

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 30 Juin 2022 par

Marie Dorme

Régulation spatiale des cassures d'ADN double-brin méiotiques chez *Saccharomyces cerevisiae* : rôle de la protéine kinase Tel1

Discipline

Biologie santé

Spécialité

Génétique

École doctorale

ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire/Partenaires de recherche

Équipe Dynamique du Génome et Recombinaison

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

(CRCM)

Inserm – U1068, CNRS – UMR7258, Aix-Marseille

Université U105, Institut Paoli-Calmettes

Composition du jury

Dr Valérie BORDE

Rapportrice

Institut Curie – Paris

Dr Frédéric BAUDAT

Rapporteur

Institut de Génétique Humaine – Montpellier

Dr Charles WHITE

Président du jury

GReD – Clermont Ferrand

Dr Bertrand LLORENTE

Directeur de thèse

CRCM – Marseille

Dr Valérie GARCIA

Co-directrice de thèse

CRCM – Marseille

*À la mémoire de mon père,
Jean-Claude Dorme*

*À Gauthier Clément-Demenge,
Atteint d'Ataxie Téléangiectasie.*

Affidavit

Je soussignée, Marie Dorme, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Dr Llorente Bertrand et Dr Garcia Valérie dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 30 mars 2022

DORME Marie



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Résumé

La reproduction sexuée repose sur la méiose, une division cellulaire particulière qui génère des gamètes haploïdes à partir d'une cellule diploïde. Au niveau de la population, la méiose assure la stabilité du génome tout en promouvant la diversité génétique des individus notamment *via* la génération de crossovers entre chromosomes homologues. Ces crossovers résultent de la réparation par recombinaison homologue de cassures double-brin de l'ADN (DSB, Double Strand Breaks en anglais) catalysées par la protéine Spo11 au sein d'un complexe multiprotéique. Ces DSB sont formées lors de la prophase I méiotique dans des régions appauvries en nucléosomes, qui correspondent à des promoteurs de gènes chez *Saccharomyces cerevisiae*, nommées « hotspots » de cassures. Lors de la prophase I méiotique, l'ADN est condensé sous forme de boucles reliées par leurs bases à un axe nucléoprotéique. La machinerie de cassures se trouve sur cet axe tandis que les hotspots de cassures sont majoritairement localisés dans les boucles d'ADN. Le modèle actuel propose que la génération des cassures double-brin repose sur la liaison de l'intérieur des boucles d'ADN à l'axe. La génération de centaines de cassures sur le génome nécessite une fine régulation spatio-temporelle de leur formation. Le mécanisme d'interférence entre cassures double-brin, médié par Tel1, participe à la régulation spatiale de la formation des DSBs en limitant la formation de plusieurs DSB à proximité. Afin d'appréhender le mécanisme d'action de Tel1 dans l'interférence, j'ai cherché à déterminer s'il agissait en *cis* ou en *trans*. Par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP), j'ai mis en évidence le recrutement de Tel1 aux sites de cassures, en réponse à leur formation, par le domaine carboxy-terminal de Xrs2. Ce recrutement est essentiel à la mise en place de l'interférence entre DSB méiotiques, ce qui montre que Tel1 contrôle l'interférence entre DSB en *cis*. De façon intéressante, j'ai montré que Tel1 est aussi présent à proximité de l'axe en réponse à la formation de DSB, probablement à cause de la liaison entre l'intérieur des boucles et l'axe. Récemment, le laboratoire a montré que l'activité kinase de Tel1 restreint spatialement la formation de cassures multiples (DC, double cuts en anglais) qui se produisent normalement au sein des hotspots de cassures. Dans un mutant de Tel1 dépourvu d'activité kinase, *tel1kd*, les DC se propagent à l'intérieur des extrémités 5' des gènes adjacents. J'ai mis en évidence que ce phénomène est causé par le recrutement de Tel1kd par le domaine carboxy-terminal de Xrs2 aux hotspots de cassures. Nous avons également mis en évidence que le remodeleur de chromatine Fun30 est essentiel pour cette propagation des DC dans un contexte *tel1kd*. Cela suggère une potentielle régulation directe de Fun30 par Tel1 qu'il reste à élucider.

Abstract

Sexual reproduction relies on meiosis, a specialized cell division which generates four haploid gametes starting from one diploid cell. At the population level, the meiotic program ensures genome stability but also promotes genetic diversity notably by promoting crossovers between homologous chromosomes. Such crossovers result from the repair by homologous recombination of programmed DNA double strand breaks (DSBs) catalyzed by the topo II-like protein Spo11, together with a DSB machinery. DSB formation occurs during meiotic prophase I in nucleosome depleted regions, which correspond mainly to gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae* and that are called DSB hotspots. Moreover, DSBs are formed in a specific meiotic DNA-condensed loop-axis structure. The DSB machinery is located on the proteinaceous axis while DSB hotspots are mostly found on DNA loops. The current model for DSB formation proposes that loops are tethered to the axis. Since hundreds of breaks per genome occur during meiotic prophase I, DSB formation requires a strong spatiotemporal regulation. One of these spatial regulation mechanisms is Tel1-mediated DSB interference that limits DSB formation *in cis* and promotes evenly spaced events. In order to better understand this mechanism, I determined if Tel1-mediated DSB interference occurred by a cis or a trans control. By chromatin immunoprecipitation (ChIP), I showed that Tel1 is recruited at DSB hotspots, upon Spo11-DSB formation, by the Xrs2 carboxy-terminal domain. Importantly, this recruitment is required to mediate DSB interference, which is therefore controlled *in cis* by Tel1. Interestingly, I also observed Tel1 enrichment on axis sites, probably as a result of the loop-axis tethering process. In addition to Tel1-mediated DSB interference, recent work from the lab showed that Tel1 kinase activity restrains spatially hyperlocalized DNA double cuts (DCs), events that normally occur within DSB hotspots. In a *tel1-kinase-dead (tel1kd)* background, DCs spread into the 5' region of adjacent ORFs and I decided to investigate this regulation. I showed that the DC spreading phenotype is due to Tel1kd recruitment at DSB hotspots *via* the Xrs2 carboxy-terminal domain. Interestingly, our data also indicate that this DC spreading phenotype specific of the *tel1kd* background requires the chromatin remodeler Fun30. This suggests a potential direct regulation of Fun30 by Tel1 at meiotic DSB hotspots that remains to be elucidated.

