne GEPIA a été utilisé pour analyser le niveau d'expression des transcrits humains de *MEIOB* et *SPATA22* parmi 9 736 échantillons de tumeurs et 8 587 échantillons de tissus sains. Les niveaux d'expression transcriptionnelle des tissus normaux (sains) et tumoraux associés (provenant d'un même type tissulaire) sont indiqués pour chacun des gènes et exprimés en TPM. Les différents types de tissus correspondent à ceux des tissus tumoraux (détaillés dans le **Tableau 2**).

Tumeurs	Détails
ACC	Adrenocortical carcinoma
BLCA	Bladder Urothelial Carcinoma
BRCA	Breast invasive carcinoma
CESC	Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma
CHOL	Cholangio carcinoma
COAD	Colon adenocarcinoma
DLBC	Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma
ESCA	Esophageal carcinoma
GBM	Glioblastoma multiforme
HNSC	Head and Neck squamous cell carcinoma
KICH	Kidney Chromophobe
KIRC	Kidney renal clear cell carcinoma
KIRP	Kidney renal papillary cell carcinoma
LAML	Acute Myeloid Leukemia
LGG	Brain Lower Grade Glioma
LIHC	Liver hepatocellular carcinoma
LUAD	Lung adenocarcinoma
LUSC	Lung squamous cell carcinoma
MESO	Mesothelioma
OV	Ovarian serous cystadenocarcinoma
PAAD	Pancreatic adenocarcinoma
PCPG	Pheochromocytoma and Paraganglioma
PRAD	Prostate adenocarcinoma
READ	Rectum adenocarcinoma
SARC	Sarcoma
SKCM	Skin Cutaneous Melanoma
STAD	Stomach adenocarcinoma
TGCT	Testicular Germ Cell Tumors
THCA	Thyroid carcinoma
THYM	Thymoma
UCEC	Uterine Corpus Endometrial Carcinoma
UCS	Uterine Carcinosarcoma
UVM	Uveal Melanoma
<u>Copyright © 2017 Zefang Tang, Chenwei Li, Boxi Kang, Zhang's Lab. All Rights Reserved.</u>	

Tableau 2 : Liste détaillée des abréviations des différents types de tissus tumoraux humains

Les abréviations des tissus tumoraux y sont explicités et correspondent aux tissus utilisés pour l'analyse transcriptomique différentielle tissus sains/tumoraux humains à l'aide du logiciel accessible en ligne GEPIA.

Gene ID	ENSG00000141255	ENSG00000162039
Gene Name	SPATA22	MEIOB
TE 441,T, rhabdomyosarcoma	9	2
SNU-738, oligodendroglioma	4	0,3
NCI-H661, large cell lung carcinoma	8	12
NCI-H2342, lung adenocarcinoma	1	2
SNU-466, glioblastoma	0,1	0,1
SK-N-DZ, neuroblastoma	8	0,1
SHP-77, small cell lung carcinoma	26	0,1
SIMA, neuroblastoma	0,7	0,4
RD, embryonal rhabdomyosarcoma	0,1	0,1
RERF-LC-AI, squamous cell lung carcinoma	0,1	0,1
NH-6, adrenal gland neuroblastoma	1	0,1
NCI-H1793, lung adenocarcinoma	3	0,1
NCI-H196, small cell lung carcinoma	0,2	0,1
MOLP-8, multiple myeloma	0,7	0,1
Malme-3M, melanoma	0,4	0,1
NB-1, neuroblastoma	5	0,2
EOL-1, chronic eosinophilic leukemia	9	0,1
FU-OV-1, high grade ovarian serous adenocarcinoma	0,3	3
A4/Fuk, B-cell acute lymphoblastic leukemia	4	0,1
AN3 CA, endometrium adenocarcinoma	4	0,1
MHH-NB-11, neuroblastoma	0,9	0,1
KMS-21BM, multiple myeloma	0,1	0,1
Hs 746T, gastric adenocarcinoma	0,2	0,1
Hs 940,T, cutaneous melanoma	0,8	0,1
Hs 852,T, melanoma	7	0,2
Hs 870,T, osteosarcoma	3	0,1
K-562, blast phase chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1 positive	0,6	13
WM1799, melanoma	0,1	0,8
TE-9, esophageal squamous cell carcinoma	0,8	0,1

Tableau 3 : Le niveau d'expression des transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines

Le logiciel en ligne ATLAS Expression a été utilisé pour analyser le niveau d'expression des transcrits *MEIOB* et *SPATA22* dans 934 lignées cellulaires cancéreuses humaines. Les lignées cellulaires exprimant les deux gènes *MEIOB* et *SPATA22* et leurs niveaux d'expression respectifs y sont détaillés. Le niveau d'expression des transcrits pour *MEIOB* et *SPATA22* dans chacune des lignées cellulaires est au minimum de 0,1 TPM et est exprimé en TPM.

B) Culture cellulaire et transfection de plasmides

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂. Les cellules humaines embryonnaires de reins HEK293 (Human Embryonic Kidney (ATCC)) sont cultivées dans du milieu DMEM (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco) et 5% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine (Gibco).

Les transfusions de plasmides sont réalisées avec de la Lipofectamine 2000 (LifeTechnologies) selon les instructions préconisées par le fabricant. Les cellules sontensemencées 24h avant la transfection pour atteindre 70-80% de confluence le jour de la transfection. Les cellules sont alors cultivées en absence d'antibiotiques. Brièvement, l'ADN plasmidique et la Lipofectamine 2000 sont dilués séparément dans de l'OptiMEM (LifeTechnologies). Après 5 minutes d'incubation, l'ADN plasmidique dilué est mélangé à la solution diluée de Lipofectamine 2000. Le mélange ADN-Lipofectamine 2000 est incubé 20 minutes à température ambiante (TA) puis ajouté au milieu de culture en contact avec les cellules pendant 4h à 37°C. Le ratio ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) / Lipofectamine (μl) est de 1,25. Les cellules sont transfectées avec le plasmide permettant l'expression seule de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) (pCIG-GFP) ou avec le plasmide permettant la co-expression de MEIOB et SPATA22 (pCIG-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-HsSPATA22-1-363 (SC0585)).

Les cellules HEK293 sont passées etensemencées au même nombre 24h après transfection pour favoriser une prolifération en absence d'inhibitions de contacts liés à la sur-confluence des cellules post-transfection. Les images des cellules transfectées avec le plasmide pCIG-GFP en culture ont été prises avec le microscope inversé Axiovert 200 (Zeiss) à 24h, 48h et 72h post-transfection.

C) Comptage au Bleu Trypan

Après détachement des cellules de leur support de culture par trypsination, les cellules en suspension sont comptées à 24h et 48h après passage (soit 48h et 72h post-transfection) par comptage manuel à l'aide d'une lame de Malassez associé à l'utilisation du colorant bleu trypan (Gibco) sur trois réplicats indépendants pour chaque condition (PCIG ou MEIOB+SPATA22). Le bleu de trypan, aussi appelé bleu

diamine ou bleu de Niagara, est un colorant dérivé de la toluidine (C₁₄H₁₆N₂). Il pénètre et colore en bleu uniquement les cellules mortes dont la membrane cellulaire est devenue perméable. Les cellules vivantes (incolores) et mortes (bleues) sont comptabilisées sur 25 unités rectangulaires de la lame de Malassez. La viabilité cellulaire correspond au nombre de cellules vivantes / nombre de cellules totales et est exprimé en %. Le taux de prolifération correspond à la variation du nombre de cellules entre t+1 et t-1 / le nombre de cellules à t-1.

D) Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Les cellules sont fixées et immunomarquées à l'aide du Kit Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences, réf. 554714) selon les recommandations du fabricant. A 24h et 48h post-transfection, les cellules sont préalablement incubées avec 30µM de BrdU (analogue synthétique de la thymidine) (Invitrogen) pendant 1h à 37°C avant d'être fixées et perméabilisées avec du Cytofix/Cytoperm contenant 4,2% de paraformaldéhyde (PFA) (fixateur) et de la saponine (détergent) pendant 20 minutes à 4°C. Les cellules sont à nouveau fixées avec le Cytofix/CytopermPlus pendant 15 minutes à TA. Entre chaque étape, les cellules sont rincées à l'aide de la solution de lavage PermWash (contenant du SVF et de la saponine). L'ADN intracellulaire est ensuite digéré pendant 1h au bain-marie à 37°C avec l'enzyme DNase I (30µg/10⁶ cellules) (Sigma, réf. D4513) afin de rendre accessible les épitopes du BrdU incorporé. L'immunomarquage de MEIOB-Flag et celui du BrdU sont séquentiels. Les anticorps primaires anti-FlagM2 (dirigés contre MEIOB-Flag) sont dilués dans du PermWash à 0,3% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma) et incubés sur la nuit. L'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488® et les anticorps anti-BrdU couplé au fluorochrome APC sont incubés successivement pendant 1h et 2h à TA. Le colorant Hoechst 33342 (intercalant de l'ADN) (Life technologies, réf. H3570) est ajouté à la suspension cellulaire avant lecture au cytomètre BD™ LSR II (BD Biosciences) afin de déterminer le contenu en ADN. L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo™ sur 50 000 cellules par échantillon.

La lecture au cytomètre permet d'analyser les cellules selon leur taille, leur granularité qui correspond à la complexité de la cellule (densité des organites, des irrégularités internes et/ou de surface) et l'intensité de plusieurs immunomarquages

fluorescents (extra- et/ou intra-cellulaires). Au sein du cytomètre, les cellules sont poussées par un système de pompe et envoyées une à une (système fluïdique) devant un (ou plusieurs) faisceau laser qui permet de mesurer ou d'évaluer les différents paramètres. La lumière diffractée mesurée en face du rayon laser émis par le cytomètre permet d'évaluer la taille des cellules (Forward Scatter, FSC). La lumière diffractée mesurée sur le côté du rayon laser donne une mesure de la granularité de la cellule (Side Scatter, SSC). Le signal HOBlue correspond au signal Hoechst 33342 et est proportionnel au contenu en ADN. L'intensité du signal BrdU correspond à l'intensité du signal du fluorochrome APC (Allophycocyanin). L'intensité du signal GFP ou Flag (MEIOB) correspond à l'intensité du signal FITC (isothiocyanate de fluorescéine).

Cible	Espèce	Clone/Référence	Source	Dilution
FLAG tag	souris	M2	Sigma-Aldrich	1/100
BrdU-APC	chimique	BU20A	Invitrogen	1/50
anti-souris Alexa Fluor® 488	âne	AB_2340846	Jackson ImmunoResearch	1/500

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

D) Construction de plasmides pour l'établissement d'une lignée cellulaire stable inductible pour MEIOB et SPATA22

Les plasmides Xlone-3HA-HsSPATA22-2-363-IRES-RFP (SC1174) et PB-CuO-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-GFP (SC1175) sont en cours de réalisation par Didier Busso (Cellule d'Ingénierie Génétique et d'Expression (CIGEx), Institut François Jacob). Ils seront obtenus par clonage SLIC (Sequence- and Ligation-Independent Cloning) qui consiste à ajouter par amplification aux extrémités de l'insert (gène d'intérêt ou autres séquences) des séquences homologues au vecteur plasmidique utilisé pour le clonage. Après traitement à la T4 DNA polymérase, des séquences simples brins complémentaires sont générées aux extrémités du vecteur et de l'insert. Ces séquences s'apparient et sont ligaturées pour générer le vecteur plasmidique contenant l'insert d'intérêt.

-plasmide Xlone-3HA-HsSPATA22-2-363-IRES-RFP (**SC1174**) :

La construction du plasmide SC1174 consiste (1) à remplacer la séquence codante de la GFP du plasmide Xlone-GFP avec la séquence IRES-RFP (Xlone-

IRES-RFP) puis (2) à insérer la séquence codante de 3xHA-HsSPATA22-2-363 par clonage SLIC dans le plasmide intermédiaire XLone-IRES-RFP. (1) Tout d'abord, la séquence IRES-RFP est amplifiée à partir du plasmide pMSCV-pBabeMCS-IRES-RFP avec les amorces SP1434 + SP1435. Le produit de PCR résultant est sous-cloné par SLIC dans le plasmide XLone-GFP digéré par *Acc65I* + *SpeI*. Le produit de PCR et le plasmide XLone-GFP digéré sont traités à la T4 DNA polymérase permettant de générer des extrémités simples brins complémentaires. Les extrémités du produit PCR et du plasmide XLone-GFP digéré s'apparient et sont ligaturées générant ainsi le plasmide intermédiaire XLone-IRES-RFP (clonage SLIC). (2) Puis, la séquence codante 3xHA-HsSPATA22-2-363 est amplifiée à partir du plasmide pKH3-HsSPATA22-2-363 (SC1172) avec les amorces SP1436 + SP1437. Le produit de PCR résultant est sous-cloné par SLIC dans le plasmide XLone-IRES-RFP digéré par *MluI*-HF, générant ainsi le plasmide XLone-3HA-HsSPATA22-2-363-IRES-RFP (SC1174).

-plasmide PB-CuO-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-GFP (**SC1175**) :

La construction du plasmide SC1175 consiste à insérer la séquence codante HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag par clonage SLIC dans le plasmide PB-CuO-MCS-IRES-GFP-EF1 α -CymR-Puro (SBI System Biosciences). La séquence codante HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag est amplifiée à partir du plasmide pCIG-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-HsSPATA22-1-363 (SC0585) avec les amorces SP1438 + SP1439. Le produit de PCR résultant est sous-cloné par SLIC dans le plasmide PB-CuO-MCS-IRES-GFP-EF1 α -CymR-Puro (System Biosciences) digéré par *SwaI*.

A noter : La séquence complète et détaillée du plasmide PB-CuO-MCS-IRES-GFP-EF1 α -CymR-Puro n'est connue que par le fabricant. La construction du plasmide SC1175 a été désignée selon les séquences explicitées par le fabricant. La carte du vecteur SC1174 est établie avec les éléments donnés par le fabricant.

Nom	Autre nom	Séquence (5' -> 3')
SP1434	IRES-RFP_F	CCACTTCCTACCCTCGTAAACGCGTCGGGATCAATTCCGCCCC
SP1435	IRES-RFP_R	GCTCGCAGGGGAGGTGGTCTACTAGTTTAGGCGCCGGTGGAG
SP1436	3xHA-HsSPATA_F	CCTACCCTCGTAAACGCGTCTTCTGCAGGTCGACTCTAGAATG
SP1437	3xHA-HsSPATA_R	GGGCGGAATTGATCCCGGCTAGCTTAAGTTTCATTCATCACATTAATAATACTGCATC
SP1438	HsMEIOB-YF_F	GCTAGCGAATTTCGAATTTAAATATGGCAAACCTCCTTTGCAGC
SP1439	HsMEIOB-YF_R	CGCGGCCGCGGATCCGTTATCACTTATCGTCGTCATCCTTG

Tableau 5 : Liste des amorces utilisés pour la construction des plasmides SC1174 et SC1175

Plasmide	Expression protéique	Construction du plasmide
pCIG-GFP	GFP	
pCIG-HsMEIOB-1-471-cMyc-Flag-IRES-HsSPATA22-1-363 (SC0585)	hMEIOB-Myc-Flag; hSPATA22	Caburet et al., 2019 (Ebiomedecine) DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.03.075
Xlone-GFP	GFP	addgene #96930
pMSCV-pBabeMCS-IRES-RFP	RFP	addgene #127677
PB-CuO-MCS-IRES-GFP-EF1 α -CymR-Puro	GFP	SBI System Biosciences, cat. # PBQM812A-1
pKH3-3xHAtag-hSPATA22	3xHA-hSPATA22	Ribeiro et al., en reviewing (partie Résultats)

Tableau 6 : Liste des plasmides utilisés pour la construction des plasmides SC1174 et SC1175

II) Résultats supplémentaires

A) Expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules cancéreuses

Certains cancers expriment de façon ectopique des gènes de cellules germinales, appelés alors CTA (Fratta et al., 2011). *MEIOB* et *SPATA22* font partis de ces gènes et sont exprimés dans certains types de cancers (Wang, C. et al., 2016). Leur expression ectopique pourrait modifier/participer au comportement cancéreux des cellules qui les expriment. Nous avons tout d'abord cherché à caractériser l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules cancéreuses en déterminant leur expression préférentielle et leur niveau d'expression associé au sein des différents tissus tumoraux et lignées cancéreuses. Pour cela, nous avons analysé les données de séquençages transcriptomiques accessibles en ligne provenant des tissus sains et tumoraux issus de patients et des lignées cancéreuses humaines. Les profils d'expression différentielle ont été établis parmi 33 types tissulaires différents et 934 lignées cellulaires à l'aide du logiciel GEPIA et ATLAS (accessibles en ligne).

Dans les tissus sains (normaux) humains, *MEIOB* et *SPATA22* sont tous deux fortement exprimés dans les tissus testiculaires adultes (*MEIOB*: 49 TPM ; *SPATA22*: 169 TPM) (**Figure 22 A et B**) avec une forte corrélation d'expression (**Figure 23 B**, $R= 0,57$, $p\text{-value}=8,9.10^{-16}$). La faible expression dans les ovaires adultes humains s'explique par le fait que la phase connue d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* (la prophase I) a lieu en vie fœtale chez la femme. De façon générale, *MEIOB* et *SPATA22* ne s'expriment que faiblement dans les tissus somatiques ($>0,4$ TPM) (à l'exception des cellules myéloïdes (69 TPM) pour *MEIOB* en absence de corrélation d'expression (**Figure 23 A** ; $R=-0,034$, $p\text{-value}=0,37$). Donc l'expression mutuelle de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus sains (adultes) est principalement restreinte au testicule (avec un niveau d'expression élevé). Cette expression restreinte aux gonades corrèle avec les données d'expression méiotique spécifiques décrits dans les différents modèles d'étude de *MEIOB* et *SPATA22* (Ishishita et al., 2013; La Salle et al., 2012; Souquet et al., 2013).