Remerciements

« N'oublie jamais, celui qui croit savoir n'apprend plus. »

Pierre Bottero, *Le Pacte des Marchombres* – Ellana

« Mais, vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonne ou de mauvaise thèse. Moi, si je devais résumer mon doctorat aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seul chez moi. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres forgent une destinée... (...) Et finalement, quand beaucoup de gens aujourd'hui me disent : « Mais comment fais-tu pour avoir cette humanité ? » Eh bien je leur réponds très simplement, je leur dis que c'est ce goût de l'amour, ce goût donc qui m'a poussé aujourd'hui à entreprendre un doctorat en génétique, mais demain, qui sait, peut-être simplement à me mettre au service de la communauté, à faire le don, le don de soi... »

Adaptée de Otis et al., 2002

Tables des matières

Affidavit	- 5 -
Résumé	- 6 -
Abstract	- 7 -
Remerciements	- 8 -
INTRODUCTION	- 15 -
Chapitre I : La méiose	- 15 -
Généralités	- 15 -
Partie I : Déroulé de la méiose	- 17 -
1. Entrée en méiose et réplication (pré-)méiotique	- 17 -
2. La division réductionnelle ou Méiose I	- 19 -
2.1 Prophase méiotique I	- 23 -
2.2 Métaphase et Anaphase méiotique I	- 27 -
3. La division équationnelle ou Méiose II	- 29 -
Partie II : Architecture Chromosomique en méiose	- 31 -
1. Le modèle axe-boucle	- 31 -
2. Le complexe synaptonemal	- 37 -
Partie III : Les cassures double-brin méiotiques	- 39 -
1. Formation des cassures double-brin méiotiques	- 41 -
1.1 Point chaud de cassures ou « Hotspot »	- 41 -
1.2 Spo11 et la machinerie de formation de cassures	- 43 -
1.3 Formation de cassures dans le contexte « axe-boucle »	- 53 -
1.4 Formation de multiples cassures au sein des hotspots	- 57 -
2. Réparation des cassures double-brin et formation des « Crossovers »	- 59 -
2.1 Maturation des cassures double-brin	- 59 -
2.2 Recherche d'homologie et biais vers l'homologue	- 60 -
2.3 Formation des COs et NCOs	- 63 -
Chapitre II : Régulation des DSBs et Interférence	- 67 -
Partie I : Régulation de la formation des DSBs	- 67 -
1. Couplage réplication – formation des DSBs	- 67 -
2. Arrêt de la formation de DSBs	- 71 -
3. Homéostasie des DSBs	- 74 -
Partie II : Distribution des DSBs sur le génome	- 75 -
1. Dialogue entre sites de cassures	- 75 -
2. Interférence entre DSBs méiotiques	- 79 -
2.1 Définition	- 79 -
2.2 Interférence dans le contexte axe-boucle	- 84 -
3. Compétition vs Interférence ?	- 87 -
4. Conservation du mécanisme d'interférence	- 91 -
Chapitre III : Tel1/ATM	- 95 -
Partie I : La protéine Tel1/ATM	- 95 -
1. La famille des PIKKs	- 95 -
2. Mise en évidence des protéines Tel1 et ATM	- 97 -
3. Activité kinase et cible de Tel1/ATM	- 98 -
Partie II : Rôles de Tel1/ATM	- 101 -
1. Réponse aux dommages à l'ADN	- 103 -
1.1 Distinction entre Tel1/ATM et Mec1/ATR	- 103 -
1.2 Reconnaissance des DSBs <i>via</i> le complexe MRX/N et activation de Tel1	- 105 -