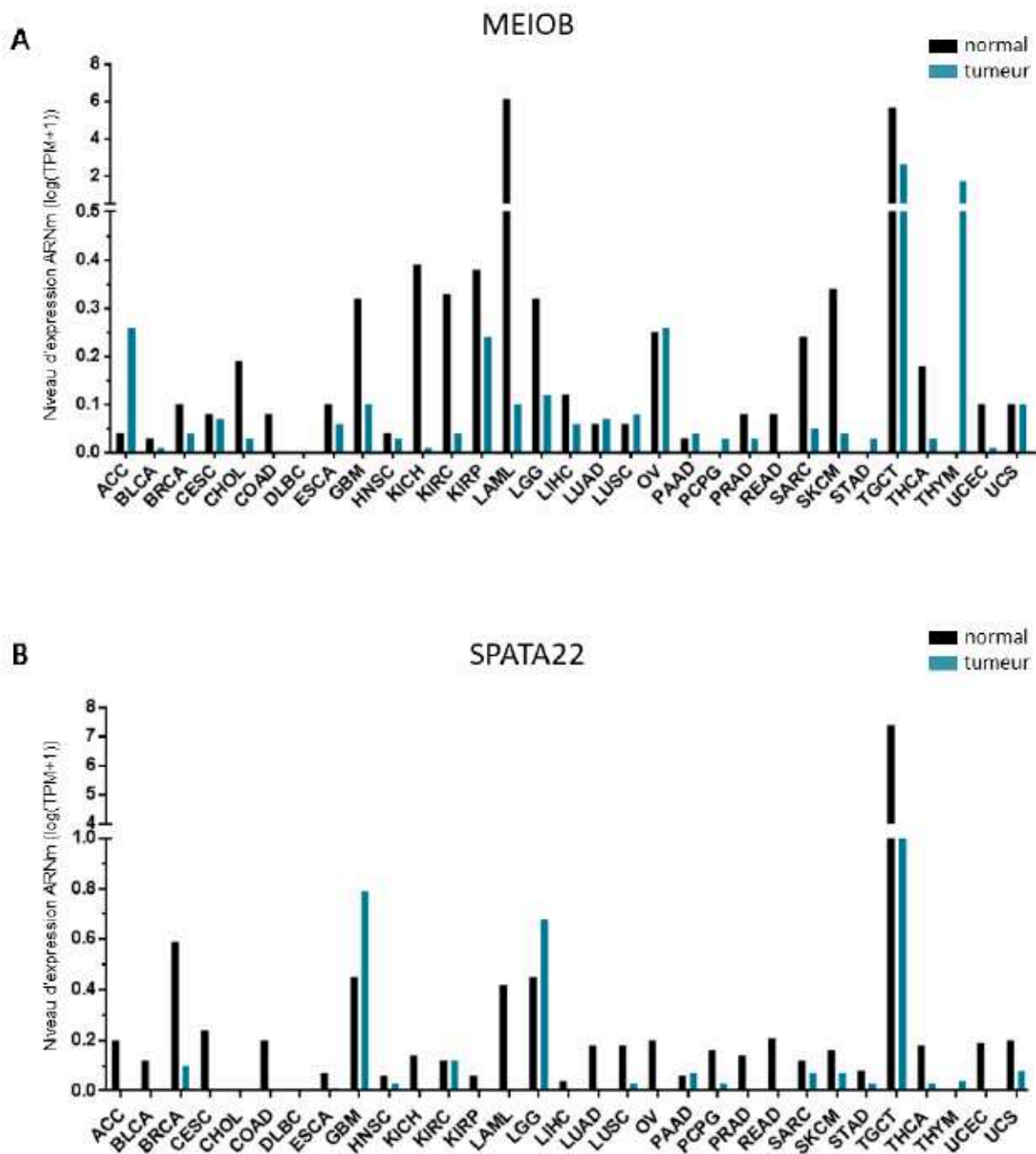


Figure 22 : Expression de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus sains et tumoraux humains

A) Profils d'expression différentielle de *MEIOB* dans les tissus sains (normaux) et tumoraux humains.
 B) Profil d'expression différentielle de *SPATA22* dans les tissus sains (normaux) et tumoraux humains.
 L'analyse de l'expression transcriptomique différentielle de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus sains (normaux, en noir) et tumoraux (en bleu) associés a été établie à l'aide du logiciel en ligne GEPIA parmi différents types tissulaires. Le niveau d'expression d'ARN est exprimé en $\log_2(\text{TPM}+1)$. Les niveaux d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* et les abréviations des tissus et sont explicités dans le Tableau 1 et le Tableau 2, respectivement (paragraphe I) Matériels et méthodes des résultats supplémentaires).

Dans les tissus tumoraux, *MEIOB* s'exprime majoritairement dans les tumeurs testiculaires (TGCT: 5,11 TPM), du thymus (THYM: 2,37 TPM), des surrénales (ACC: 0,2 TPM), des ovaires (OV: 0,2 TPM) et des reins (KIRP: 0,18 TPM) (**Figure 22, A**) alors que *SPATA22* s'exprime dans les tumeurs testiculaires (TGCT: 7,4) et celles du cerveau (GBM: 0,73 TPM; LGG: 0,6 TPM) (**Figure 22, B**). De façon globale, *MEIOB* est exprimé dans de plus nombreux types tissulaires tumoraux que *SPATA22* (**Figure 22, A et B**). Le cerveau (GBM et LGG) et le testicule (TGCT) sont les tissus principaux qui expriment conjointement *MEIOB* et *SPATA22* (>0,1 TPM) (**Figure 22, A et B**) bien que d'autres tumeurs (seins, œsophage, tête/cou, reins, poumons, pancréas, surrénales, os, peau) sont aussi capables de les exprimer tous les deux (> 0,01 TPM) (**Figure 22, A et B**). Leurs expressions sont fortement corrélées dans les tumeurs testiculaires ($R=0,44$, $p\text{-value}=6,1 \cdot 10^{-8}$) contrairement aux tissus somatiques ($R=0,017$, $p\text{-value}=0,11$) (**Figure 23, A et B**). *MEIOB* et *SPATA22* sont donc exprimés conjointement dans les tissus tumoraux testiculaires ainsi que dans de certains tissus tumoraux somatiques avec des niveaux d'expression variables.

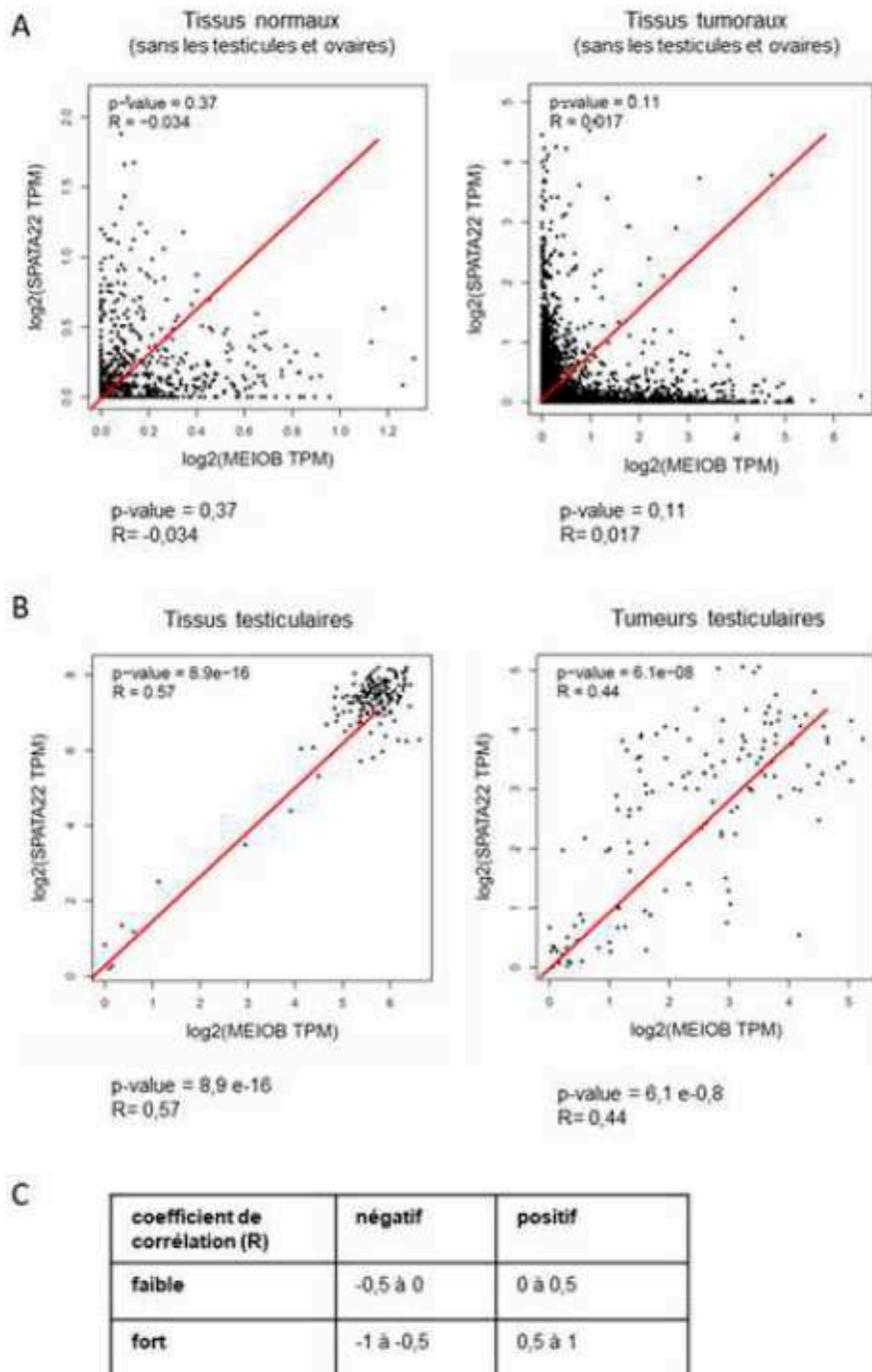


Figure 23 : Corrélation d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus sains (normaux) et tumoraux humains

A) Diagrammes de corrélation d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus somatiques sains (ou normaux, à gauche) et tumoraux (à droite). B) Diagrammes de corrélation d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus testiculaires sains (ou normaux, à gauche) et tumoraux (à droite). C) Tableau informatif des niveaux de corrélation (R). Les diagrammes ont été obtenus à l'aide du logiciel en ligne GEPIA. Le niveau d'expression est exprimé en $\log_2(\text{TPM})$. Les corrélations linéaires (R) d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* sont automatiquement déterminés par test de Pearson et la significativité de la corrélation est indiquée (p-value) pour chaque condition.

Dans les lignées cancéreuses humaines, *MEIOB* est plus fréquemment exprimé que *SPATA22* (> 0,1 TPM) (**Figure 24, A**) et sont exprimés conjointement dans 29/934 lignées cellulaires (>0,1 TPM) (**Figure 24, B**). Parmi ces 29 lignées, *MEIOB* est le plus fortement exprimé dans les lignées myéloïdes K-562 (13 TPM) et de poumons NCI-H661 (12 TPM) ; alors que ce sont les lignées de poumons SHP-77 (26 TPM) et des tissus mous (9 TPM) qui expriment le plus fortement *SPATA22*. Les lignées provenant de poumons NCI-H2342 et NCI-H661 et de tissus conjonctifs TE441,T les expriment conjointement avec des niveaux d'expression similaires de *MEIOB* et *SPATA22* pour chaque lignée (> 1TPM).

L'analyse de l'expression de *MEIOB* et *SPATA22* dans les tissus tumoraux humains et les lignées cancéreuses humaines montre que *MEIOB* et *SPATA22* sont préférentiellement exprimés seuls avec une fréquence, des niveaux d'expression et des types tissulaires variables. Pour autant, certaines tumeurs et lignées cellulaires expriment conjointement *MEIOB* et *SPATA22*, bien qu'avec des niveaux d'expression hétérogènes. Au vu du rôle de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules méiotiques dans la réparation de l'ADN, leur expression conjointe dans certains cancers pourrait être associée à une fonctionnalité dans les cancers qui les expriment.

B) Etude de l'influence de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* sur le cycle cellulaire

L'ensemble des connaissances que nous avons de *MEIOB* et *SPATA22* suggère qu'elles collaboreraient avec RPA dans la réparation des cassures de l'ADN dans les cellules germinales (Hays et al., 2017; Luo et al., 2013). Dans les cellules mitotiques, RPA est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires dont la réplication et la réparation de l'ADN (Oakley et Patrick, 2010). Cette expression conjointe de *MEIOB* et *SPATA22* dans certains cancers pourrait modifier et/ou participer au métabolisme de RPA en influençant la survie/prolifération et la réparation de l'ADN dans ces cellules.

Après avoir caractérisé l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules cancéreuses, nous avons cherché à déterminer la (les) fonctionnalité(s) potentielle de cette expression. Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer le comportement prolifératif des cellules exprimant conjointement *MEIOB* et *SPATA22* dans des lignées cellulaires couramment utilisées au laboratoire (HEK293, HeLa, U2OS) par surexpression transitoire de *MEIOB* et *SPATA22*. Au vu du faible taux de transfection des cellules HeLa et U2OS, nous avons initié notre étude préliminaire au sein des cellules HEK293, qui semblent exprimer et supporter davantage nos conditions expérimentales. Nous avons ainsi cherché à déterminer les capacités de prolifération et survie des cellules en présence de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules HEK293. Les cellules HEK293 sont transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la GFP (contrôle) ou la co-expression de *MEIOB* et *SPATA22*. Elles sont passées etensemencées au même nombre 24h après transfection et comptabilisées à 24h et 48h après passage pour chaque condition sur trois réplicats indépendants (n=3) (**Figure 25, A**).

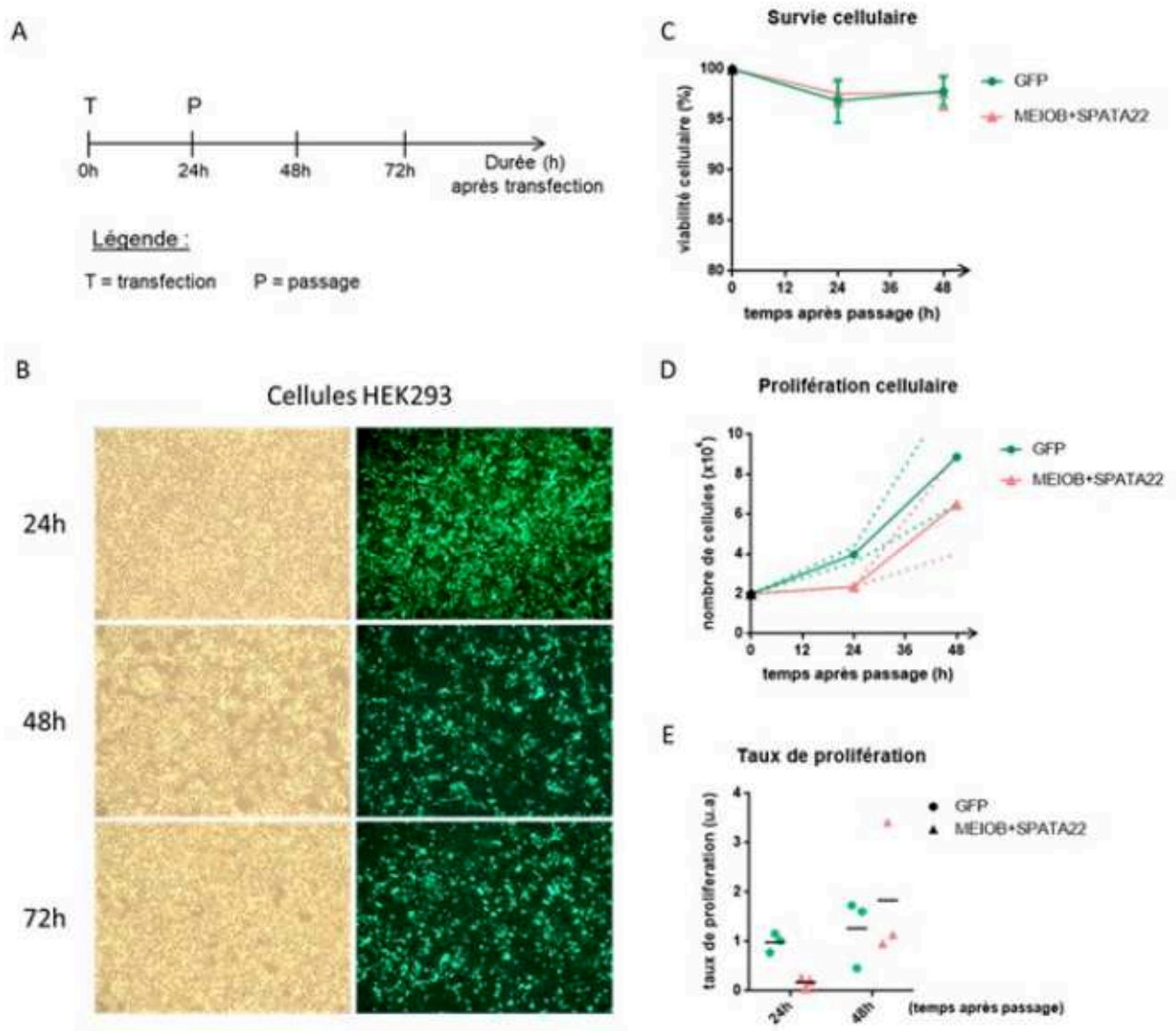


Figure 25 : MEIOB et SPATA22 induisent un retard de prolifération des cellules HEK293

A) Schéma du protocole expérimental. B) Images des cellules HEK293 exprimant la GFP 24h, 48h et 72h après transfection. Les cellules se comportent normalement avant et après passage et expriment la protéine GFP dès 24h après transfection. Les images des cellules transfectées avec le plasmide permettant l'expression de la GFP sont prises à 24h, 48h et 72h après transfection. La fluorescence verte correspond à la protéine GFP. C) Survie cellulaire en présence de MEIOB et SPATA22. Les écarts-types sont représentés par des barres. D) Prolifération cellulaire en présence de MEIOB et SPATA22. Les écarts-types sont représentés sous formes de lignes en pointillé. E) Taux de prolifération cellulaire en présence de MEIOB et SPATA22. La viabilité, la prolifération et le taux de prolifération sont déterminés à 24h et 48h après passage (soit 48h et 72h post-transfection) pour chaque condition sur trois réplicats indépendants (n=3).

Simplement en les observant, les cellules sont d'apparence et de comportement normaux jusqu'au moins 72h après transfection pour les cellules transfectées avec la GFP ou avec MEIOB et SPATA22 (absence de mort cellulaire apparente liée à la transfection et/ou au passage). Et, la protéine fluorescente GFP s'exprime fortement dès 24h et jusqu'à 72h après transfection, ce qui atteste des bonnes conditions de transfection (contrôle de transfection) (**Figure 25, B**). La viabilité des cellules est de plus de 97% indépendamment de la présence de la GFP (à 24h: 96,9%, écart-type $\sigma=2,1$ et à 48h: 97,8%, $\sigma=1,4$) ou de MEIOB et SPATA22 (à 24h: 97,6%, $\sigma=1,2$ et à 48h: 97,8%, $\sigma=1,7$) jusqu'à 48h après passage (**Figure 25, C**). Donc MEIOB et SPATA22 ne semblent pas induire de toxicité cellulaire puisqu'elles n'influencent pas sur la survie des cellules. Pour autant, en présence de MEIOB et SPATA22 les cellules ne reprennent leur prolifération qu'à partir de 24h après passage (taux de prolifération $_{24h} = 0,2$, $\sigma=0,1$ et taux de prolifération $_{48h} = 1,8$, $\sigma=1,4$) alors qu'en présence de GFP le nombre de cellules double toutes les 24h après passage (taux de prolifération $_{24h} = 1$, $\sigma=0,2$ et taux de prolifération $_{48h} = 1,3$, $\sigma=0,7$) (**Figure 25, D et E**). La présence de MEIOB et SPATA22 semble induire un retard de reprise de prolifération ; bien que la capacité de prolifération ne semble pas affectée par la suite.

Au vu des données sur la prolifération cellulaire, nous avons cherché à mieux comprendre le retard de reprise de prolifération des cellules en présence de MEIOB et SPATA22 en étudiant l'impact de leur expression ectopique sur la progression du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires. Les cellules HEK293 sont transfectées comme précédemment avec un plasmide permettant l'expression de la GFP ou la co-expression de MEIOB et SPATA22 et passées 24h après transfection pour favoriser leur prolifération. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été analysée après incorporation de BrdU par analyse biparamétrique par cytométrie en flux à 24h et 48h après transfection (soit avant et après passage, respectivement) sur une seule expérience (n=1). Cette approche permet d'analyser spécifiquement les cellules qui expriment la GFP ou MEIOB et SPATA22. Les résultats obtenus sont des données préliminaires sur l'influence de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* sur la prolifération des cellules.

A 24h et 48h post-transfection, les cellules ne meurent qu'à hauteur de 4% (phase subG1) indépendamment de l'expression de la GFP ou de MEIOB et

SPATA22 (**Figure 26, A et B**). Ces données attestent que l'expression de GFP ou de MEIOB et SPATA22 n'induit pas de toxicité cellulaire et corrèlent avec les résultats de survie cellulaire estimés précédemment. A 24h post-transfection, les cellules qui n'expriment pas la GFP (GFP⁻) ou qui n'expriment pas MEIOB et SPATA22 (MEIOB⁻) sont à plus de 50% en phases G0/G1, à 35% en phase S et seulement 7% en phases G2/M (**Figure 26, A et B**). Environ 60% des cellules expriment la GFP (GFP⁺) ou MEIOB et SPATA22 (MEIOB⁺) (**Figure 27**). Elles se répartissent de façon similaire dans les différentes phases du cycle : plus de 40% en phase G0/G1, 45% en phase S et moins de 4% en phases G2/M (**Figure 26, A et B**). Cette augmentation de la répartition des cellules transfectées (GFP ou MEIOB+SPATA22) en phase S suggère que (1) les cellules en phase S sont plus réceptives à la transfection plasmidique ou que (2) la transfection (ou l'expression d'un transgène exogène) induit un ralentissement ou un blocage des cellules en phase réplivative. La transfection et/ou l'expression initiale des transgènes pourrait induire un stress cellulaire et favoriser l'activation de points de contrôle du cycle cellulaire aboutissant à l'accumulation des cellules en phase S.

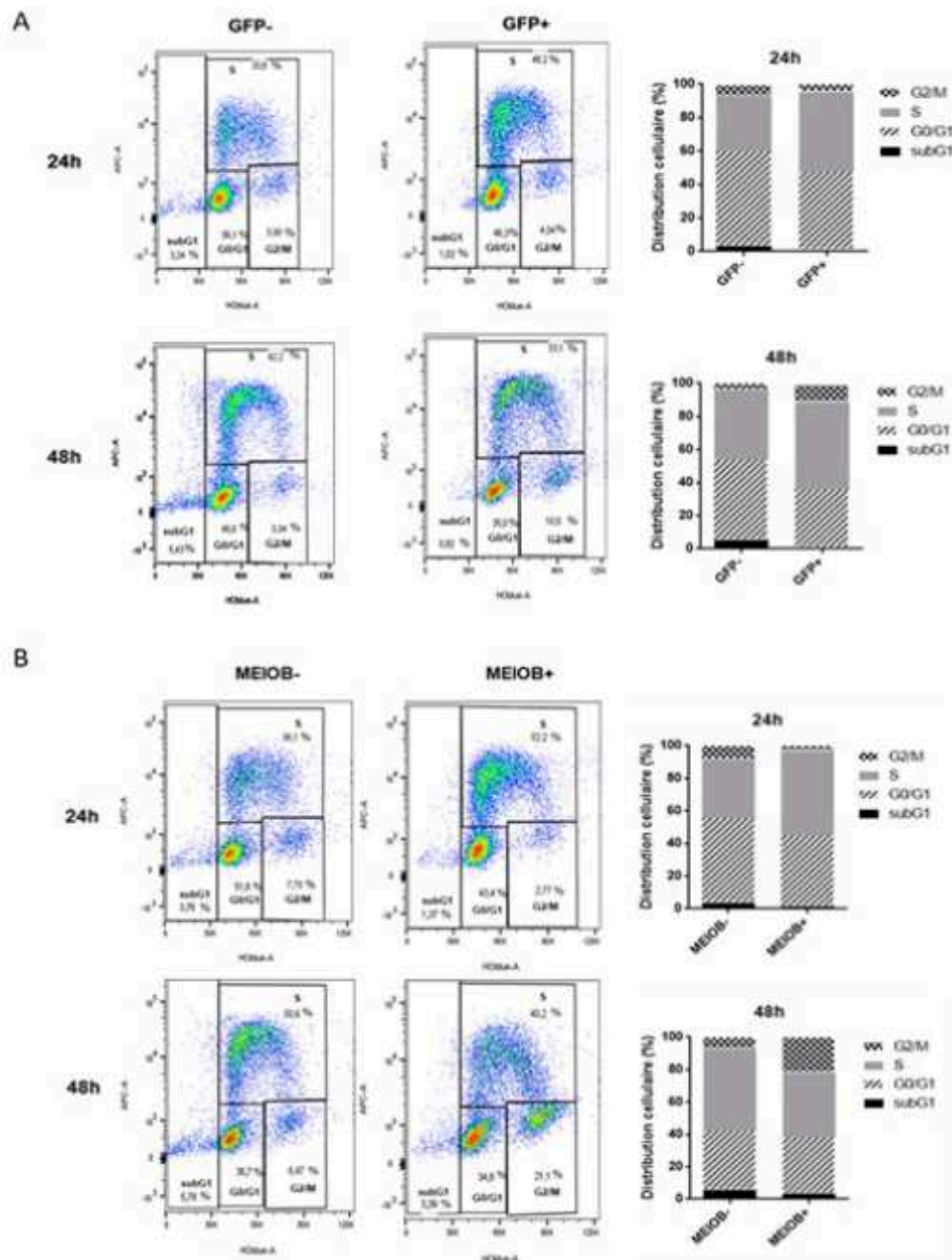


Figure 26 : Distribution au sein du cycle cellulaire en présence de GFP ou de MEIOB et SPATA22 des cellules HEK293 par cytométrie en flux

A) Profils de distribution cellulaire des cellules exprimant la GFP (GFP+) ou non (GFP-) à 24h et 48h post-transfection et histogrammes correspondants. B) Profils de distribution cellulaire des cellules exprimant MEIOB et SPATA22 (MEIOB+) ou non (MEIOB-) à 24h et 48h post-transfection et histogrammes correspondants. L'incorporation de BrdU a été utilisée pour déterminer le statut prolifératif des cellules. L'intensité du signal BrdU (APC) est représentée en fonction du contenu en ADN (HOBlue). Le pourcentage de cellules dans les différentes phases est indiqué pour chaque condition (n=1).

A 48h post-transfection, la proportion de cellules GFP⁻ et MEIOB⁻ augmentent de 10% en phase S (40-50%) par rapport à 24h et suggère qu'elles prolifèrent activement 24h après passage (**Figure 26, A et B**). Les cellules qui expriment encore la GFP (GFP⁺) ou MEIOB et SPATA22 (MEIOB⁺) à 48h diminuent de 20% et 10%, respectivement, par rapport à 24h (**Figure 27**). La diminution des cellules qui expriment la GFP ou MEIOB et SPATA22 entre 24h et 48h post-transfection peut être liée à une diminution de la quantité de plasmides dû (1) à l'effet de dilution des plasmides lors de la multiplication cellulaire et/ou (2) à l'augmentation de la dégradation des plasmides au cours du temps au sein des cellules. Cette diminution ne semble pas être due à la mort préférentielle des cellules transfectées au vu de la faible proportion de cellules en phase subG1 à 48h (**Figure 26, A et B**). A 48h, la proportion des cellules GFP⁺ est similaire à celle des cellules à 24h (faible diminution en phase G0/G1) (**Figure 26, A**). En revanche, la proportion des cellules MEIOB⁺ a diminué en phase G0/G1 et S, et a augmenté notablement en phase G2/M à 48h par rapport à 24h (**Figure 26, B**). A 48h, les cellules GFP⁺ semblent progresser au sein du cycle cellulaire de façon similaire qu'à 24h post-transfection alors qu'en présence de MEIOB et SPATA22 les cellules s'accumulent en phase G2/M. Cette accumulation des cellules en phase G2/M suggère un ralentissement ou un blocage de la progression des cellules au sein du cycle cellulaire. Il se peut qu'une portion des cellules exprimant MEIOB et SPATA22 ne progressent pas au-delà de la phase G2/M. L'accumulation de défauts de réplifications et/ou de cassures de l'ADN pourraient favoriser l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire et induire l'arrêt de progression du cycle cellulaire jusqu'à potentiellement induire la mort de ces cellules.

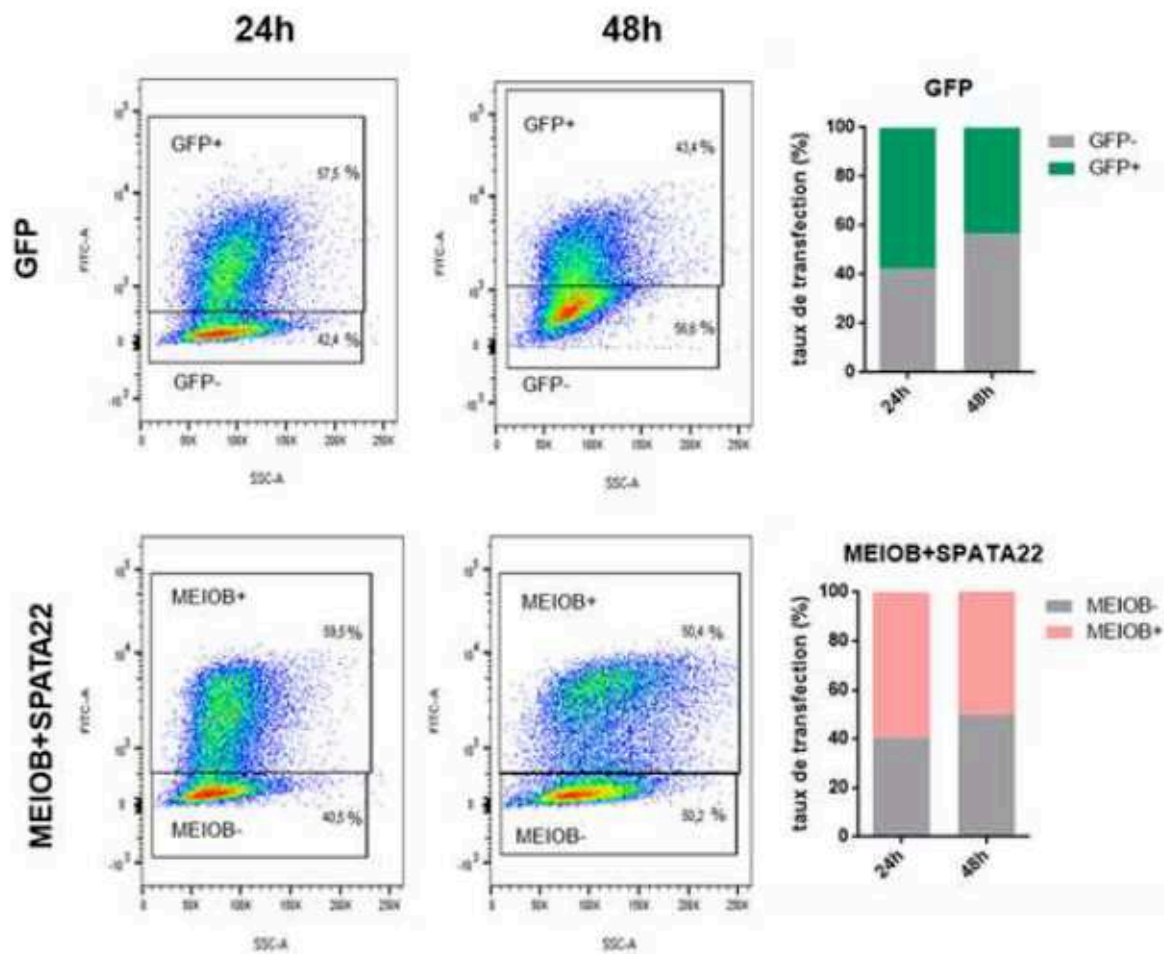


Figure 27 : Analyse de l'expression de la GFP ou de MEIOB et SPATA22 dans les cellules HEK293 par cytométrie en flux

Les profils d'intensités des signaux GFP ou MEIOB (Flag) (FITC) sont représentés en fonction de la granularité des cellules (SSC) à 24h et 48h après transfection. Chaque point correspond à une cellule. Les histogrammes associés représentent le taux de cellules exprimant la GFP (GFP+, en vert) ou exprimant MEIOB et SPATA22 (MEIOB+, en rose) à 24h et 48h post-transfection (n=1).

L'expression transitoire de MEIOB et SPATA22 dans les cellules suggère une perturbation du cycle cellulaire. Pour autant, elle ne permet pas d'établir clairement l'impact de l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 sur la prolifération des cellules notamment à long terme. Ces données préliminaires nécessitent d'être conforter sur plusieurs réplicats. Par ailleurs, l'utilisation d'expression stable permettrait d'analyser le comportement cellulaire sur une population homogène et exprimant durablement MEIOB et SPATA22.

C) Etablissement de lignées cellulaires stables inductibles pour l'expression de MEIOB et SPATA22

L'établissement de lignées stables inductibles pour l'expression de MEIOB et SPATA22 permettra d'approfondir l'étude de l'influence de l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 sur le comportement des cellules. Ces lignées cellulaires permettront de déterminer les caractéristiques cellulaires de survie/prolifération, de réparation de l'ADN et d'instabilité génétique possiblement affectées par la présence de MEIOB et SPATA22 dans ces cellules. A la différence de l'expression transitoire, l'expression stable et inductible permet d'étudier une population cellulaire homogène qui exprime MEIOB et SPATA22 avec le même niveau d'expression. Cette expression est contrôlée dans le temps (court ou long terme) et donne la possibilité d'analyser le comportement de cellules ayant adaptées leur réponse à l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 sur le long terme.

J'ai choisi d'établir deux vecteurs d'expression plasmidique qui permettent (1) une expression inductible et indépendante pour SPATA22 (vecteur SC1174, **Figure 28A**) ou pour MEIOB (vecteur SC1175, **Figure 28B**), (2) la co-expression de protéine fluorescente associée à l'expression de MEIOB ou SPATA22 et (3) une insertion favorisée des vecteurs d'expression plasmidique dans le génome par le système PiggyBac. Chacun des vecteurs d'expression sont des vecteurs « all-in-one ». Ils contiennent l'ensemble des séquences nécessaires pour la co-expression de MEIOB (ou SPATA22) avec une protéine fluorescente, les éléments nécessaires à l'induction d'expression (promoteur, opérateur et répresseur/activateur) et l'insertion ciblée par le système PiggyBac (**Figure 28**, A et B). La construction des vecteurs plasmidiques par clonage a été réalisée par Didier Busso (CiGex, CEA).

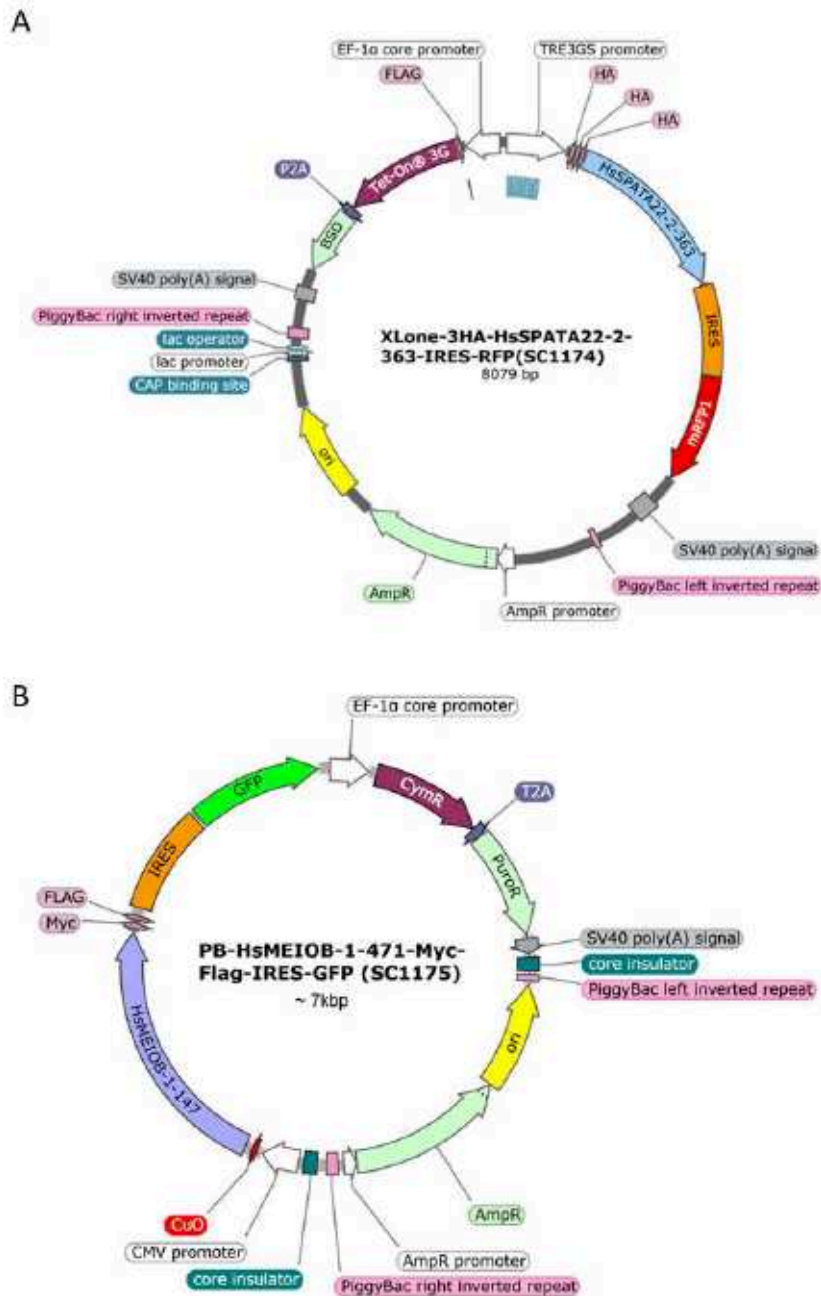


Figure 28 : Cartes des vecteurs d'expression plasmidique pour l'établissement de lignées stables inductibles pour MEIOB et SPATA22

A) Vecteur d'expression de SPATA22 (SC1174). Le plasmide SC1174 permet la co-expression de SPATA22 et de la RFP sous contrôle du promoteur Tet-On3G inductible par les tétracyclines. B) Vecteur d'expression de MEIOB (SC1175). Le plasmide SC1174 permet la co-expression de MEIOB et la GFP sous contrôle du promoteur inductible par le cumate. La carte du vecteur SC1174 est établie avec les éléments donnés par le fabricant. Les différentes séquences sont détaillées dans les Tableau 7 et Tableau 8 (Annexes).

L'expression de gènes sous contrôle de promoteur inductible permet une expression contrôlée et réversible dans le temps et de façon dose-dépendante. L'utilisation de deux promoteurs inductibles indépendants permettra ainsi d'exprimer MEIOB seule, SPATA22 seule ou MEIOB et SPATA22 ensemble et d'en moduler le niveau d'expression pour chacun des gènes dans les cellules. L'expression de *MEIOB* est sous contrôle du promoteur inductible au cumate et permet la co-expression de la protéine fluorescente GFP (verte) (**Figure 29A**). En absence de cumate, le répresseur au cumate CymR se lie à sa séquence opératrice CuO et inhibe l'expression de MEIOB et de la GFP. En présence de cumate, le cumate se fixe au répresseur CymR et induit un changement de conformation de CymR ne lui permettant plus de se fixer à sa séquence CuO. Il y a levée de l'inhibition et induction de l'expression de MEIOB et de la GFP. De façon similaire, l'expression de *SPATA22* est sous contrôle du promoteur TRE3GS inductible aux tétracyclines (doxycycline) et permet la co-expression de la protéine fluorescente RFP (rouge) (**Figure 29B**). En absence de doxycycline, le transactivateur Tet-On3G ne se fixe pas à sa séquence opératrice tet présente dans le promoteur TRE3GS et ne permet pas l'expression de SPATA22 et de la RFP. En présence de doxycycline, la doxycycline se fixe au transactivateur Tet-On3G et induit un changement de conformation de Tet-On3G. Le transactivateur peut alors se fixer au promoteur TRE3GS et induit l'expression de SPATA22 et de la RFP. Il y a activation de l'expression de SPATA22 et de la RFP.

La co-expression de protéines fluorescentes associée à celle de MEIOB et SPATA22 permettra de sélectionner les clones ayant intégrés les inserts d'intérêt, d'établir qualitativement le niveau d'expression induit de MEIOB et SPATA22 dans les cellules et de suivre les clones cellulaires exprimant MEIOB et SPATA22 en fonction du temps.