1.3	Maturation des DSBs et implication de Mec1/ATR	- 108 -
1.4	Arrêt du cycle cellulaire	- 109 -
2.	Rôle de Tel1/ATM en méiose	- 111 -
2.1	Checkpoint méiotique	- 111 -
2.2	ATM est essentielle à la gamétogénèse chez les mammifères	- 112 -
3.	Autres rôles de Tel1/ATM	- 115 -
3.1	Tel1/ATM aux télomères	- 115 -
3.2	ATM et la recombinaison V(D)J	- 117 -
3.3	ATM et le système nerveux	- 118 -
Partie III : Maladies Associées à ATM		- 119 -
1.	L'Ataxie Téléangiectasie ou Syndrome de Louis-Bar	- 119 -
2.	ATM et Cancer	- 121 -
3.	« Ataxia Telangiectasia Like Disorder » et Syndrome de Nimègue	- 121 -
Chapitre IV : Projet de thèse		- 123 -
RÉSULTATS		- 125 -
Chapitre V : Le mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques repose sur l'interaction Tel1 – Xrs2		- 125 -
I.	Recrutement de la protéine Tel1 sur le génome	- 127 -
1.	Construction de la souche FLAG-Tel1 en méiose	- 129 -
2.	Recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures <i>ARE1</i> , <i>ATF2</i> et <i>GAT1</i> en réponse à la formation de cassures	- 133 -
3.	Recrutement de Tel1 à l'échelle du génome	- 136 -
4.	Recrutement de Tel1 à l'axe	- 151 -
5.	Localisation de Spo11 à l'axe	- 153 -
6.	Recrutement de Mre11 aux hotspots de cassures et à l'axe	- 155 -
II.	L'interaction Tel1 – Xrs2 en méiose	- 157 -
1.	Checkpoint méiotique dépendant de Xrs2	- 158 -
2.	Le recrutement de Tel1 aux sites de cassures méiotiques est dépendant de Xrs2	- 159 -
3.	Xrs2 est requise pour la mise en place de l'interférence	- 163 -
4.	Le « cas » <i>xrs2-Cmut</i>	- 167 -
III.	Pistes explorées pour expliquer le mécanisme d'interférence	- 169 -
1.	Implication des protéines télomériques : Rif1 et Rif2	- 170 -
2.	Implication de la périphérie nucléaire : Ndj1, Nup2 Esc1	- 174 -
IV.	Discussion – Chapitre IV	- 177 -
1.	Variabilité intrinsèque des expériences	- 177 -
2.	Limites des expériences de ChIP-seq	- 178 -
3.	Recrutement de Tel1 aux hotspots et à l'axe en réponse à la formation de DSBs	- 180 -
3.	Réduction du recrutement de Tel1 en <i>xrs2C-mut</i> et maintien de l'interférence	- 182 -
4.	Mécanisme d'interférence entre DSBs	- 183 -
5.	Mre11 est recrutée aux sites de cassures, mais pas aux sites de l'axe	- 184 -
Chapitre VI : Régulation spatiale de la formation des DCs intra-hotspots par l'activité kinase de Tel1		- 187 -
I.	Le phénotype Tel1kd	- 187 -
II.	Le recrutement de la protéine Tel1kd	- 191 -
III.	Piste explorée : rétention de la protéine Mre11	- 194 -
1.	L'utilisation de version étiquetée de Mre11 altère l'entrée en méiose	- 195 -
1.1	La souche Mre11-myc	- 195 -
1.2	La souche Mre11-HA	- 196 -
2.	Enrichissement de Mre11 à <i>ARE1</i> en absence d'activité Tel1	- 201 -
3.	Génération et utilisation de formes non phosphorylables de la protéine Mre11	- 205 -
4.	Déstabilisation de la liaison de Mre11 à l'ADN <i>via</i> le mutant <i>mre11-P110L</i>	- 209 -

IV. La protéine Fun30 est impliquée dans la dérégulation spatiale des DCs intrahotspots en contexte <i>tel1kd</i>	- 213 -
V. Discussion	- 220 -
1. Stabilisation et éviction de la protéine Mre11 de l'ADN	- 220 -
2. La phosphorylation de Mre11 participe à la résistance aux dommages à l'ADN	- 221 -
3. Rôle de Fun30 en méiose	- 222 -
CONCLUSION	- 225 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 233 -
MATÉRIEL ET MÉTHODES	- 265 -
ANNEXES	- 281 -