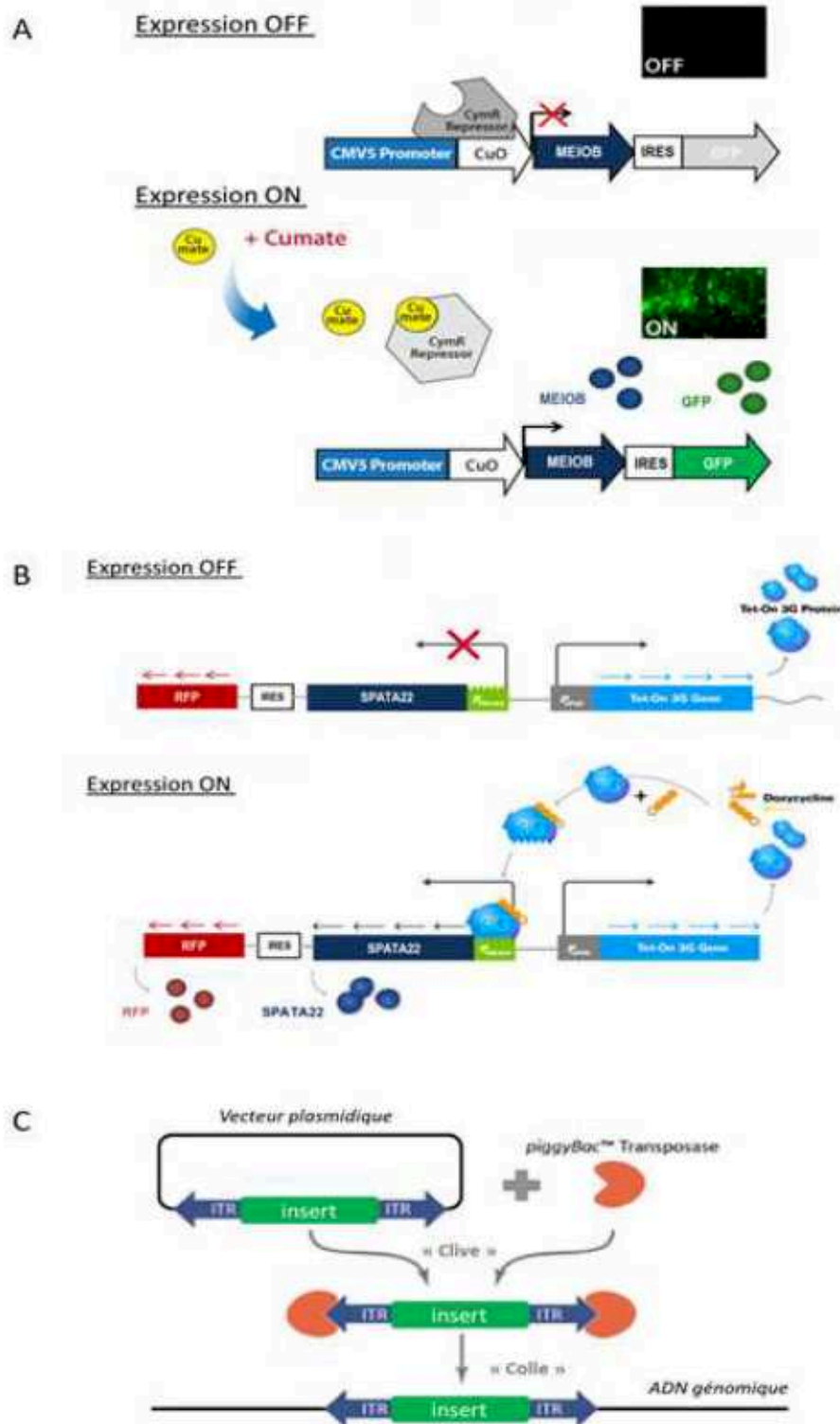


Figure 29 : Systèmes d'expression inducible et d'insertion plasmidique utilisés pour l'établissement de la lignée cellulaire stable inducible pour *MEIOB* et *SPATA22*

A) Schéma du système d'induction de l'expression de *SPATA22*. En absence de cumate, le répresseur CymR qui est exprimé constitutivement se lie à la séquence opératrice CuO et inhibe l'expression de *MEIOB* et de la GFP (expression OFF). En présence de cumate, le cumate se fixe au

répresseur CymR et ne permet plus la fixation de CymR à Cuo : MEIOB et la GFP sont alors exprimées (expression ON). B) Schéma du système d'induction de l'expression de MEIOB. En absence de doxycycline, le transactivateur Tet-On 3G qui est exprimé constitutivement ne peut pas se fixer au promoteur TRE3GS : SPATA22 et la RFP ne sont alors pas exprimés (expression OFF). En présence de doxycycline, la doxycycline se lie au transactivateur Tet-On 3G qui peut à présent se fixer sur le promoteur TRE3GS et induit la co-expression de SPATA22 et de la RFP (expression ON). C) Schéma du système d'insertion plasmidique PiggyBac. La transposase PiggyBac reconnaît les séquences ITR situées de chaque côté de la séquence à insérer (ou insert) du vecteur plasmidique. La transposase PiggyBac clive au niveau des séquences ITR et insère la séquence d'intérêt dans le génome de la cellule hôte au niveau des séquences répétées TTAA.

Pour établir une lignée stable, les séquences plasmidiques d'intérêt seront insérées au sein du génome des cellules hôtes par le système PiggyBac (**Figure 29C**). Ce système permet une insertion stable facilitée et ciblée des séquences d'intérêt au sein du génome hôte, sans limite de taille et du nombre de séquences à insérer (insertion multiple et jusque 100kpb par insert) et est réversible. Les vecteurs d'expression plasmidique pour MEIOB (SC1175) et pour SPATA22 (SC1174) contiennent les séquences ITR (inverted terminal repeat) qui délimitent les séquences d'intérêt à insérer (ou inserts) dans le génome hôte. La transposase PiggyBac reconnaît les séquences ITR, clivent au niveau de ces séquences et insère les séquences comprises entre les deux éléments ITR dans le génome de la cellule hôte au niveau des séquences génomiques répétées TTAA.

Discussion

Discussion

Mes travaux de thèse ont eu pour but de mieux comprendre le rôle que joue MEIOB et SPATA22 au cours de la recombinaison homologue méiotique et d'explicitier les conséquences de leur expression dans les cellules cancéreuses. Les résultats obtenus chez la souris et par des approches *in vitro* permettent de proposer que MEIOB et SPATA22 pourraient être impliquées à différentes étapes au cours de la recombinaison méiotique. Les résultats préliminaires obtenus sur l'expression ectopique de MEIOB et SPATA22 suggèrent que leur coexpression pourrait induire une modification du comportement cellulaire.

I) MEIOB, SPATA22 et RPA en recombinaison méiotique

A) MEIOB et SPATA22 interagissent avec RPA

La caractérisation moléculaire de MEIOB et SPATA22 a permis de mettre en évidence des similitudes structurelles avec les sous-unités du complexe RPA, RPA1 et RPA2, respectivement. En se basant sur ces similitudes, nous avons montré que MEIOB et SPATA22 interagissent ensemble via leurs domaines OB C-terminaux. Ces domaines constitueraient le cœur de dimérisation du complexe MEIOB-SPATA22. Nous avons montré l'importance de cette interaction dans un cas familial d'insuffisance ovarienne prématuré où une mutation ponctuelle induit l'absence d'une grande partie du domaine OB C-terminale de MEIOB. Cette interaction entre les domaines OB C-terminaux ressemble à celle des sous-unités du complexe RPA. Les données dont nous disposons actuellement ne permettent pas de conclure si MEIOB et SPATA22 forment un dimère ou un trimère ou autre. Ce trimère pourrait se composer de (1) deux protéines MEIOB et une de SPATA22, (2) deux protéines SPATA22 et une de MEIOB ou (3) de MEIOB, SPATA22 et d'un autre partenaire.

L'équipe du Dr Wang a proposé que MEIOB et SPATA22 collaborent pour interagir avec RPA3 (Xu, Y. et al., 2017). L'interaction des différents domaines OB C-terminaux de MEIOB, SPATA22 et RPA3 pourrait permettre de former un trimère de façon similaire aux sous-unités de RPA. Cependant, le complexe MEIOB-SPATA22 est stable *in vitro*. De plus, Shi et al., ont montré que l'absence de RPA1 induit l'absence de RPA2 et RPA3 dans les spermatocytes de souris alors que la

localisation de MEIOB et SPATA22 reste inchangée (Shi et al., 2019) suggérant que MEIOB et SPATA22 pourraient former un complexe fonctionnel à elles seuls. Il se pourrait aussi que cette interaction avec RPA3 permette à MEIOB et SPATA22 d'interagir avec le complexe RPA entier. Le fait que RPA ne semble fonctionnel que sous forme de complexe (Shi et al., 2019) suggère davantage que les domaines C-terminaux de MEIOB et SPATA22 permettent d'interagir avec le complexe RPA entier.

Pour autant, l'équipe du Dr Wang a aussi décrit des capacités d'interaction de MEIOB avec RPA1 et de SPATA22 avec RPA2 et RPA1 lors de surexpressions protéiques. Ces interactions se font en absence des domaines C-terminaux de MEIOB et SPATA22. Nous avons confirmé cette capacité d'interaction entre RPA1 et MEIOB. Cependant, cette interaction est labile par rapport à celle impliquant les domaines C-terminaux de MEIOB et SPATA22 avec RPA. Ces interactions ne pourraient simplement être que le résultat d'interactions non spécifiques entre domaine OB de protéines surexprimées. Elles pourraient aussi refléter des interactions secondaires qui stabilisent l'interaction première du complexe assurée par les domaines C-terminaux de MEIOB et SPATA22 avec le complexe RPA.

La détermination de la structure du complexe MEIOB-SPATA22 par cristallographie permettrait d'établir la stœchiométrie (dimère, trimère ou multicomplexe) et le(s) domaine(s) d'interaction impliqué dans la formation du complexe. Cette technique peut aussi être utilisée afin de mieux comprendre l'interaction de MEIOB et SPATA22 avec RPA : notamment, de déterminer (1) si l'interaction se fait avec le cœur de trimérisation de RPA, (2) si l'interaction avec RPA se fait via une sous-unité spécifique ou (3) si de multiples interactions sont impliquées avec les sous-unités de RPA.

B) MEIOB et SPATA22, une collaboration avec RPA en recombinaison méiotique ?

Luo et al., et notre équipe avons montré que MEIOB et SPATA22 sont capables de lier l'ADNsb (Luo et al., 2013). Nous avons aussi montré que MEIOB et SPATA22 sont capables de compacter l'ADNsb préalablement recouvert par RPA. Cette modification de la conformation du filament d'ADNsb-RPA est due à la liaison de MEIOB et SPATA22 avec l'ADNsb et/ou avec RPA. Ces observations suggèrent que MEIOB et SPATA22 apportent des propriétés structurales et/ou d'interactions spécifiques aux intermédiaires de recombinaison liés par RPA au cours de la méiose.

Dans nos mutants *shani*, nous avons observé la perte précoce des recombinaisons. Cette altération de protéines impliquées lors de l'invasion en RH méiotique dans nos mutants suggère que les intermédiaires pré-synaptiques ne sont pas formés ou stabilisés correctement. MEIOB et SPATA22 pourraient jouer un rôle en collaboration avec RPA lors de la formation du filament recombino-gène par exemple (a) en modulant l'activité de liaison à l'ADNsb de RPA ou bien (b) en inhibant le déplacement précoce et/ou excessif de RPA par les recombinaisons. Récemment, MEILB2 et son partenaire BRME1 ont été identifiés comme deux protéines spécifiques de la méiose nécessaires au chargement des recombinaisons. MEILB2/BRME1 interagit avec BRCA2, RAD51, DMC1, MEIOB et SPATA22 dans les testicules. Le fait que (1) l'intensité des foyers SPATA22 augmente en absence de MEILB2/BRME1 et que (2) les foyers MEILB2/BRME1 sont fortement réduits en absence de MEIOB (Zhang, J. et al., 2019, 2020) supportent l'idée que MEILB2/BRME1 pourrait favoriser l'enlèvement de MEIOB et SPATA22 et faciliter le chargement des recombinaisons via BRCA2 (**Figure 30**). Il serait intéressant d'évaluer la capacité de formation d'un filament RAD51-DMC1 en présence de MEILB2/BRME1/BRCA2 et de MEIOB-SPATA22. De même, les modalités d'interaction entre MEIOB, SPATA22 et MEILB2/BRME1 sont à définir afin d'explicitier comment MEIOB et SPATA22 participent à la formation du filament recombino-gène en présence de MEILB2/BRME1.

Chez *S. cerevisiae*, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine indiquent que RPA est aussi présent sur le brin déplacé lors de la formation de la D-Loop (Wang, X. et Haber, 2004). Par conséquent, MEIOB et SPATA22 pourraient

également être présentes sur ce brin et ainsi donner une structure et une identité particulière à la D-Loop méiotique (**Figure 30**)

MEIOB et SPATA22 pourraient aussi collaborer avec RPA sur des intermédiaires de recombinaison plus tardifs que celui de la formation du filament recombinogène et de la formation de la D-Loop lors de l'invasion. L'accumulation de BLM dans nos mutants *shani* suggère une progression anormale des intermédiaires de recombinaison et pourrait refléter la prise en charge d'intermédiaires post-synaptiques anormaux par l'hélicase. Cette accumulation a aussi été observée dans les souris *Meiob*^{-/-} (Ribeiro et al., 2018). En absence de MEIOB ou de SPATA22, BLM pourrait être recrutée afin de démanteler les intermédiaires post-synaptiques qui n'arrivent pas ou de façon incorrecte à progresser en recombinaison. La détection d'une synthèse d'ADN dans les cellules méiotiques des souris *Meiob*^{-/-}, *Spata22*^{-/-} ou nos mutants *shani* permettrait de déterminer si en absence de MEIOB ou SPATA22 les intermédiaires progressent après l'invasion. La compaction du filament MEIOB-SPATA22-RPA pourrait favoriser la formation et la stabilité des intermédiaires post-synaptiques en facilitant la stabilité, la migration et/ou l'extension de la D-Loop. La présence de MEIOB et SPATA22 aux intermédiaires post-synaptiques liés par RPA pourrait permettre à ces intermédiaires d'adopter une conformation spécifique favorisant leur stabilisation. Ils peuvent également favoriser le recrutement de facteurs spécifiques à ces intermédiaires.

La stabilisation des intermédiaires de la D-Loop en présence de MEIOB et SPATA22 pourrait aussi favoriser la second-end capture et la formation de la dJH. La présence de MEIOB et SPATA22 pourrait permettre le contact d'intermédiaires liés par RPA situés entre la D-Loop et le brin qui n'a pas envahi pour induire la second-end capture. Le fait que MEIOB et SPATA22 colocalisent avec RPA jusqu'en début de pachytène dans les cellules germinales soutient l'idée que MEIOB et SPATA22 apportent des caractéristiques spécifiques à ces intermédiaires. MEIOB et SPATA22 pourraient interagir avec des protéines liées à des intermédiaires de recombinaison tardifs tels que le complexe stabilisateur des intermédiaires post-synaptiques MSH4-MSH5. Il serait intéressant de savoir si dans les gonades MEIOB et SPATA22 interagissent avec MSH4-MSH5 par immunoprécipitation pour savoir si MEIOB et SPATA22 possède un rôle tardif favorisant la formation des CO. La détermination d'autres interagants de MEIOB et SPATA22 dans les cellules méiotiques par coimmunoprécipitation associée à une analyse par spectrométrie de masse

permettrait d'établir de nouvelles fonctionnalités du complexe au cours de la recombinaison et/ou d'étayer le mécanisme d'action du complexe au niveau des différents intermédiaires de la recombinaison.

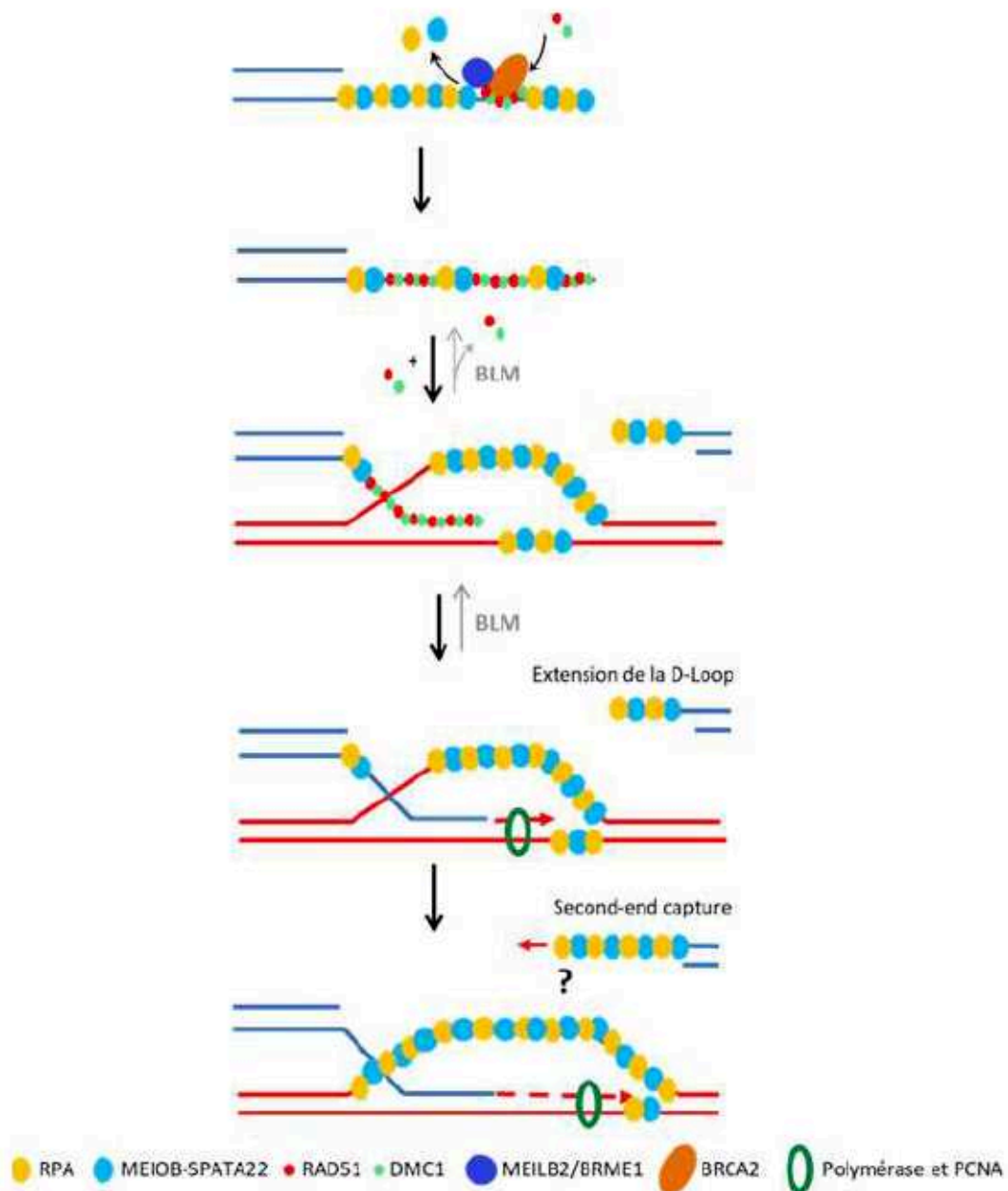


Figure 30: Modèle du rôle de MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique

MEIOB-SPATA22 pourrait être impliqué dans la formation du filament recombinogène. Le complexe MEILB2/BRME1 favoriserait l'enlèvement de MEIOB-SPATA22 pour permettre le chargement des recombinases par BRCA2. MEIOB-SPATA22 pourrait aussi collaborer avec RPA pour stabiliser les intermédiaires de la D-Loop et favoriser l'extension et/ou la migration de la D-Loop. MEIOB et SPATA22 pourrait favoriser la second-end capture. MEIOB-SPATA22 permettrait le contact d'intermédiaires liés par RPA situés entre la D-Loop et le brin qui n'a pas envahi pour induire la second-end capture.