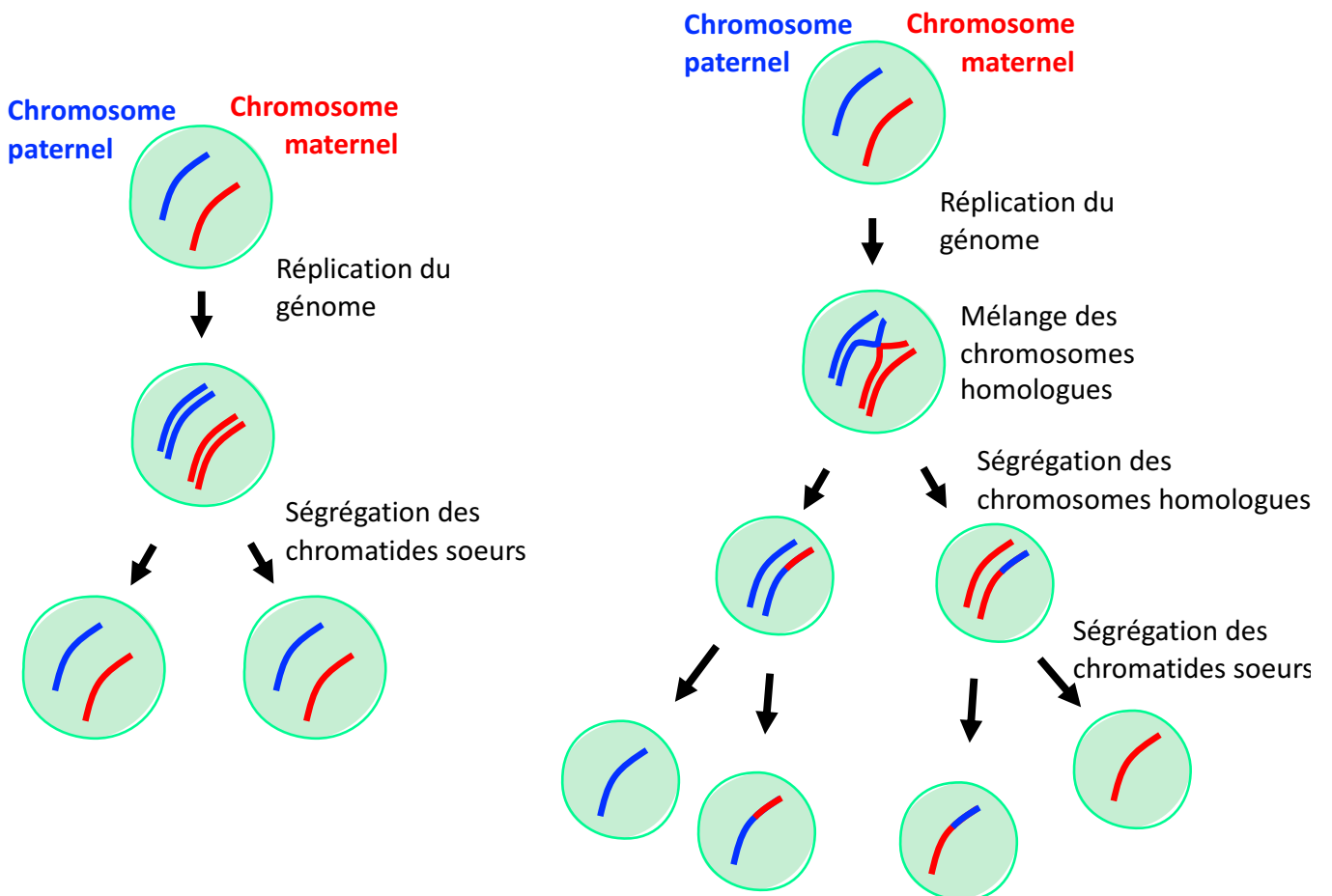


Figure 1 : Vue schématique des divisions cellulaires mitotique et méiotique

Représentation de la division cellulaire mitotique (gauche) et méiotique (droite). En mitose, l'ADN est répliqué avant que les chromatides sœurs soient ségrégués. Ce mode de division amène à la formation de deux cellules filles au patrimoine génétique identique à la cellule initiale. En méiose, le patrimoine génétique est également répliqué. Il y a ensuite un échange de patrimoine génétique entre les chromosomes homologues par recombinaison homologue. Une première division permet de ségréger les chromosomes homologues, avant une seconde division, sans réplication préalable de l'ADN, qui permet la ségrégation des chromatides sœurs. Ce mode de division aboutit à la formation de quatre cellules haploïdes aux patrimoines génétiques différents de la cellule initiale.

INTRODUCTION

Chapitre I : La méiose

Généralités

Chez les organismes eucaryotes, il existe deux types de divisions cellulaires : la mitose et la méiose. La mitose permet la production de deux cellules filles identiques à la cellule mère par duplication et séparation du patrimoine génétique, correspondant à une reproduction asexuée (Figure 1). La méiose aboutit à la production de gamètes, des cellules sexuelles, aux patrimoines génétiques différents de celui de la cellule mère et essentielles à la reproduction sexuée des organismes. De plus, contrairement à la division mitotique, la ploïdie initiale est divisée par deux au cours du processus méiotique : une cellule diploïde (deux jeux de chromosomes homologues) donnera quatre cellules haploïdes (un jeu de chromosomes) (Figure 1). L'haploïdisation du génome est une étape clé de la reproduction sexuée puisque c'est par la fusion de deux gamètes haploïdes qu'un organisme diploïde unique est créé.

La formation de gamètes, nommée gamétogénèse, caractérise les organismes à reproduction sexuée. La grande diversité d'espèces s'est accompagnée d'une diversification des types de gamètes. Ainsi les organismes de type *fungi* produisent des spores, toutes identiques d'un point de vue morphologique, contrairement aux mammifères où il existe un dimorphisme sexuel dans la production et la morphologie des gamètes. Ces derniers produisent d'une part, des gamètes mobiles que sont les spermatozoïdes chez le mâle, et d'autre part des gamètes peu mobiles, mais riches en nutriments que sont les ovules chez la femelle. Il peut également être noté que lors de l'ovogenèse, sur les trois cellules produites, seule une cellule donnera un ovule riche en nutriment et capable d'être fécondé, les deux autres étant des corps polaires.