II) Le mutant *shani*

A) L'étude du mutant *shani*

La région N-terminale de *Spata22* ne possède pas de structure fonctionnelle apparente et n'est pas impliquée dans l'interaction avec son partenaire MEIOB. Pour autant, une partie de cette région est particulièrement conservée chez différentes espèces, ce qui suggère une importance fonctionnelle de la région N-terminale de SPATA22. C'est dans le but de mieux comprendre l'importance de cette région que nous avons initié l'étude du mutant *shani* qui porte une mutation ponctuelle de *Spata22*.

Nous savons que MEIOB diffère de son homologue RPA1 principalement par l'absence d'un domaine OB en région N-terminale semblable à celui de RPA1 (DBD-F). Or, ce domaine DBD-F de RPA1 est connu pour son interaction avec de nombreux partenaires impliqués dans les différents rôles de RPA au sein des cellules. (1) L'absence de ce domaine au sein du complexe MEIOB-SPATA22 et le fait que (2) SPATA22 possède une région N-terminale spécifique suggèrent que ce domaine pourrait être le « hub » d'interactions de MEIOB-SPATA22. Notamment, elle pourrait être impliquée dans l'interaction avec MEILB2/BRME1. L'interaction de MEIOB-SPATA22 avec d'autres partenaires que RPA pourrait permettre au complexe MEIOB-SPATA22 (1) de spécifier et/ou moduler les fonctionnalités des différents intermédiaires liés par RPA au cours de la progression en recombinaison et/ou (2) d'apporter de nouvelles fonctionnalités au complexe indépendamment de sa collaboration avec RPA.

B) La découverte d'un élément régulateur de l'épissage de *Spata22*

Au cours de la méiose, l'expression des gènes des cellules germinales est particulièrement régulée (Ernst et al., 2019). Un programme méiotique spécifique est exprimé séquentiellement par les cellules germinales pour assurer le bon déroulement des étapes clés de la méiose (recombinaison et synapsis des chromosomes, notamment). Et, L'épissage joue un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression d'un gène (Wang, Z. et Burge, 2008).

Le mutant *shani* a permis de mettre en évidence la présence de séquences régulatrices de l'épissage, appelées ESE (Exonic Splicing Enhancer) impliquées dans la reconnaissance des jonctions exons-introns des transcrits, chez un gène à expression spécifiquement méiotique chez la souris. On peut se demander si ces séquences ESE sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes de méiose. Pour cela, il serait intéressant de déterminer (1) si une séquence ESE est spécifique à un ou plusieurs gènes méiotiques, (2) si ces séquences sont spécifiquement fonctionnelles en méiose et (2) comment ces séquences sont activées ou réprimées en fonction du gène.

Il serait intéressant de montrer si la mutation *shani* perturbe l'expression du transcrit *Spata22* spécifiquement dans les cellules germinales. L'élément ESE contenu dans l'exon 4 du transcrit *Spata22* pourrait être spécifiquement fonctionnel dans les cellules germinales et participer à la régulation méiotique spécifique de l'expression de *Spata22*. Chez la souris, quelques tissus somatiques expriment faiblement *Spata22*, notamment le foie. Il faudrait effectuer le séquençage des transcrits *Spata22* extraits de ces tissus somatiques. Ceci permettrait de déterminer une potentielle régulation transcriptionnelle spécifique de *Spata22* dans les cellules germinales.

III) MEIOB et SPATA22 dans les cancers

A) L'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules cancéreuses

Les données transcriptomiques accessibles en ligne montrent que *MEIOB* et *SPATA22* sont préférentiellement exprimés de façon mutuellement exclusive dans les cellules cancéreuses. Cependant, ils peuvent être parfois exprimés conjointement.

L'expression de *MEIOB* ou *SPATA22* diffère en fonction du type de tumeurs et de leur niveau d'expression. Ces différences d'expression entre *MEIOB* et *SPATA22* suggère que les deux gènes sont activés selon des mécanismes indépendants et potentiellement différents selon la nature tumorale. Il serait intéressant de comparer ces données d'expression transcriptionnelle avec celles des marques de modifications épigénétiques (méthylation, acétylation) pour établir un éventuel mécanisme d'activation spécifique de l'expression de *MEIOB* et/ou *SPATA22* dans les tumeurs. En plus de cela, cette expression hétérogène de *MEIOB* et *SPATA22* pourrait refléter et/ou corrélérer avec le niveau d'instabilité génétique des différents types de tumeurs. *MEIOB* et *SPATA22* pourrait induire et/ou participer à l'instabilité génétique présente au sein des différentes cellules tumorales. La comparaison des données d'expression transcriptionnelle avec celles des mutations et des variabilités génétiques permettrait d'établir un lien potentiel entre le niveau d'instabilité génétique et l'expression préférentielle de *MEIOB* et/ou *SPATA22* dans les différentes tumeurs. Notre analyse nécessite aussi d'être approfondie quant à la nature des transcrits exprimés dans les tumeurs et les lignées cancéreuses. Notamment, les transcrits de *MEIOB* et *SPATA22* pourraient être des variants transcriptionnels mutés et/ou non fonctionnels, qui ne permettent pas l'expression de formes protéiques fonctionnelles. La comparaison des données transcriptomiques avec celles protéomiques des différents cancers et lignées cancéreuses permettrait d'établir un lien probant entre l'expression de transcrits et l'expression de protéines fonctionnelles. Ces nouvelles données permettraient de mieux comprendre les caractéristiques de l'expression conjointe de *MEIOB* et *SPATA22* dans certains cancers.

B) Les rôles potentiels de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules cancéreuses

Nous avons vu que *MEIOB* et *SPATA22* collaborent pour interagir avec RPA et colocalisent aux dommages de l'ADN avec RPA dans les cellules. Ces données supportent l'idée que *MEIOB* et *SPATA22* sont capables de modifier/perturber les intermédiaires d'ADN liés par RPA dans les cellules cancéreuses. Nous avons montré que la surexpression transitoire de *MEIOB* et *SPATA22* dans une lignée cellulaire induit un retard de reprise de prolifération associé à une accumulation des cellules en phase G2/M. Ces résultats préliminaires suggèrent que l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* induit un blocage transitoire ou un ralentissement du cycle cellulaire.

L'expression de *MEIOB* et *SPATA22* étant transitoire, nous avons évalué les capacités prolifératives d'une population cellulaire mixte avec des cellules qui expriment *MEIOB* et *SPATA22* et d'autres qui ne les expriment pas. La reprise de prolifération peut être liée (1) aux cellules qui n'expriment pas *MEIOB* et *SPATA22* ou due au fait que (2) la perte d'expression de *MEIOB* et *SPATA22* au cours du temps permette la reprise de prolifération. Cette perte d'expression (totale ou partielle) de *MEIOB* et *SPATA22* pourrait induire la levée de l'inhibition de la progression du cycle cellulaire pour permettre la reprise de prolifération des cellules. Quant aux résultats de l'analyse du cycle cellulaire, ils n'ont été obtenus que sur un réplicat expérimental (n=1) et nécessitent d'être confortés (n=2 supplémentaires) afin de démontrer que *MEIOB* et *SPATA22* perturbent effectivement la progression du cycle cellulaire. Les capacités prolifératives des cellules ont été estimées jusqu'à 72h post-transfection alors que la progression du cycle cellulaire n'a été analysée que jusqu'à 48h post-transfection. Au vu de la capacité des cellules à proliférer à nouveau au-delà de 48h, la progression du cycle cellulaire est à analyser à plus long terme pour établir si en présence de *MEIOB* et *SPATA22* les cellules progressent de nouveau normalement au sein du cycle cellulaire dans ces conditions.

Afin de pallier aux biais d'expression transitoire, nous proposons d'approfondir l'influence de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* sur des lignées cellulaires exprimant conjointement *MEIOB* et *SPATA22*. Nous avons mis en évidence trois lignées cellulaires (NCI-H2342, NCI-H661, TE441,T) qui expriment conjointement *MEIOB* et *SPATA22* et nous développons une lignée cellulaire

inductible pour l'expression de *MEIOB* et/ou *SPATA22*. Ces modèles cellulaires permettraient de mieux caractériser l'influence de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* sur le comportement des cellules (prolifération/survie, instabilité génétique) et le lien potentiel avec les processus de cancérisation.

MEIOB et *SPATA22* pourraient ralentir ou bloquer temporairement les intermédiaires réplicatifs et/ou de réparation de l'ADN liés à RPA induisant l'arrêt de la progression du cycle cellulaire et de la prolifération. *MEIOB* et *SPATA22* pourraient perturber les intermédiaires de réplication (1) en inhibant la synthèse d'ADN et la progression des fourches de réplication. De plus, *MEIOB* et *SPATA22* pourraient perturber la réparation des dommages réplicatifs et post-réplicatifs notamment (2) en empêchant la réversion et le redémarrage des fourches de réplication ou (3) en perturbant la réparation des dommages de l'ADN et du stress réplicatif via l'activation d'ATM/ATR. Les modifications de la réparation des dommages liés à la réplication aboutiraient à la modification de la progression du cycle cellulaire. Les capacités prolifératives des cellules en présence de *MEIOB* et *SPATA22* dans les modèles cellulaires que nous proposons pourront être évaluées par des kits basés sur la révélation colorimétrique d'indicateurs métaboliques de la prolifération et/ou survie cellulaire (MTT assay, par exemple) et par l'immunodétection de marqueurs de prolifération, tel que Ki67, ou des marqueurs de cellules mitotiques, tel que pH3. L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux permettra de déterminer si *MEIOB* et *SPATA22* perturbent la phase de prolifération et/ou induisent un blocage de la progression du cycle cellulaire. Les modifications de l'activation et/ou réparation des dommages de l'ADN et aux stress réplicatifs pourront être estimés par immunomarquages de la forme phosphorylée de H2A.X (marqueur de cassures de l'ADN et d'activation de la voie de dommages de l'ADN et stress réplicatifs) et des acteurs de cette voie tels que ATM/ATR.

En plus des effets potentiels sur la réplication, *MEIOB* et *SPATA22* pourraient modifier (1) la capacité de réparation par les différentes voies de réparation de l'ADN (modification de la balance entre les voies NHEJ/RH) et/ou (2) les produits de réparation (réparation mutagène). La modification de la réparation de l'ADN dans les cellules pourrait favoriser une modification de la progression des cellules au sein du cycle cellulaire. L'analyse de la dynamique des protéines de réparation (NHEJ et RH) et l'analyse des produits de réparation spécifiques de la voie du NHEJ et de la RH

(tests de recombinaison et du NHEJ détaillés dans (Brandsma et Gent, 2012b)) permettraient de définir clairement l'impact de MEIOB et SPATA22 sur la réparation.

Par ailleurs, les modifications des mécanismes de réplication et/ou de réparation de l'ADN en présence de MEIOB et SPATA22 à long terme pourraient induire et/ou participer à l'instabilité génétique. Cette instabilité génétique participerait soit à favoriser les processus tumoraux (prolifération clonale, invasion/migration cellulaire, mutations) soit à sensibiliser les cellules aux agents génotoxiques (tels que les traitements anti-cancéreux) ou bien les deux. Pour déterminer l'influence de l'expression de MEIOB et SPATA22 sur la stabilité génétique, les réarrangements chromosomiques majeurs sont visibles sur étalements de cellules en métaphase (perte ou duplication de bras chromosomiques par exemple) et le séquençage génomique permettrait d'évaluer la proportion de mutations au sein du génome en présence de MEIOB et SPATA22.

A long terme, mieux comprendre l'influence que peuvent avoir MEIOB et SPATA22 et d'autres CTA sur les cellules tumorales pourraient permettre de développer un traitement thérapeutique adapter à la nature de la tumeur afin de personnaliser les traitements.

Conclusion

Conclusion

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude du rôle de MEIOB et SPATA22 en recombinaison méiotique et sur l'influence potentielle de l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans certains cancers.

Nous avons étayé les rôles du complexe MEIOB-SPATA22 au cours de la recombinaison méiotique grâce à l'étude du phénotype d'un mutant de *Spata22* chez la souris ; et, par la caractérisation structurale et des modalités d'interaction de MEIOB, SPATA22 et du complexe essentiel de liaison à l'ADNsb, RPA. Nous avons montré que MEIOB et SPATA22 interagissent par leurs domaines fonctionnels situés en C-terminal et collaborent pour interagir avec le complexe RPA. Nous proposons que MEIOB et SPATA22 forme un complexe qui collabore avec RPA au cours de la recombinaison méiotique et qu'il participe potentiellement à diverses étapes de la recombinaison méiotique. Ces travaux de thèse participent à une meilleure compréhension de la spécialisation de la recombinaison homologe en méiose. L'importance de nos travaux sur les rôles de MEIOB et SPATA22 permet aussi d'apporter de nouvelles connaissances quant aux causes des infertilités idiopathiques chez l'Homme.

Nous avons caractérisé l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cellules cancéreuses et les lignées cellulaires et initié l'étude de l'influence de cette expression sur le comportement cellulaire. Nous avons mis en évidence que certains cancers les expriment conjointement et que la surexpression de MEIOB et SPATA22 semble modifier le comportement prolifératif des cellules. Ces travaux de thèse ont permis de mieux comprendre l'expression ectopique de *MEIOB* et *SPATA22* dans les cancers et suggèrent qu'ils aient un rôle sur le comportement des cellules cancéreuses. Nous proposons de réaliser une étude plus approfondie sur un modèle de lignée cellulaire stable inductible de MEIOB et SPATA22 afin d'analyser le comportement prolifératif, les capacités de réparation de l'ADN et l'instabilité génétique dans ces cellules. Ces travaux apportent de nouvelles données sur le lien entre expression ectopique des gènes de méiose et comportement cancéreux. Ils s'inscrivent dans la perspective d'adapter les traitements anti-cancéreux en fonction des caractéristiques tumorales propres à la nature tumorale et à l'individu (thérapies ciblées).

Annexes

Annexes

Xlone-3HA-HsSPATA22-2-363-IRES-RFP (SC1174)	
AmpR promoter	promoteur du gène <i>bla</i> , utilisé pour exprimer le gène de résistance à l'ampicilline dans <i>E.coli</i>
AmpR	Gène : <i>bla</i> , produit : β -lactamase, confère la résistance à l'ampicilline
BSD	Gène : <i>Aspergillus terreus</i> BSD, produit : blasticidin S deaminase, confère la résistance à la blasticidine
CAP binding site	Catabolite Activator Protein (CAP) binding site
EF-1 α core promoter	core du promoteur du facteur d'élongation humain EF-1 α , permet l'expression de gènes dans les cellules mammaliennes
FLAG tag	épitope FLAG® tag
HA tag	épitope HA (human influenza hemagglutinin) tag
HsSPATA22-2-363	séquence codante (CDS) HsSPATA22
IRES	Internal Ribosome Entry Site (IRES) du virus encephalomyocarditis (EMCV), permet la co-translation de protéines
Kozak sequence	séquence consensus des vertébrés pour l'initiation de la traduction (Kozak, 1987)
lac operator	opérateur de l'opéron lactose (<i>E.coli</i>)
lac promoter	promoteur de l'opéron lactose (<i>E.coli</i>)
mRFP1	dérive monomérique de la DsRed (Campbell et al., 2002)
ori	origine de répllication pUC, permet la répllication du plasmide dans <i>E.coli</i>
P2A	peptide2A du virus de la fièvre aphteuse (teschovirus-1 porcin), empêche la liaison peptidique entre les résidus Gly et Pro par les ribosomes induisant la séparation de polypeptides
PiggyBac left inverted repeat	PiggyBac Inverted Terminal Repeats (ITR), La transposase PiggyBac reconnaît spécifiquement les séquences ITRs et intègre au niveau des sites chromosomiques TTAA des portions d'ADNs comprises entre deux ITRS.
PiggyBac right inverted repeat	PiggyBac Inverted Terminal Repeats (ITR), La transposase PiggyBac reconnaît spécifiquement les séquences ITRs et intègre au niveau des sites chromosomiques TTAA des portions d'ADNs comprises entre deux ITRS.
SV40 poly(A) signal	signal de polyadénylation du virus simiein 40 (SV40), la séquence SV40 est une séquence terminatrice qui signale la fin d'une unité de transcription
Tet operator	répresseur tétracycline (TetR), opérateur O2 pour les gènes TetA et TetR (gènes de résistance aux tétracyclines) chez <i>E.coli</i>
Tet-On 3G	les protéines Tet-On3G sont des rTA (reverse tetracycline-TransActivator) qui lient spécifiquement les promoteurs contenant les séquences opérateurs tet en présence de doxycycline, ce qui induit la transcription du gène en aval du promoteur à opérateurs tet
TRE3GS promoter	promoteur à réponse Tet de 3ième génération (TRE3GS), activé par la liaison de Tet-on 3G,

Tableau 7 : Liste des séquences contenues dans le vecteur d'expression plasmidique SC1174

PB-CuO-HsMEIOB-1-147-IRES-GFP (SC1175)	
core insulator	les séquences insulateurs favorisent l'expression du transgène
core insulator	les séquences insulateurs favorisent l'expression du transgène
AmpR promoter	promoteur du gène <i>bla</i> , utilisé pour exprimer le gène de résistance à l'ampicilline dans <i>E.coli</i>
AmpR	gène <i>bla</i> , produit β -lactamase, confère la résistance à l'ampicilline
CymR	gène <i>cymR</i> de <i>Pseudomonas putida</i> , répresseur cumate (CymR), lie l'opérateur CuO en absence de cumate et inhibe la transcription du gène en aval (Mullick et al., 2006)
CMV promoter	promoteur du cytomégalo virus (CMV), permet l'expression de gènes dans les cellules mammaliennes
CuO	opérateur P1 de l'opéron p-cym de <i>Pseudomonas putida</i> , séquence de liaison du répresseur CymR (Mullick et al., 2006)
EF-1 α core promoter	core du promoteur du facteur d'élongation humain EF-1 α , permet l'expression de gènes dans les cellules mammaliennes
FLAg tag	epitope FLAG® tag
GFP	green fluorescent protein (GFP)
HsMEIOB -1-147	séquence codante (CDS) HsMEIOB
IRES	Internal Ribosome Entry Site (IRES) du virus encephalomyocarditis (EMCV), permet la co-translation de protéines
Myc tag	epitope Myc (human c-Myc proto-oncogene) tag
ori	origine de répliation pUC, permet la répliation du plasmide dans <i>E.coli</i>
PiggyBac left inverted repeat	PiggyBac Inverted Terminal Repeats (ITR), La transposase PiggyBac reconnaît spécifiquement les séquences ITRs et intègre au niveau des sites chromosomiques TTAA des portions d'ADNs comprises entre deux ITRs.
PiggyBac right inverted repeat	PiggyBac Inverted Terminal Repeats (ITR), La transposase PiggyBac reconnaît spécifiquement les séquences ITRs et intègre au niveau des sites chromosomiques TTAA des portions d'ADNs comprises entre deux ITRs.
PuroR	gene <i>pac</i> de <i>Streptomyces</i> , produit : puromycine N-acetyltransferase, confère la résistance à la puromycine
SV40 poly(A) signal	signal de polyadenylation du virus simien 40 (SV40), la séquence SV40 est une séquence terminatrice qui signale la fin d'une unité de transcription
T2A	peptide 2A du virus <i>Thosea asigna</i> , empêche la liaison peptidique entre les résidus Gly et Pro par les ribosomes induisant la séparation de polypeptides

Tableau 8 : Liste des séquences contenues dans le vecteur d'expression plasmidique SC1174

Bibliographie

Bibliographie

- Abreu, C. M., Prakash, R., Romanienko, P. J., Roig, I., Keeney, S., et Jasin, M. (2018) Shu complex SWS1-SWSAP1 promotes early steps in mouse meiotic recombination. *Nature Communications* 9(1).
- Adelman, C. A., Lolo, R. L., Birkbak, N. J., Murina, O., Matsuzaki, K., Horejsi, Z., Parmar, K., Borel, V., Skehel, J. M., Stamp, G., Andrea, D., Sartori, A. A., Swanton, C., et Boulton, S. J. (2014) Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts HELQ promotes RAD51 paralog-dependent repair to avert germ cell attrition and tumourigenesis. 502(7471).
- Akers, S. N., Odunsi, K., et Karpf, A. R. (2010) Regulation of cancer germline antigen gene expression: Implications for cancer immunotherapy. *Future Oncology* 6(5): 717-732.
- 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., Ashley, T., et Liskay, R. M. (1996) Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* 13(3): 336-342.
- Bakker, S. T., van de Vrugt, H. J., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Steltenpool, J., Delzenne-Goette, E., van der Wal, A., van der Valk, M., Joenje, H., te Riele, H., et de Winter, J. P. (2009) Fanccm-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Human Molecular Genetics* 18(18): 3484-3495.
- Baudat, F., Imai, Y., et de Massy, B. (2013) Meiotic recombination in mammals: localization and regulation. *Nature Reviews Genetics* 14(11): 794-806.
- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M., et Keeney, S. (2000) Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Molecular Cell* 6(5): 989-998.
- Bayés, M., Prieto, I., Noguchi, J., Barbero, J. L., et Pérez Jurado, L. A. (2001) Evaluation of the Stag3 gene and the synaptonemal complex in a rat model (as/as) for male infertility. *Molecular Reproduction and Development* 60(3): 414-417.
- Bebenek, K., et Kunkel, T. A. (2004) Functions of DNA polymerases. *Advances in Protein Chemistry* 69: 137-165.
- Bhat, K. P., et Cortez, D. (2018) RPA and RAD51: Fork reversal, fork protection, and genome stability. *Nature Structural and Molecular Biology* 25(6): 446-453.
- Bizard, A. H., et Hickson, I. D. (2014) The dissolution of double Holliday junctions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(7).
- Bochkarev, A., et Bochkareva, E. (2004) From RPA to BRCA2: Lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold. *Current Opinion in Structural Biology* 14(1): 36-42.
- Bochkareva, E., Korolev, S., Lees-Miller, S. P., et Bochkarev, A. (2002) Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO Journal* 21(7): 1855-1863.
- Bolcun-Filas, E., Costa, Y., Speed, R., Taggart, M., Benavente, R., De Rooij, D. G., et Cooke, H. J. (2007) SYCE2 is required for synaptonemal complex assembly, double strand break repair, and homologous recombination. *Journal of Cell Biology* 176(6): 741-747.

- Bolcun-filas, E., et Handel, M. A. (2018) Meiosis : The Chromosomal Foundation of Reproduction. *Biology of Reproduction* 109(2)(February 2018).
- Bolcun-Filas, E., et Schimenti, J. C. (2012) *Genetics of Meiosis and Recombination in Mice. International Review of Cell and Molecular Biology* (1^{re} éd., Vol. 298). Elsevier Inc.
- Bolcun-Filas, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., De Massy, B., Benavente, R., et Cooke, H. J. (2009) Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genetics* 5(2).
- Borde, V. (2007) The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosome Research* 15(5): 551-563.
- Borde, V., et de Massy, B. (2013) Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis: Setting up communication between DNA and the chromosome structure. *Current Opinion in Genetics and Development* 23(2): 147-155.
- Borgogno, M. V., Monti, M. R., Zhao, W., Sung, P., Argarana, C. E., et Pezza, R. J. (2016) Tolerance of DNA mismatches in *dmc1* recombinase-mediated DNA strand exchange. *Journal of Biological Chemistry* 291(10): 4928-4938.
- Bouuaert, C. C., et Keeney, S. (2016) Breaking DNA. *Science* 351(6276): 916-917.
- Bowles, J., et Spiller, C. (2015) Germ Cell Biology Sex determination in mammalian germ cells. *Asian Journal of Andrology* 17(3): 427-432.
- Brandsma, I., et Gent, D. C. (2012a) Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integrity* 3(1): 9.
- Brandsma, I., et Gent, D. C. (2012b) Pathway choice in DNA double strand break repair: Observations of a balancing act. *Genome Integrity* 3(1): 1.
- Brandsma, I., Sato, K., van Rossum-Fikkert, S. E., van Vliet, N., Sleddens, E., Reuter, M., et al. (2019) HSF2BP Interacts with a Conserved Domain of BRCA2 and Is Required for Mouse Spermatogenesis. *Cell Reports* 27(13): 3790-3798.e7.
- Brooker, A. S., et Berkowitz, K. M. (2014) The Roles of Cohesins in Mitosis, Meiosis, and Human Health and Disease. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1170).
- Brooks Crickard, J., Kaniecki, K., Kwon, Y., Sung, P., et Greene, E. C. (2018) Spontaneous self-segregation of Rad51 and Dmc1 DNA recombinases within mixed recombinase filaments. *Journal of Biological Chemistry* 293(11): 4191-4200.
- Brosh, R. M., Li, J. L., Kenny, M. K., Karow, J. K., Cooper, M. P., Kurekattil, R. P., Hickson, I. D., et Bohr, V. A. (2000) Replication protein a physically interacts with the Bloom's syndrome protein and stimulates its helicase activity. *Journal of Biological Chemistry* 275(31): 23500-23508.
- Brown, M. S., et Bishop, D. K. (2015) DNA Strand Exchange and RecA Homologs in Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(1): a016659.
- Buisson, R., Dion-Côté, A.-M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Xia, B., et Masson, J.-Y. (2010) Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 17(10): 1247-1254.

Buisson, R., Niraj, J., Pauty, J., Maity, R., Zhao, W., Coulombe, Y., Sung, P., et Masson, J.-Y. (2014) Breast Cancer Proteins PALB2 and BRCA2 Stimulate Polymerase η in Recombination-Associated DNA Synthesis at Blocked Replication Forks. *Cell Reports* 6(3): 553-564.

Bunting, S. F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., Xu, X., Deng, C.-X., Finkel, T., Nussenzweig, M., Stark, J. M., et Nussenzweig, A. (2010) 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks. *Cell* 141(2): 243-254.

Burgoyne, P. S., Mahadevaiah, S. K., et Turner, J. M. A. (2009) The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nature Reviews Genetics* 10(3): 207-216.

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., Fellous, M., Pendás, A. M., Veitia, R. A., et Vilain, E. (2014) Mutant cohesin in premature ovarian failure. *New England Journal of Medicine* 370(10): 943-949.

Caburet, S., Todeschini, A.-L., Petrillo, C., Martini, E., Farran, N. D., Legois, B., Livera, G., Younis, J. S., Shalev, S., et Veitia, R. A. (2019) A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine* 42: 524-531.

Cannavo, E., Sanchez, A., Anand, R., Ranjha, L., Hugener, J., Adam, C., Acharya, A., Weyland, N., Aran-Guiu, X., Charbonnier, J.-B., Hoffmann, E. R., Borde, V., Matos, J., et Cejka, P. (2020) Regulation of the MLH1-MLH3 endonuclease in meiosis. *bioRxiv* : 2020.02.12.946293.

Carballo, J. A., Panizza, S., Serrentino, M. E., Johnson, A. L., Geymonat, M., Borde, V., Klein, F., et 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 Genetics* 9(6).

Carreira, A., Hilario, J., Amitani, I., Baskin, R. J., Shivji, M. K. K., Venkitaraman, A. R., et Kowalczykowski, S. C. (2009) The BRC Repeats of BRCA2 Modulate the DNA-Binding Selectivity of RAD51. *Cell* 136(6): 1032-1043.

Carreira, A., et Kowalczykowski, S. C. (2011) Two classes of BRC repeats in BRCA2 promote RAD51 nucleoprotein filament function by distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(26): 10448-10453.

Castor, D., Nair, N., Déclais, A. C., Lachaud, C., Toth, R., Macartney, T. J., Lilley, D. M. J., Arthur, J. S. C., et Rouse, J. (2013) Cooperative control of holliday junction resolution and DNA Repair by the SLX1 and MUS81-EME1 nucleases. *Molecular Cell* 52(2): 221-233.

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., et D'andrea, A. D. (2016) Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break Mechanisms of DNA DSB Repair. *Trends in Biochemical Sciences* 26(1): 52-64.

Cecile Toussaint (1995) Les hélicases. *Médecine/Science* 11(10): 1389-1398.

Chan, Y.-L., Zhang, A., Weissman, B. P., et Bishop, D. K. (2018) RPA resolves conflicting activities of accessory proteins during reconstitution of Dmc1-mediated meiotic recombination. *Nucleic Acids Research*.

Chanoux, R. A., Yin, B., Urtishak, K. A., Asare, A., Bassing, C. H., et Brown, E. J. (2009) ATR and H2AX Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress * □. 284(9): 5994-6003.

- Chatterjee, N., et Walker, G. C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58(5): 235-263.
- Chen, H., Lisby, M., et Symington, L. S. (2013) RPA Coordinates DNA End Resection and Prevents Formation of DNA Hairpins. *Molecular Cell* 50(4): 589-600.
- Cho, N. W., Dilley, R. L., Lampson, M. A., et Greenberg, R. A. (2014) Interchromosomal homology searches drive directional ALT telomere movement and synapsis. *Cell* 159(1): 108-121.
- Cimprich, K. A., et Cortez, D. (2008) ATR: An essential regulator of genome integrity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9(8): 616-627.
- Cloud, V., Chan, Y.-L., Grubb, J., Budke, B., et Bishop, D. K. (2012) Dmc1 catalyzes interhomolog joint molecule formation in meiosis with Rad51 and Mei5-Sae3 as accessory factors. *Science* 337(6099): 1222-1225.
- Cohen, P. E., et Holloway, J. K. (2015) Mammalian Meiosis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Vol. 1). Elsevier.
- Coral, S., Sigalotti, L., Altomonte, M., Engelsberg, A., Colizzi, F., Cattarossi, I., Maraskovsky, E., Jager, E., Seliger, B., et Maio, M. (2002) 5-aza-2'-deoxycytidine-induced expression of functional cancer testis antigens in human renal cell carcinoma: Immunotherapeutic implications. *Clinical Cancer Research* 8(8): 2690-2695.
- Costa, Y., et Cooke, H. J. (2007) Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Research* 15(5): 579-589.
- Costes, A., et Lambert, S. A. E. (2013) Homologous recombination as a replication fork escort: Fork-protection and recovery. *Biomolecules* 3(1): 39-71.
- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J. L., Chelysheva, L., Copenhaver, G. P., Horlow, C., et Mercier, R. (2012) FANCM limits meiotic crossovers. *Science* 336(6088): 1588-1590.
- Cui, S., Klima, R., Ochem, A., Arosio, D., Falaschi, A., et Vindigni, A. (2003) Characterization of the DNA-unwinding activity of human RECQ1, a helicase specifically stimulated by human replication protein A. *Journal of Biological Chemistry* 278(3): 1424-1432.
- Da Ines, O., Degroote, F., Goubely, C., Amiard, S., Gallego, M. E., et White, C. I. (2013) Meiotic Recombination in Arabidopsis Is Catalysed by DMC1, with RAD51 Playing a Supporting Role. *PLoS Genetics* 9(9).
- Dai, J., Voloshin, O., Potapova, S., et Camerini-Otero, R. D. (2017) Meiotic Knockdown and Complementation Reveals Essential Role of RAD51 in Mouse Spermatogenesis. *Cell Reports* 18(6): 1383-1394.
- Davies, O. R., Maman, J. D., et Pellegrini, L. (2012) Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insights into synaptonemal complex assembly. *Open Biology* 2(JULY).
- de Massy, B. (2013) Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 47(1): 563-599.
- De Muyt, A., Jessop, L., Kolar, E., Sourirajan, A., Chen, J., Dayani, Y., et Lichten, M. (2012) BLM Helicase Ortholog Sgs1 Is a Central Regulator of Meiotic Recombination Intermediate Metabolism.

Molecular Cell 46(1): 43-53.

De Smet, C., Lurquin, C., Lethé, B., Martelange, V., et Boon, T. (1999) DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter. *Molecular and Cellular Biology* 19(11): 7327-7335.

De Vries, F. A. T., De Boer, E., Van Den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J. G., Van Zeeland, A. A., Heyting, C., et Pastink, A. (2005) Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes and Development* 19(11): 1376-1389.

Dexheimer, T. S. (2013) DNA Repair Pathways and Mechanisms. In *DNA Repair of Cancer Stem Cells*. Dordrecht: Springer Netherlands.

Diagouraga, B., Clément, J. A. J., Duret, L., Kadlec, J., de Massy, B., et Baudat, F. (2018) PRDM9 Methyltransferase Activity Is Essential for Meiotic DNA Double-Strand Break Formation at Its Binding Sites. *Molecular Cell* 69(5): 853-865.e6.

Dorosh, A., Tepla, O., Zatecka, E., Ded, L., Koci, K., et Peknicova, J. (2013) Expression analysis of MND1/GAJ, SPATA22, GAPDHS and ACR genes in testicular biopsies from non-obstructive azoospermia (NOA) patients. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 11: 42.

Dray, E., Etchin, J., Wiese, C., Saro, D., Williams, G. J., Hammel, M., Yu, X., Galkin, V. E., Liu, D., Tsai, M.-S., Sy, S. M.-H., Schild, D., Egelman, E., Chen, J., et Sung, P. (2010) Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. *Nature Structural & Molecular Biology* 17(10): 1255-1259.

Duroc, Y., Kumar, R., Ranjha, L., Adam, C., Guérois, R., Muntaz, K. M., Marsolier-Kergoat, M. C., Dingli, F., Laureau, R., Loew, D., Llorente, B., Charbonnier, J. B., Cejka, P., et Borde, V. (2017) Concerted action of the MutL β heterodimer and Mer3 helicase regulates the global extent of meiotic gene conversion. *eLife* 6: 1-24.

Eberl, H. C., Spruijt, C. G., Kelstrup, C. D., Vermeulen, M., et Mann, M. (2013) A Map of General and Specialized Chromatin Readers in Mouse Tissues Generated by Label-free Interaction Proteomics. *Molecular Cell* 49(2): 368-378.

Edelmann, W., Cohen, P. E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., Pollard, J. W., Kolodner, R. D., et Kucherlapati, R. (1996) Meiotic pachytene arrest in MLH1-deficient mice. *Cell* 85(7): 1125-1134.

Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E., et Heyting, C. (2003) Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 β and SMC3. *Journal of Cell Biology* 160(5): 657-670.

Ernst, C., Eling, N., Martinez-Jimenez, C. P., Marioni, J. C., et Odom, D. T. (2019) Staged developmental mapping and X chromosome transcriptional dynamics during mouse spermatogenesis. *Nature Communications* 10(1): 1251.

Fanning, E., Klimovich, V., et Nager, A. R. (2006) A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Research* 34(15): 4126-4137.

Fasching, C. L., Cejka, P., Kowalczykowski, S. C., et Heyer, W.-D. (2015a) Top3-Rmi1 Dissolve Rad51-Mediated D Loops by a Topoisomerase-Based Mechanism. *Molecular Cell* 57(4): 595-606.

- Fasching, C. L., Cejka, P., Kowalczykowski, S. C., et Heyer, W. D. (2015b) Top3-Rmi1 dissolve Rad51-mediated D loops by a topoisomerase-based mechanism. *Molecular Cell* 57(4): 595-606.
- Fernandes, J. B., Duhamel, M., Seguéla-Arnaud, M., Froger, N., Girard, C., Choinard, S., Solier, V., De Winne, N., De Jaeger, G., Gevaert, K., Andrey, P., Grelon, M., Guerois, R., Kumar, R., et Mercier, R. (2018) FIGL1 and its novel partner FLIP form a conserved complex that regulates homologous recombination. *PLoS genetics* 14(4): e1007317.
- Fishel, R. (2015) Mismatch Repair. *Journal of Biological Chemistry* 290(44): 26395-26403.
- Fouquet, B., Pawlikowska, P., Caburet, S., Guigon, C., Mäkinen, M., Tanner, L., Hietala, M., Urbanska, K., Bellutti, L., Legois, B., Bessieres, B., Gougeon, A., Benachi, A., Livera, G., Rosselli, F., Veitia, R. A., et Misrahi, M. (2017) A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency. *eLife* 6: 1-17.
- Fratta, E., Coral, S., Covre, A., Parisi, G., Colizzi, F., Danielli, R., Marie Nicolay, H. J., Sigalotti, L., et Maio, M. (2011) The biology of cancer testis antigens: Putative function, regulation and therapeutic potential. *Molecular Oncology* 5(2): 164-182.
- Fratta, E., Sigalotti, L., Colizzi, F., Covre, A., Nicolay, H. J. M. G., Danielli, R., Fonsatti, E., Altomonte, M., Calabrò, L., Coral, S., et Maio, M. (2010) Epigenetically regulated clonal heritability of CTA expression profiles in human melanoma. *Journal of Cellular Physiology* 223(2): 352-358.
- Fraune, J., Brochier-Armanet, C., Alsheimer, M., Volff, J. N., Schücker, K., et Benavente, R. (2016) Evolutionary history of the mammalian synaptonemal complex. *Chromosoma* 125(3): 355-360.
- Gantchev, J., Martínez Villarreal, A., Gunn, S., Zetka, M., Ødum, N., et Litvinov, I. V. (2020) The ectopic expression of meiCT genes promotes meiomitosis and may facilitate carcinogenesis. *Cell Cycle* 19(8): 837-854.
- Garcia, V., Gray, S., Allison, R. M., Cooper, T. J., et Neale, M. J. (2015) Tel1ATM-mediated interference suppresses clustered meiotic double-strand-break formation. *Nature* 520(7545): 114-118.
- Gari, K., Décaillet, C., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., et Constantinou, A. (2008) The Fanconi Anemia Protein FANCM Can Promote Branch Migration of Holliday Junctions and Replication Forks. *Molecular Cell* 29(1): 141-148.
- Garner, E., Kim, Y., Lach, F. P., Kottemann, M. C., et Smogorzewska, A. (2013) Human GEN1 and the SLX4-Associated Nucleases MUS81 and SLX1 Are Essential for the Resolution of Replication-Induced Holliday Junctions. *Cell Reports* 5(1): 207-215.
- Gershoni, M., Hauser, R., Barda, S., Lehavi, O., Arama, E., Pietrokovski, S., et Kleiman, S. E. (2019) A new MEIOB mutation is a recurrent cause for azoospermia and testicular meiotic arrest. *Human Reproduction* : 1-6.
- Gershoni, M., Hauser, R., Yogev, L., Lehavi, O., Azem, F., Yavetz, H., Pietrokovski, S., et Kleiman, S. E. (2017) A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genetics in Medicine* (February): 1-9.
- Gibb, B., Ye, L. F., Gergoudis, S. C., Kwon, Y. H., Niu, H., Sung, P., et Greene, E. C. (2014) Concentration-dependent exchange of replication protein A on single-stranded DNA revealed by single-molecule imaging. *PLoS ONE* 9(2).