Bien que la gamétogénèse présente des caractéristiques propres à chaque espèce, le processus méiotique qui s'y déroule assure la ségrégation correcte des chromosomes homologues et le brassage de l'information génétique. Dans la majorité des espèces, ces deux aspects de la méiose sont assurés par la formation de crossovers (COs) qui résultent de l'échange d'information génétique entre

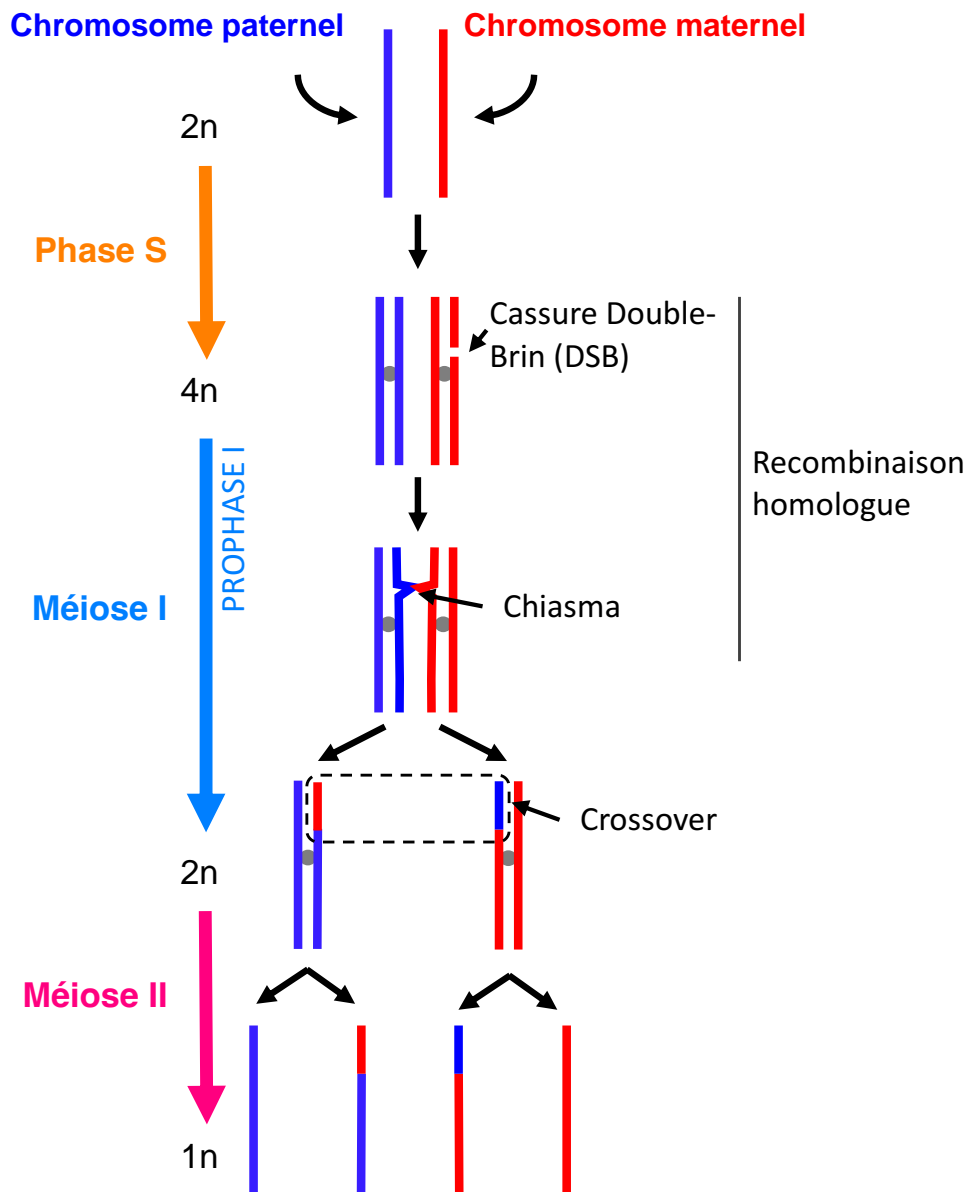


Figure 2 : Les principales étapes de la méiose

Illustration des principales étapes requises pour le passage de l'état diploïde (2n) à l'état haploïde (1n). Les traits rouges et bleus représentent les chromosomes homologues, les cercles gris représentent les centromères. n représente la quantité d'ADN dans la cellule. Une cellule diploïde 2n passe à 4n après répllication du génome, puis à l'état 2n après la MI avant d'atteindre le stade 1n après la MII. Au cours de la MI, le patrimoine génétique est mélangé *via* recombinaison homologue et ségrégation aléatoire des chromosomes : la génération de DSBs en début de méiose permet la formation de chiasmata *via* la réparation des cassures double-brin en crossovers. Ceux-ci sont essentiels à la ségrégation correcte des chromosomes homologues en MI et participent au brassage de l'information génétique. Enfin, en MII les chromatides sœurs sont séparées amenant à la formation de cellules haploïdes.

chromosomes homologues. Ceux-ci sont réalisés *via* le mécanisme de recombinaison homologue (HR) qui est initié par la formation de cassures double-brin de l'ADN (DSBs) (Figure 2). Ce chapitre a pour but de décrire le processus méiotique dans sa globalité avant d'aborder plus en détail le mécanisme de formation des cassures double-brin à l'origine des crossovers.

Partie I : Déroulé de la méiose

L'haploïdisation du génome est le résultat d'une phase de réplication de l'ADN unique, précédant deux divisions successives : une division réductionnelle (ou Méiose I, MI) suivie d'une division équationnelle (ou Méiose II, MII) (Page, 2003). De la même manière qu'en mitose, les étapes de Prophase, Métaphase, Anaphase et Télophase sont retrouvées dans les deux cycles de division bien qu'elles ne s'appliquent pas aux mêmes sujets en Méiose I et II. La Méiose I assure la séparation des chromosomes parentaux, dits homologues, tandis que la Méiose II, comme en mitose, correspond à la ségrégation des chromatides sœurs. Les différentes étapes de la méiose seront présentées à la suite avec une attention toute particulière sur la Prophase I, étape à laquelle mes travaux se sont intéressés. En outre, mon modèle d'étude étant la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, appartenant au règne des *Fungi*, les mécanismes décrits seront focalisés sur les études réalisées dans cette espèce, qui pourront être mises en parallèle avec nos connaissances dans d'autres organismes.