- Girard, C., Chelysheva, L., Choinard, S., Froger, N., Macaisne, N., Lehmemdi, A., Mazel, J., Crismani, W., et Mercier, R. (2015) AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and Helicase FANCM Antagonize Meiotic Crossovers by Distinct Mechanisms. *PLoS Genetics* 11(7): 1-22.
- Glazer, C. A., Smith, I. M., Ochs, M. F., Begum, S., Westra, W., Chang, S. S., Sun, W., Bhan, S., Khan, Z., Ahrendt, S., et Califano, J. A. (2009) Integrative discovery of epigenetically derepressed cancer testis antigens in NSCLC. *PLoS ONE* 4(12).
- Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., et Radding, C. M. (1998) Interaction of human Rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Research* 26(23): 5388-5393.
- 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., Benavente, R., Llano, E., et Pendas, A. M. (2016) C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nature Communications* 7(May).
- Gray, S., et Cohen, P. E. (2016) Control of Meiotic Crossovers: From Double-Strand Break Formation to Designation. *Annual Review of Genetics* 50(1): 175-210.
- Grey, C., Baudat, F., et de Massy, B. (2018) PRDM9, a driver of the genetic map. *PLoS genetics* 14(8): e1007479.
- Griffin, W. C., et Trakselis, M. A. (2019) The MCM8/9 complex: A recent recruit to the roster of helicases involved in genome maintenance. *DNA Repair* 76(February): 1-10.
- Guiraldelli, M. F., Eyster, C., Wilkerson, J. L., Dresser, M. E., et Pezza, R. J. (2013) Mouse HFM1/Mer3 Is Required for Crossover Formation and Complete Synapsis of Homologous Chromosomes during Meiosis. *PLoS Genetics* 9(3).
- Guiraldelli, M. F., Felberg, A., Almeida, L. P., Parikh, A., de Castro, R. O., et Pezza, R. J. (2018) SHOC1 is a ERCC4-(HhH)2-like protein, integral to the formation of crossover recombination intermediates during mammalian meiosis. (Lichten, M., Éd.) *PLOS Genetics* 14(5): e1007381.
- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R., et Höög, C. (2006) Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *Journal of Cell Science* 119(19): 4025-4032.
- Handel, M. A., et Schimenti, J. C. (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nature Reviews Genetics* 11(2): 124-136.
- Hartford, S. A., Luo, Y., Southard, T. L., Min, I. M., Lis, J. T., et Schimenti, J. C. (2011) Minichromosome maintenance helicase paralog MCM9 is dispensible for DNA replication but functions in germ-line stem cells and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(43): 17702-17707.
- Hassold, T., Hall, H., et Hunt, P. (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* 16(R2): R203-R208.
- Hassold, T., et Hunt, P. (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics* 2(4): 280-291.
- Hatkevich, T., et Sekelsky, J. (2017) Bloom syndrome helicase in meiosis: Pro-crossover functions of

an anti-crossover protein. *BioEssays* 39(9): 1700073.

Hayashi, K., Yoshida, K., et Matsui, Y. (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438(7066): 374-378.

Hays, E., Majchrzak, N., Daniel, V., Ferguson, Z., Brown, S., Hathorne, K., et La Salle, S. (2017a) Spermatogenesis associated 22 is required for DNA repair and synapsis of homologous chromosomes in mouse germ cells. *Andrology* 5(2): 299-312.

Hays, E., Majchrzak, N., Daniel, V., Ferguson, Z., Brown, S., Hathorne, K., et La Salle, S. (2017b) Spermatogenesis associated 22 is required for DNA repair and synapsis of homologous chromosomes in mouse germ cells. *Andrology* 5(2): 299-312.

Her, J., et Bunting, S. F. (2018) How cells ensure correct repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 293(27): 10502-10511.

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 Pendás, A. M. (2011) The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO Journal* 30(15): 3091-3105.

Heyer, W. (2015) Regulation of Recombination and Genomic Maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(8): a016501.

Hofmann, O., Caballero, O. L., Stevenson, B. J., Chen, Y.-T., Cohen, T., Chua, R., Maher, C. A., Panji, S., Schaefer, U., Kruger, A., Lehvaslaiho, M., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Jongeneel, C. V., Simpson, A. J. G., Old, L. J., et Hide, W. (2008) Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(51): 20422-20427.

Holliday, R. (1964) A mechanism for gene conversion in fungi. *Genetics Research* 89(5-6): 285-307.

Holloway, J. K., Booth, J., Edelman, W., McGowan, C. H., et Cohen, P. E. (2008) MUS81 generates a subset of MLH1-MLH3-independent crossovers in mammalian meiosis. *PLoS Genetics* 4(9).

Holloway, J. K., Mohan, S., Balmus, G., Sun, X., Modzelewski, A., Borst, P. L., Freire, R., Weiss, R. S., et Cohen, P. E. (2011) Mammalian BTBD12 (SLX4) protects against genomic instability during mammalian spermatogenesis. *PLoS Genetics* 7(6).

Holloway, J. K., Morelli, M. A., Borst, P. L., et Cohen, P. E. (2010) Mammalian BLM helicase is critical for integrating multiple pathways of meiotic recombination. *The Journal of Cell Biology* 188(6): 779-789.

Hopkins, J., Hwang, G., Jacob, J., Sapp, N., Bedigian, R., Oka, K., Overbeek, P., Murray, S., et 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 Genetics* 10(7).

Huhtaniemi, I., Hovatta, O., La Marca, A., Livera, G., Monniaux, D., Persani, L., Heddar, A., Jarzabek, K., Laisk-Podar, T., Salumets, A., Tapanainen, J. S., Veitia, R. A., Visser, J. A., Wieacker, P., Wolczynski, S., et Misrahi, M. (2018) Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29(6): 400-419.

Hunter, N. (2015) Meiotic recombination: The essence of heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in*

Biology 7(12): 1-35.

Hustedt, N., Saito, Y., Zimmermann, M., Álvarez-quilón, A., Setiাপutra, D., Adam, S., Mcewan, A., Yuan, J. Y., Olivieri, M., Zhao, Y., Kanemaki, M. T., Jurisicova, A., et Durocher, D. (2019) Control of homologous recombination by the HROB – MCM8 – MCM9 pathway. : 1-19.

Iftode, C., Daniely, Y., et Borowiec, J. A. (1999) Replication protein A (RPA): The eukaryotic SSB. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 34(3): 141-180.

Imai, Y., Baudat, F., Taillepierre, M., Stanzione, M., Toth, A., et de Massy, B. (2017) The PRDM9 KRAB domain is required for meiosis and involved in protein interactions. *Chromosoma* 126(6): 681-695.

Inagaki, A., Roset, R., et Petrini, J. H. J. (2016) Functions of the MRE11 complex in the development and maintenance of oocytes. *Chromosoma* 125(1): 151-162.

Ishiguro, Kei-ichiro (2019) The cohesin complex in mammalian meiosis. *Genes to Cells* 24(1): 6-30.

Ishiguro, Kei-ichiro, Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S., et Watanabe, Y. (2011) A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO reports* 12(3): 267-275.

Ishishita, S., Inui, T., Matsuda, Y., Serikawa, T., et Kitada, K. (2013) Infertility Associated with Meiotic Failure in the tremor Rat (tm/tm) is Caused by the Deletion of Spermatogenesis Associated 22. *Experimental Animals* 62(3): 219-227.

Ishishita, S., Matsuda, Y., et Kitada, K. (2014) Genetic evidence suggests that Spata22 is required for the maintenance of Rad51 foci in mammalian meiosis. *Scientific reports* 4: 6148.

Jaafar, L., et Flores-Rozas, H. (2009) Elucidating the role of human mismatch repair factor hMLH3. *Cancer Biology and Therapy* 8(14): 1421-1423.

Jensen, R. B., Carreira, A., et Kowalczykowski, S. C. (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* 467(7316): 678-683.

Jessop, L., Rockmill, B., Roeder, G. S., et Lichten, M. (2006) Meiotic chromosome synapsis-promoting proteins antagonize the anti-crossover activity of sgs1. *PLoS Genetics* 2(9): 1402-1412.

Jiricny, J. (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(5): 335-346.

Kan, Y., Batada, N. N., et Hendrickson, E. A. (2017) Human somatic cells deficient for RAD52 are impaired for viral integration and compromised for most aspects of homology-directed repair. *DNA Repair* 55(1): 64-75.

Kaur, H., De Muyt, A., et Lichten, M. (2015) Top3-Rmi1 DNA Single-Strand Decatenase Is Integral to the Formation and Resolution of Meiotic Recombination Intermediates. *Molecular Cell* 57(4): 583-594.

Keeney, S. (2007) Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. In *Recombination and Meiosis* (Vol. 3). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Kobayashi, W., Hosoya, N., Machida, S., Miyagawa, K., et Kurumizaka, H. (2017) SYCP3 regulates strand invasion activities of RAD51 and DMC1. *Genes to Cells* 22(9): 799-809.

Kogo, H., Tsutsumi, M., Inagaki, H., Ohye, T., Kiyonari, H., et Kurahashi, H. (2012) HORMAD2 is essential for synapsis surveillance during meiotic prophase via the recruitment of ATR activity. *Genes to Cells* 17(11): 897-912.

Kowalczykowski, S. C. (2015) An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(11): 1-36.

Krasikova, Y. S., Rechkunova, N. I., et Lavrik, O. I. (2016) Replication protein A as a major eukaryotic single-stranded DNA-binding protein and its role in DNA repair. *Molecular Biology* 50(5): 649-662.

Kumar, R., Bourbon, H. M., et De Massy, B. (2010) Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes and Development* 24(12): 1266-1280.

Kumar, R., Duhamel, M., Coutant, E., Ben-Nahia, E., et Mercier, R. (2019) Antagonism between BRCA2 and FIGL1 regulates homologous recombination. *Nucleic Acids Research* 47(10): 5170-5180.

Kumar, R., Oliver, C., Brun, C., Juarez-Martinez, A. B., Tarabay, Y., Kadlec, J., et De Massy, B. (2018) Mouse REC114 is essential for meiotic DNA double-strand break formation and forms a complex with MEI4. *Life Science Alliance* 1(6): 1-13.

La Salle, S., Palmer, K., O'Brien, M., Schimenti, J. C., Eppig, J., et Handel, M. A. (2012) Spata22, a Novel Vertebrate-Specific Gene, Is Required for Meiotic Progress in Mouse Germ Cells. *Biology of Reproduction* 86(2): 45-45.

Lam, I., et Keeney, S. (2015) Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(1).

Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M. P., Jasin, M., et Keeney, S. (2011) ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* 479(7372): 237-240.

Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M. P., Jasin, M., Program, B., Program, B., Directorate, L. S., et Livermore, L. (2012) ATM controls meiotic double-strand break formation. 479(7372): 237-240.

Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., et Yamashita, M. (2003) Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* 116(13): 2781-2790.

Li, X., Stith, C. M., Burgers, P. M., et Heyer, W. D. (2009) PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase δ . *Molecular Cell* 36(4): 704-713.

Lipkin, S. M., Moens, P. B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J. W., Green, E. D., Schwartzberg, P., Collins, F. S., et Cohen, P. E. (2002) Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nature Genetics* 31(4): 385-390.

Liu, D., Keijzers, G., et Rasmussen, L. J. (2017) DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 773: 174-187.

Liu, J., Doty, T., Gibson, B., et Heyer, W.-D. (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered ssDNA. *Physiology & behavior* 176(1): 139-148.

Liu, T., et Huang, J. (2016) Replication protein A and more: Single-stranded DNA-binding proteins in eukaryotic cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 48(7): 665-670.

Llano, E., Herrán, Y., García-Tuñón, I., Gutiérrez-Caballero, C., de Álava, E., Barbero, J. L., Schimenti, J., de Rooij, D. G., Sánchez-Martín, M., et Pendás, A. M. (2012) Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *Journal of Cell Biology* 197(7): 877-885.

Lorenz, A., Osman, F., Sun, W., Nandi, S., Steinacher, R., et Whitby, M. C. (2012) The fission yeast FANCM ortholog directs non-crossover recombination during meiosis. *Science* 336(6088): 1585-1588.

Lukaszewicz, A., Lange, J., Keeney, S., et Jasin, M. (2018) Control of meiotic double-strand-break formation by ATM: local and global views. *Cell Cycle* 17(10): 1155-1172.

Luo, M., Yang, F., Leu, N. A., Landaiche, J., Handel, M. A., Benavente, R., La Salle, S., et Wang, P. J. (2013) MEIOB exhibits single-stranded DNA-binding and exonuclease activities and is essential for meiotic recombination. *Nature Communications* 4: 1-12.

Lutzmann, M., Grey, C., Traver, S., Ganier, O., Maya-Mendoza, A., Ranisavljevic, N., Bernex, F., Nishiyama, A., Montel, N., Gavois, E., Forichon, L., de Massy, B., et Méchali, M. (2012) MCM8- and MCM9-Deficient Mice Reveal Gametogenesis Defects and Genome Instability Due to Impaired Homologous Recombination. *Molecular Cell* 47(4): 523-534.

Lynn, A., Soucek, R., et Börner, G. V. (2007) ZMM proteins during meiosis: Crossover artists at work. *Chromosome Research* 15(5): 591-605.

MacLennan, M., Crichton, J. H., Playfoot, C. J., et Adams, I. R. (2015) Oocyte development, meiosis and aneuploidy. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 45: 68-76.

Maloisel, L., Bhargava, J., et Roeder, G. S. (2004) A role for DNA polymerase δ in gene conversion and crossing over during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 167(3): 1133-1142.

Mandon-pépin, B., Derbois, C., Matsuda, F., Cotinot, C., Wolgemuth, D. J., et Smith, K. (2002) Infertilité humaine : des gènes de méiose comme candidats potentiels Human infertility : meiotic genes as potential candidates. 30: 817-821.

Manhart, C. M., et Alani, E. (2016) Roles for mismatch repair family proteins in promoting meiotic crossing over. *DNA Repair* 38: 84-93.

Manhart, C. M., Ni, X., White, M. A., Ortega, J., Surtees, J. A., et Alani, E. (2017) *The mismatch repair and meiotic recombination endonuclease Mlh1-Mlh3 is activated by polymer formation and can cleave DNA substrates in trans.* *PLoS Biology* (Vol. 15).

Maréchal, A., et Zou, L. (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(9): 1-17.

Maréchal, A., et Zou, L. (2015) RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. *Cell Research* 25(1): 9-23.

Martinez, J. S., Von Nicolai, C., Kim, T., Ehlén, Å., Mazin, A. V., Kowalczykowski, S. C., et Carreira, A. (2016) BRCA2 regulates DMC1-mediated recombination through the BRC repeats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(13): 3515-3520.

Matos, J., et West, S. C. (2014) Holliday junction resolution: Regulation in space and time. *DNA Repair* 19: 176-181.

Mazin, A. V., Mazina, O. M., Bugreev, D. V., et Rossi, M. J. (2010) Rad54, the motor of homologous

recombination. *DNA Repair* 9(3): 286-302.

Mazina, O. M., et Mazin, A. V. (2004) Human Rad54 protein stimulates DNA strand exchange activity of hRad51 protein in the presence of Ca²⁺. *Journal of Biological Chemistry* 279(50): 52042-52051.

Mazina, O. M., Mazin, A. V., Nakagawa, T., Kolodner, R. D., et Kowalczykowski, S. C. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 Helicase Stimulates 3'-5' Heteroduplex Extension by Rad51. *Cell* 117(1): 47-56.

McFarlane, R. J., et Wakeman, J. A. (2017) Meiosis-like functions in oncogenesis: A new view of cancer. *Cancer Research* 77(21): 5712-5716.

Mcvey, M., Khodaverdian, V. Y., Meyer, D., Heyer, W., Genetics, M., Biology, C., et Cordova, R. (2017) Eukaryotic DNA polymerases in homologous recombination. *Annual review of genetics* (50): 393-421.

Mehta, A., et Haber, J. E. (2014) Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(9): 1-17.

Miyagawa, K., Tsuruga, T., Kinomura, A., Usui, K., Katsura, M., Tashiro, S., Mishima, H., et Tanaka, K. (2002) A role for RAD54B in homologous recombination in human cells. *EMBO Journal* 21(1-2): 175-180.

Moens, P. B., Kolas, N. K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P. E., et 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. *Journal of Cell Science* 115(8): 1611-1622.

Moynahan, M. E., et Jasin, M. (2010) Mitotic homologous recombination maintains genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(3): 196-207.

Nasmyth, K., et Haering, C. H. (2009) Cohesin: Its Roles and Mechanisms.

Natsume, T., Nishimura, K., Minocherhomji, S., Bhowmick, R., Hickson, I. D., et Kanemaki, M. T. (2017) Acute inactivation of the replicative helicase in human cells triggers MCM8-9-dependent DNA synthesis. *Genes and Development* 31(8): 816-829.

Neyton, S., Lespinasse, F., Moens, P. B., Paul, R., Gaudray, P., Paquis-Flucklinger, V., et Santucci-Darmanin, S. (2004) Association between MSH4 (MutS homologue 4) and the DNA strand-exchange RAD51 and DMC1 proteins during mammalian meiosis. *Molecular Human Reproduction* 10(12): 917-924.

Nguyen, B., Sokoloski, J., Galletto, R., Elson, E. L., Wold, M. S., et Lohman, T. M. (2014) Diffusion of Human Replication Protein A along Single-Stranded DNA. *Journal of Molecular Biology* 426(19): 3246-3261.

Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich, P., et 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 and Development* 25(4): 350-362.

Nishant, K. T., Plys, A. J., et Alani, E. (2008) A mutation in the putative MLH3 endonuclease domain confers a defect in both mismatch repair and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179(2): 747-755.

- Novak, I., Wang, H., Revenkova, E., Jessberger, R., Scherthan, H., et Höög, C. (2008) Cohesin Smc1 β determines meiotic chromatin axis loop organization. *Journal of Cell Biology* 180(1): 83-90.
- Oakley, G. G., et Patrick, S. M. (2010) Replication protein A: Directing traffic at the intersection of replication and repair. *Frontiers in Bioscience* 15(3): 883-900.
- Okada, H., Tajima, A., Shichiri, K., Tanaka, A., Tanaka, K., et Inoue, I. (2008) Genome-wide expression of azoospermia testes demonstrates a specific profile and implicates ART3 in genetic susceptibility. *PLoS Genetics* 4(2).
- Paiano, J., Wu, W., Yamada, S., Sciascia, N., Callen, E., Paola Cotrim, A., Deshpande, R. A., Maman, Y., Day, A., Paull, T. T., et Nussenzweig, A. (2020) ATM and PRDM9 regulate SPO11-bound recombination intermediates during meiosis. *Nature Communications* 11(1): 1-15.
- Panier, S., et Boulton, S. J. (2014) Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(1): 7-18.
- Parra, M. T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J. L., Rufas, J. S., et Suja, J. A. (2004) Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *Journal of Cell Science* 117(7): 1221-1234.
- Parvanov, E. D., Tian, H., Billings, T., Saxl, R. L., Spruce, C., Aithal, R., Krejci, L., Paigen, K., Petkov, P. M., et Yamashita, Y. (2017) PRDM9 interactions with other proteins provide a link between recombination hotspots and the chromosomal axis in meiosis. *Molecular Biology of the Cell* 28(3): 488-499.
- Patrick, S. M., Oakley, G. G., Dixon, K., et Turchi, J. J. (2005) DNA Damage Induced Hyperphosphorylation of Replication Protein A. 2. Characterization of DNA Binding Activity, Protein Interactions, and Activity in DNA Replication and Repair †. *Biochemistry* 44(23): 8438-8448.
- Petukhova, G. V., Pezza, R. J., Vanevski, F., Ploquin, M., Masson, J. Y., et Camerini-Otero, R. D. (2005) The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmc1 in meiotic recombination. *Nature Structural and Molecular Biology* 12(5): 449-453.
- Petukhova, G. V., Romanienko, P. J., et Camerini-Otero, R. D. (2003) The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Developmental Cell* 5(6): 927-936.
- Plug, A. W., Peters, A. H., Keegan, K. S., Hoekstra, M. F., de Boer, P., et Ashley, T. (1998) Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* 111: 413-423.
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., et Jasin, M. (2015) Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(4): 1-27.
- Prieto, I., Pezzi, N., Buesa, J. M., Kremer, L., Barthelemy, I., Carreiro, C., Roncal, F., Martínez, A., Gómez, L., Fernández, R., Martínez-a, C., et Barbero, J. L. (2002) Are Implicated in Meiosis. *EMBO Reports* 3(6): 543-550.
- Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martínez-A., C., Rufas, J. S., et Barbero, J. L. (2001) Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nature Cell Biology* 3(8): 761-766.