1. Entrée en méiose et réplication (pré-)méiotique

L'activation du programme méiotique est induit par l'environnement cellulaire. Chez les mammifères, tel que *Mus musculus* ou *Homo sapiens*, la méiose est induite en présence d'acide rétinolique produite par l'organisme (Bowles et al., 2006; Childs et al., 2011; Koubova et al., 2006). Chez les eucaryotes unicellulaires tels que *S. cerevisiae*, c'est la privation en source carbonée fermentable et en source azotée dans l'environnement externe qui induit l'entrée en méiose (Herskowitz, 1988).

Chez la levure bourgeonnante, l'entrée en méiose est contrôlée par le facteur de transcription Ime1 (« Inducer of MEiosis 1 ») (Kassir et al., 1988). Afin de prévenir la sporulation dans un environnement riche en nutriment ou un état de ploïdie inapproprié, l'expression de *IME1* est sous le contrôle de différents facteurs tels que la présence des deux allèles sexuels *MATa/MATα*, témoin de l'état diploïde de la cellule (Kassir and Simchen, 1976). La transcription du gène *IME1* est également régulée par l'expression de longs ARN non-codants, *IRT1* et *IRT2*, codés dans le promoteur du gène *IME1* (Moretto et al., 2018; van Werven et al., 2012). La protéine Ime1 entraîne

l'expression de nombreux gènes du programme méiotique, dont le gène *IME2* (Smith and Mitchell, 1989). La protéine Ime2 est responsable de l'activation du couple CDK (« Cycline Dependent Kinase) – cycline Cdc28-Clb5/6 qui permet l'initiation de la phase de réplication de l'ADN (Dirick et al., 1998), première étape du programme méiotique.

Cette phase est appelée phase S pré-méiotique ou phase S méiotique selon les études, et le terme de « phase S méiotique » sera utilisé ici afin de simplifier la lecture. Au cours de cette étape, une copie de chaque chromosome est synthétisée. Ceux-ci sont alors formés de deux chromatides identiques, appelées chromatides sœurs, maintenues ensemble par des cohésines et leur centromère. En notant n la quantité d'ADN dans une cellule, une cellule diploïde a un contenu en ADN de $2n$ (correspondant à deux jeux de chromosomes homologues, constitués chacun d'une chromatide). Après réplication de l'ADN, cette cellule a un contenu en ADN de $4n$ (deux jeux de chromosomes à deux chromatides). Les deux divisions successives qui suivent cette étape permettent *in fine* la formation de gamètes haploïdes qui recevront chacun une chromatide de chaque paire de chromosomes (quatre cellules à $1n$) (Figure 2).

Le déroulé spécifique de la réplication méiotique a été jusqu'alors peu étudié, et celle-ci est souvent mise en comparaison avec la phase S mitotique. Quelques spécificités de la réplication méiotique ont cependant été mises en avant. Un premier constat est celui de la durée de la phase S qui est deux à trois fois plus longue en méiose qu'en mitose (Cha et al., 2000) : 65 à 80 minutes chez *S. cerevisiae* en méiose (Padmore et al., 1991; Williamson et al., 1983) contre 20 à 30 minutes en mitose (Brewer and Fangman, 1987; Slater et al., 1977). Rapidement, l'hypothèse d'une différence d'utilisation des origines de réplication entre mitose et méiose a été proposée : la méiose utiliserait moins d'origines de réplication, expliquant ainsi la durée de la phase S. Cependant, aucune différence n'a été trouvée sur le chromosome III de *S. cerevisiae* (Collins and Newlon, 1994), tandis que le chromosome VI n'utilise que deux des trois origines de réplication normalement actives (Mori and Shirahige, 2007). Une origine de réplication du chromosome VI, fortement utilisée en phase S mitotique, est inhibée en méiose en raison de la transcription d'un gène méiotique au même moment, et il est proposé qu'un conflit entre la transcription et la réplication puisse expliquer l'inhibition de cette origine de réplication (Mori and Shirahige, 2007). Cependant, cette explication ne s'applique pas à l'ensemble du génome et l'analyse globale de l'activation des origines de réplication en méiose n'a pas révélé de différence avec la phase S mitotique (Blitzblau et al., 2012). L'hypothèse d'une différence d'utilisation des origines de réplication, qui n'a pas été complètement explorée chez *S. cerevisiae*, semble se confirmer chez d'autres espèces comme *Schizosaccharomyces pombe*. Chez

cette espèce, la carte des origines de réplifications utilisées en méiose et en mitose montre que l'efficacité d'utilisation des origines de réplification est divisée par deux en méiose par rapport à la mitose (Heichinger et al., 2006), provoquant un rallongement de la phase S. De plus chez *S. pombe* la machinerie d'initiation de la réplification méiotique semble être différente de celle utilisée en mitose, tandis que la progression de la fourche de réplification semble reposer sur les mêmes facteurs en mitose et en méiose (Forsburg, 2002; Forsburg and Hodson, 2000). Plus récemment, Pratto *et al.* ont démontré chez la souris et l'humain que la phase S méiotique n'utilise pas les mêmes origines de réplification qu'en mitose, et que moins d'origines sont utilisées (Pratto et al., 2021).