- Pyatnitskaya, A., Borde, V., et De Muyt, A. (2019) Crossing and zipping: molecular duties of the ZMM proteins in meiosis. *Chromosoma* 128(3): 181-198.
- 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., Cohen, P. E., Schimenti, J., Ward, J., et Hunter, N. (2014) Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination. *Nature Genetics* 46(2): 194-199.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H., et Jessberger, R. (2004) Cohesin SMC1 β is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biology* 6(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., Höög, C., Cohen, P. E., et Hunter, N. (2013) RNF212 is a dosage-sensitive regulator of crossing-over during mammalian meiosis. *Nature Genetics* 45(3): 269-278.
- Ribeiro, J., Abby, E., Livera, G., et Martini, E. (2016) RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* 125(2): 265-276.
- Ribeiro, J., Dupaigne, P., Duquenne, C., Veaute, X., Petrillo, C., Saintomé, C., Faklaris, O., Busso, D., Guerois, R., Keeney, S., Jain, D., Martini, E., et Livera, G. (2018) MEIOB and SPATA22 resemble RPA subunits and interact with the RPA complex to promote meiotic recombination. *bioRxiv* : 358242.
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A. G., Baarends, W. M., Van Sloun, P. P. H., Lohman, P. H. M., et Pastink, A. (1998) Targeted Inactivation of Mouse RAD52 Reduces Homologous Recombination but Not Resistance to Ionizing Radiation . *Molecular and Cellular Biology* 18(11): 6423-6429.
- Rivera, M., Wu, Q., Hamerlik, P., Hjelmeland, A. B., Bao, S., et Rich, J. N. (2015) Acquisition of meiotic DNA repair regulators maintain genome stability in glioblastoma. *Cell Death and Disease* 6(4): 1-13.
- Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., Guichard, V., Bourbon, H.-M., et de Massy, B. (2016) The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science* 351(6276): 943-949.
- Romanienko, P. J., et Camerini-Otero, R. D. (2000) The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Molecular Cell* 6(5): 975-987.
- Saitou, M., et Miyauchi, H. (2016) Gametogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 18(6): 721-735.
- San Filippo, J., Sung, P., et Klein, H. (2008) Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry* 77(1): 229-257.
- Sanchez, A., Adam, C., Rauh, F., Duroc, Y., Ranjha, L., Lombard, B., Mu, X., Loew, D., Keeney, S., Cejka, P., Guérois, R., Klein, F., Charbonnier, J.-B., et Borde, V. (2020) Mechanism of *in vivo* activation of the MutL γ -Exo1 complex for meiotic crossover formation. *bioRxiv* : 2019.12.16.876623.
- Santucci-Darmanin, S., Neyton, S., Lespinasse, F., Saunières, A., Gaudray, P., et Paquis-Flucklinger, V. (2002) The DNA mismatch-repair MLH3 protein interacts with MSH4 in meiotic cells, supporting a role for this MutL homolog in mammalian meiotic recombination. *Human Molecular Genetics* 11(15): 1697-1706.

- Santucci-Darmanin, S., Walpita, D., Lespinasse, F., Desnuelle, C., Ashley, T., et Paquis-Flucklinger, V. (2000) MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *The FASEB Journal* 14(11): 1539-1547.
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., et Jackson, S. P. (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450(7169): 509-514.
- Schramm, S., Fraune, J., Naumann, R., Hernandez-Hernandez, A., Höög, C., Cooke, H. J., Alsheimer, M., et Benavente, R. (2011) A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genetics* 7(5).
- Sha, J., Zhou, Z., Li, J., Yin, L., Yang, H., Hu, G., Luo, M., Chan, H. C., Zhou, K., et Spermatogenesis study group (2002) Identification of testis development and spermatogenesis-related genes in human and mouse testes using cDNA arrays. *Molecular human reproduction* 8(6): 511-7.
- Sharan, S. K., Pyle, A., Coppola, V., Babus, J., Swaminathan, S., Benedict, J., Swing, D., Martin, B. K., Tessarollo, L., Evans, J. P., Flaws, J. A., et Handel, M. A. (2004) BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 131(1): 131-142.
- Shen, J. C., Lao, Y., Kamath-Loeb, A., Wold, M. S., et Loeb, L. A. (2003) The N-terminal domain of the large subunit of human replication protein A binds to Werner syndrome protein and stimulates helicase activity. *Mechanisms of Ageing and Development* 124(8-9): 921-930.
- Shi, B., Xue, J., Yin, H., Guo, R., Luo, M., Ye, L., Shi, Q., Huang, X., Liu, M., Sha, J., et Wang, P. J. (2019) Dual functions for the ssDNA-binding protein RPA in meiotic recombination. (Cohen, P. E., Éd.) *PLoS Genetics* 15(2): e1007952.
- Shibata, A., Jeggo, P., et Löbrich, M. (2018) The pendulum of the Ku-Ku clock. *DNA Repair* 71(August): 164-171.
- Shin, Y. H., Choi, Y., Erdin, S. U., Yatsenko, S. A., Kloc, M., Yang, F., Wang, P. J., Meistrich, M. L., et Rajkovic, A. (2010) Hormad1 mutation disrupts synaptonemal complex formation, recombination, and chromosome segregation in mammalian meiosis. *PLoS Genetics* 6(11).
- Shiohama, Y., Ohtake, J., Ohkuri, T., Noguchi, D., Togashi, Y., Kitamura, H., et Nishimura, T. (2014) Identification of a meiosis-specific protein, MEIOB, as a novel cancer/testis antigen and its augmented expression in demethylated cancer cells. *Immunology Letters* 158(1-2): 175-182.
- Sigurdsson, S., Van Komen, S., Petukhova, G., et Sung, P. (2002) Homologous DNA pairing by human recombination factors Rad51 and Rad54. *Journal of Biological Chemistry* 277(45): 42790-42794.
- Simpson, A. J. G., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., et Old, L. J. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Reviews Cancer* 5(8): 615-625.
- Smith, I. M., Glazer, C. A., Mithani, S. K., Ochs, M. F., Sun, W., Bhan, S., Vostrov, A., Abdullaev, Z., Lobanenkova, V., Gray, A., Liu, C., Chang, S. S., Ostrow, K. L., Westra, W. H., Begum, S., Dhara, M., et Califano, J. (2009) Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testis antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. *PLoS ONE* 4(3).
- Sneeden, J. L., Grossi, S. M., Tappin, I., Hurwitz, J., et Heyer, W. D. (2013) Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic Acids Research* 41(9): 4913-4925.

- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M., et Fishel, R. (2004) hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Molecular Cell* 15(3): 437-451.
- Sommers, J. A., Banerjee, T., Hinds, T., Wan, B., Wold, M. S., Lei, M., et Brosh, R. M. (2014) Novel function of the Fanconi anemia group J or RECQ1 helicase to disrupt protein-DNA complexes in a replication protein A-stimulated manner. *Journal of Biological Chemistry* 289(29): 19928-19941.
- Souquet, B., Abby, E., Hervé, R., Finsterbusch, F., Tourpin, S., Le Bouffant, R., Duquenne, C., Messiaen, S., Martini, E., Bernardino-Sgherri, J., Toth, A., Habert, R., et Livera, G. (2013) MEIOB Targets Single-Strand DNA and Is Necessary for Meiotic Recombination. (Grelon, M., Éd.) *PLoS Genetics* 9(9): e1003784.
- Sowd, G., Wang, H., Pretto, D., Chazin, W. J., et Opresko, P. L. (2009) Replication protein A stimulates the Werner syndrome protein branch migration activity. *Journal of Biological Chemistry* 284(50): 34682-34691.
- Spiller, C., Koopman, P., et Bowles, J. (2017) Sex Determination in the Mammalian Germline. *Annual Review of Genetics* 51(1): 265-285.
- Stanzione, M., Baumann, M., Papanikos, F., Dereli, I., Lange, J., Ramlal, A., Tränkner, D., Shibuya, H., de Massy, B., Watanabe, Y., Jasin, M., Keeney, S., et Tóth, A. (2016) Meiotic DNA break formation requires the unsynapsed chromosome axis-binding protein IHO1 (CCDC36) in mice. *Nature Cell Biology* 18(11): 1208-1220.
- Stauffer, M. E., et Chazin, W. J. (2004) Physical interaction between replication protein A and Rad51 promotes exchange on single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry* 279(24): 25638-25645.
- Sugitani, N., et Chazin, W. J. (2016) Processing Machinery from Studies of RPA. *117(0)*: 206-211.
- Sun, F., Fujiwara, Y., Reinholdt, L. G., Hu, J., Saxl, R. L., Baker, C. L., Petkov, P. M., Paigen, K., et Handel, M. A. (2015) Nuclear localization of PRDM9 and its role in meiotic chromatin modifications and homologous synapsis. *Chromosoma* 124(3): 397-415.
- Sung, P. (1994) Catalysis of ATP-Dependent Homologous DNA Pairing and Strand Exchange by Yeast RAD51 Protein Author (s): Patrick Sung Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2884885> digitize , preserve. 265(5176): 1241-1243.
- Syed, A., et Tainer, J. A. (2018) The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair. *Annual Review of Biochemistry* 87(1): 263-294.
- Symington, L. S. (2014) End resection at double-strand breaks: Mechanism and regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(8).
- Takata, M., Sasaki, M. S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L. H., et Takeda, S. (2001) Chromosome Instability and Defective Recombinational Repair in Knockout Mutants of the Five Rad51 Paralogs. *Molecular and Cellular Biology* 21(8): 2858-2866.
- Tanaka, K., Hiramoto, T., Fukuda, T., et Miyagawa, K. (2000) A novel human Rad54 homologue, Rad54B, associates with Rad51. *Journal of Biological Chemistry* 275(34): 26316-26321.
- Tang, S., Wu, M. K. Y., Zhang, R., et Hunter, N. (2015) Pervasive and essential roles of the top3-rmi1

decatenase orchestrate recombination and facilitate chromosome segregation in meiosis. *Molecular Cell* 57(4): 607-621.

Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R. E., et Moens, P. B. (1999) RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *Journal of Cell Biology* 147(2): 207-219.

Tarsounas, M., et West, S. C. (2005) Recombination at mammalian telomeres: An alternative mechanism for telomere protection and elongation. *Cell Cycle* 4(5): 672-674.

Toledo, M., Sun, X., Brieffo-Enriquez, M. A., Raghavan, V., Gray, S., Pea, J., Milano, C. R., Venkatesh, A., Patel, L., Borst, P. L., Alani, E., et Cohen, P. E. (2019) A mutation in the endonuclease domain of mouse MLH3 reveals novel roles for mutL during crossover formation in meiotic prophase I. *PLoS Genetics* 15(6): 1-28.

Tomimatsu, N., et Mukherjee, B. (2009) scientific report. *EMBO reports* 10(6): 629-635.

Touati, S. A., et Wassmann, K. (2016) How oocytes try to get it right: spindle checkpoint control in meiosis. *Chromosoma* 125(2): 321-335.

Van Brabant, A. J., Ye, T., Sanz, M., German, J. L., Ellis, N. A., et Holloman, W. K. (2000) Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry* 39(47): 14617-14625.

Van Der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van Den Eynde, B., Knuth, A., et Boon, T. (1991) A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254(5038): 1643-1647.

Van Pel, A., van der Bruggen, P., Coulie, P. G., Brichard, V. G., Lethé, B., van den Eynde, B., Uyttenhove, C., Renauld, J. C., et Boon, T. (1995) Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunological reviews* 145(1): 229-50.

Vassin, V. M., Wold, M. S., et Borowiec, J. A. (2004) Replication Protein A (RPA) Phosphorylation Prevents RPA Association with Replication Centers. *Molecular and Cellular Biology* 24(5): 1930-1943.

Vera, M., Peinado, V., Al-Asmar, N., Gruhn, J., Rodrigo, L., Hassold, T., et Rubio, C. (2012) Human Male Meiosis and Sperm Aneuploidies. *Aneuploidy in Health and Disease*.

Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., De Muyt, A., Mezard, C., Mayer, C., et Grelon, M. (2016) A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* 351(6276): 939-943.

Wang, C., Gu, Y., Zhang, K., Xie, K., Zhu, M., Dai, N., et al. (2016) Systematic identification of genes with a cancer-testis expression pattern in 19 cancer types. *Nature Communications* 7(1): 10499.

Wang, X., et Haber, J. E. (2004) Role of Saccharomyces Single-Stranded DNA-Binding Protein RPA in the Strand Invasion Step of Double-Strand Break Repair. (Steven West, Éd.) *PLoS Biology* 2(1): e21.

Wang, Z., et Burge, C. B. (2008) Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14(5): 802-813.

Ward, J. O., Reinholdt, L. G., Motley, W. W., Niswander, L. M., Deacon, D. C., Griffin, L. B., Langlais, K. K., Backus, V. L., Schimenti, K. J., O'Brien, M. J., Eppig, J. J., et Schimenti, J. C. (2007) Mutation in mouse Hei10, an E3 ubiquitin ligase, disrupts meiotic crossing over. *PLoS Genetics* 3(8): 1550-1563.

- Wei, K., Clark, A. B., Wong, E., Kane, M. F., Mazur, D. J., Parris, T., Kolas, N. K., Russell, R., Hou, H., Kneitz, B., Yang, G., Kunkel, T. A., Kolodner, R. D., Cohen, P. E., et Edlmann, W. (2003) Inactivation of exonuclease I in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes and Development* 17(5): 603-614.
- Wesoly, J., Agarwal, S., Sigurdsson, S., Bussen, W., Van Komen, S., Qin, J., et al. (2006) Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination, DNA Damage Repair, and Meiosis. *Molecular and Cellular Biology* 26(3): 976-989.
- West, A. M., Rosenberg, S. C., Ur, S. N., Lehmer, M. K., Ye, Q., Hagemann, G., Caballero, I., Usón, I., MacQueen, A. J., Herzog, F., et Corbett, K. D. (2019) A conserved filamentous assembly underlies the structure of the meiotic chromosome axis. *eLife* 8: 1-27.
- West, S. C., Blanco, M. G., Chan, Y. W., Matos, J., Sarbajna, S., et Wyatt, H. D. M. (2015) Resolution of Recombination Intermediates: Mechanisms and Regulation. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 80: 103-109.
- White, S. R., et Lauring, B. (2007) AAA+ ATPases: Achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* 8(12): 1657-1667.
- Whitehurst, A. W. (2014) Cause and Consequence of Cancer/Testis Antigen Activation in Cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 54(1): 251-272.
- Winters, T., McNicoll, F., et Jessberger, R. (2014) Meiotic cohesin STAG3 is required for chromosome axis formation and sister chromatid cohesion. *EMBO Journal* 33(11): 1256-1270.
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., Eckmann, C. R., Cooke, H. J., Jasin, M., Keeney, S., McKay, M. J., et Toth, A. (2009) Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genetics* 5(10).
- Wright, W. D., Shah, S. S., et Heyer, W. D. (2018) Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* 293(27): 10524-10535.
- Wyatt, H. D. M., Sarbajna, S., Matos, J., et West, S. C. (2013) Coordinated actions of SLX1-SLX4 and MUS81-EME1 for holliday junction resolution in human cells. *Molecular Cell* 52(2): 234-247.
- Xu, Huiling, Beasley, M. D., Warren, W. D., van der Horst, G. T. J., et McKay, M. J. (2005) Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Developmental Cell* 8(6): 949-961.
- Xu, Huizhong, Tong, Z., Ye, Q., Sun, T., Hong, Z., Zhang, L., Bortnick, A., Cho, S., Beuzer, P., Axelrod, J., Hu, Q., Wang, M., Evans, S. M., Murre, C., Lu, L.-F., Sun, S., Corbett, K. D., et Cang, H. (2019) Molecular organization of mammalian meiotic chromosome axis revealed by expansion STORM microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116(37): 18423-18428.
- Xu, Y., Greenberg, R. A., Schonbrunn, E., et Wang, P. J. (2017) Meiosis-specific proteins MEIOB and SPATA22 cooperatively associate with the single-stranded DNA-binding replication protein A complex and DNA double-strand breaks†. *Biology of Reproduction* 96(5): 1096-1104.
- Xue, X., Raynard, S., Busygina, V., Singh, A. K., et Sung, P. (2013) Role of replication protein a in double holliday junction dissolution mediated by the BLM-Topo III α -RMI1-RMI2 protein complex. *Journal of Biological Chemistry* 288(20): 14221-14227.

- Yang, F., et Wang, P. J. (2009) The mammalian synaptonemal complex: A scaffold and beyond. *Genome Dynamics* 5: 69-80.
- Yang, Fang, De La Fuente, R., Leu, N. A., Baumann, C., McLaughlin, K. J., et Wang, P. J. (2006) Mouse SYCP2 is required for synaptonemal complex assembly and chromosomal synapsis during male meiosis. *Journal of Cell Biology* 173(4): 497-507.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., et Morita, T. (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Molecular Cell* 1(5): 707-718.
- Yuan, J., et Chen, J. (2013) FIGNL1-containing protein complex is required for efficient homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(26): 10640-10645.
- Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P. Y. H., Boiteux, S., et Hunter, N. (2010) Temporally and Biochemically Distinct Activities of Exo1 during Meiosis: Double-Strand Break Resection and Resolution of Double Holliday Junctions. *Molecular Cell* 40(6): 1001-1015.
- Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., et Hunter, N. (2012) Delineation of Joint Molecule Resolution Pathways in Meiosis Identifies a Crossover-Specific Resolvase. *Cell* 149(2): 334-347.
- Zeman, M. K., et Cimprich, K. A. (2014) Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology* 16(1): 2-9.
- Zhang, J., Fujiwara, Y., Yamamoto, S., et Shibuya, H. (2019) A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nature Communications* 10(1): 722.
- Zhang, J., Gurusaran, M., Fujiwara, Y., Zhang, K., Echbarthi, M., Vorontsov, E., Guo, R., Pendlebury, D. F., Alam, I., Livera, G., Emmanuelle, M., Wang, P. J., Nandakumar, J., Davies, O. R., et Shibuya, H. (2020) The BRCA2-MEILB2-BRME1 complex governs meiotic recombination and impairs the mitotic BRCA2-RAD51 function in cancer cells. *Nature Communications* 11(1).
- Zhang, Q., Ji, S.-Y., Busayavalasa, K., et Yu, C. (2019) SPO16 binds SHOC1 to promote homologous recombination and crossing-over in meiotic prophase I. *Science Advances* 5(1): eaau9780.
- Zhang, Q., Shao, J., Fan, H.-Y., et Yu, C. (2018) Evolutionarily-conserved MZIP2 is essential for crossover formation in mammalian meiosis. *Communications Biology* 1(1): 147.
- Zhang, Z., Fan, H. Y., Goldman, J. A., et Kingston, R. E. (2007) Homology-driven chromatin remodeling by human RAD54. *Nature Structural and Molecular Biology* 14(5): 397-405.
- 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., Chazin, W. J., Wiese, C., et Sung, P. (2015a) Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Molecular Cell* 59(2): 176-187.
- 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., Chazin, W. J., Wiese, C., et Sung, P. (2015b) Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Molecular Cell* 59(2): 176-187.

Zickler, D., et Kleckner, N. (1999) Meiotic Chromosomes: Integrating Structure and Function. *Annual Review of Genetics* 33(1): 603-754.

Zou, Y., Liu, Y., Wu, X., et Shell, S. M. (2006) Functions of human replication protein A (RPA): From DNA replication to DNA damage and stress responses. *Journal of Cellular Physiology* 208(2): 267-273.