Chez *S. cerevisiae*, une autre hypothèse a été mise en avant pour expliquer la longueur de la phase S méiotique. En 2000, différents travaux indiquent que la phase S méiotique est couplée à l'initiation de la recombinaison homologue (Borde et al., 2000), et que des éléments essentiels à la recombinaison homologue et la cohésion entre chromatides sœurs sont mis en place (Borde et al., 2000; Cha et al., 2000). Il a ainsi été proposé que la durée accrue de la phase S méiotique soit due à la mise en place de ces facteurs (Borde et al., 2000; Cha et al., 2000). Ces travaux seront détaillés dans le Chapitre II : Régulation des DSBs et Interférence.

2. La division réductionnelle ou Méiose I

La répllication de l'ADN est suivie d'une première division cellulaire, la Méiose I (MI), essentielle à l'haploïdisation des cellules. Cette étape permet de réduire de moitié le nombre de chromosomes, contrairement à la mitose où leur nombre est conservé (Figure 1). La méiose I est donc qualifiée de « réductionnelle », puisque les paires de chromosomes homologues y sont séparées : les étapes de la MI sont dédiées à l'appariement des chromosomes homologues assurant la ségrégation correcte de ces derniers. Cette étape est cruciale pour la stabilité du génome puisque des défauts de ségrégation des chromosomes homologues en MI sont la cause principale des aneuploïdies chez l'humain (Hassold and Hunt, 2001). L'appariement des chromosomes homologues repose en général sur la recombinaison homologue, qui sera présentée dans la Partie III, et s'établit dans un contexte architectural chromosomique particulier qu'est le complexe synaptonemal (SC), présenté dans la Partie II. Ces deux aspects sont concomitants au cours de la prophase I dont le déroulé sera présenté dans cette Partie I.

Chez la majorité des espèces, la prophase I est l'étape pendant laquelle les chromosomes homologues sont condensés et reliés physiquement *via* l'établissement

de jonctions moléculaires entre eux. La condensation des chromosomes est un éléments clé de la ségrégation des chromosomes en méiose comme en mitose, et est assurée par les cohésines et les condensines (Hirano, 2005; Marston and Amon, 2004). Les liaisons entre chromosomes homologues ont été mises en évidence par l'observation de chromosomes méiotiques par microscopie optique où des points de contact, nommés chiasmata (chiasma au singulier), entre les chromosomes sont visibles (Figure 3). L'instauration de ces liens physiques résulte de la formation de crossovers en combinaison avec la cohésion des chromatides sœurs (Figure 4). Les crossovers correspondent à l'échange réciproque de bras chromosomiques entre les chromosomes homologues. Ces échanges participent au brassage génétique « intra-chromosomique » puisqu'ils aboutissent à la formation de nouvelles combinaisons alléliques. Le brassage intra-chromosomique est un des principaux moteurs de l'évolution du génome et participe à la diversité d'individus dans une population.

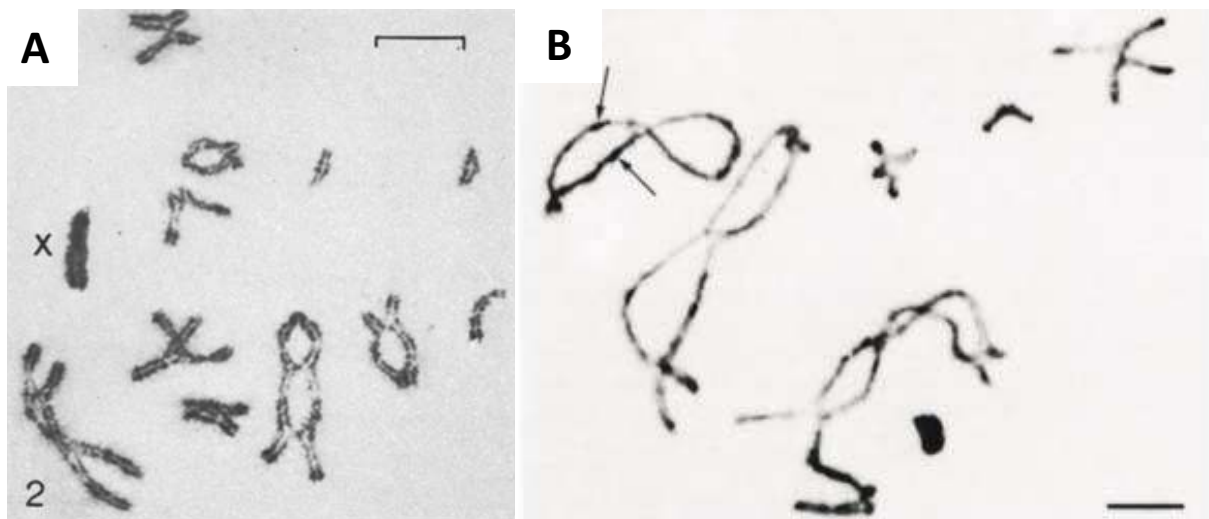


Figure 3 : Visualisation de chiasma entre chromosomes homologues

(A) Chromosomes de *Locusta migratoria* (criquet) en méiose I, traités à l'orcéine lacto-propionique et observés par microscopie optique. Barre d'échelle 10 μ m (Tease and Jones, 1978)

(B) Chromosomes de *Chorthippus brunneus* (sauterelle) en diplotène (prophase I) par microscopie optique (Börner et al., 2004).

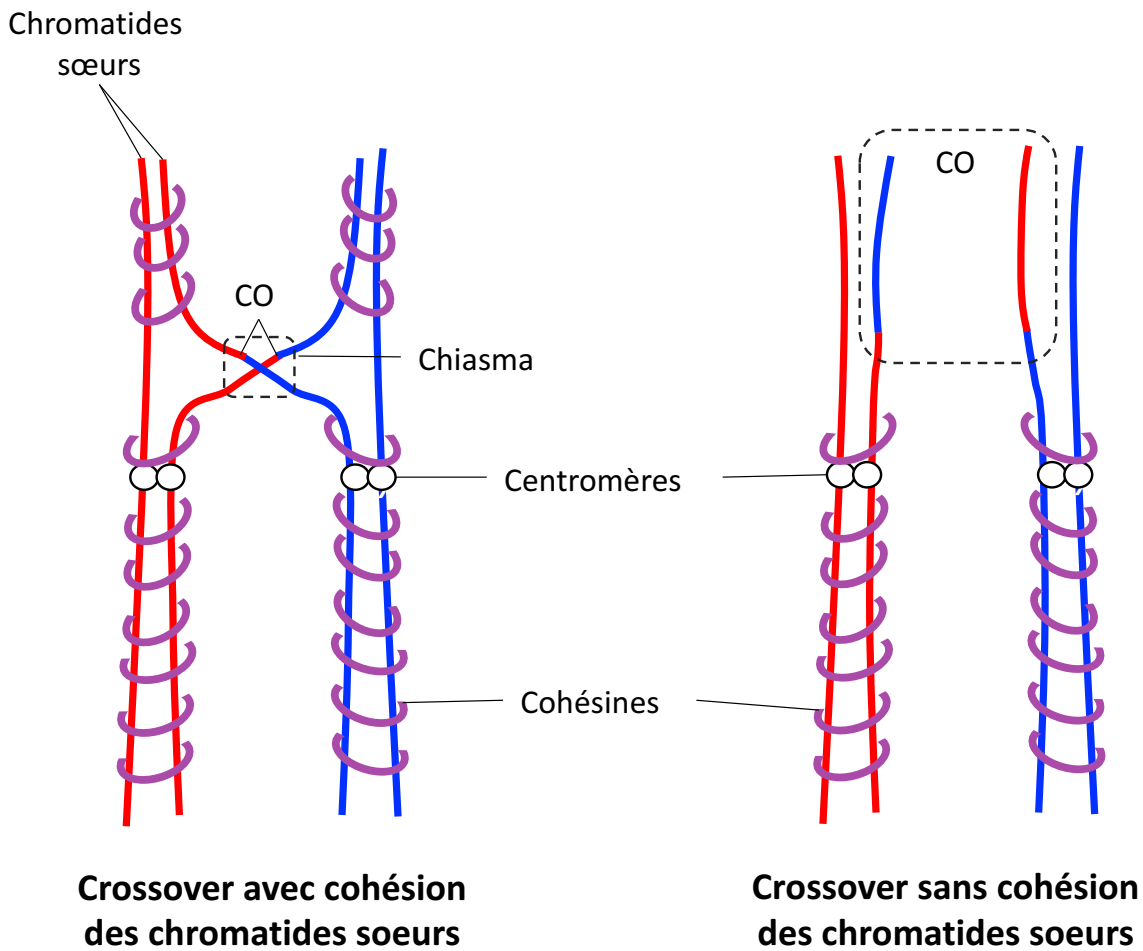


Figure 4 : Fonctionnement des chiasmata

Les liens physiques entre chromosomes homologues résultent de la formation de crossovers en combinaison avec la cohésion des chromatides sœurs. Sur le panneau gauche, l'une des chromatides rouges est connectée à une chromatide bleue, résultat de la formation d'un CO. Cependant, la chromatide rouge reste appariée à sa chromatide sœur, et la chromatide bleue à la sienne. C'est cette combinaison de deux facteurs, CO et cohésion, qui permet de former des liens physiques entre les chromosomes. Sans cette cohésion, l'échange de portion du génome ne permet pas d'établir de lien entre les chromosomes homologues, comme présenté sur le panneau de droite.

Comme schématisé en Figure 4, le crossover entre deux chromatides provenant de chromosomes différents ne suffit pas à établir un lien entre les chromosomes homologues. La cohésion entre les chromatides sœurs parentales doit être maintenue pour permettre ce lien. C'est la combinaison de ces deux facteurs qui permettent de générer de la tension entre les chromosomes homologues et de les aligner correctement sur la plaque métaphasique en métaphase I. En anaphase I, les chromosomes homologues sont séparés, et les microtubules nécessaires à la ségrégation des chromosomes sont désassemblés en télophase I pour préparer l'entrée en Méiose II. Les particularités de la métaphase I et de l'anaphase I seront présentées dans cette partie.

Le mécanisme d'appariement par formation des crossovers n'est cependant pas universel. De manière surprenante, le mâle drosophile ne forme aucun CO au cours de la méiose, sans que la ségrégation des chromosomes homologues ne soit altérée (Morgan, 1912). Tout d'abord, chez cette espèce les chromosomes homologues sont constamment appariés en mitose comme en méiose. De plus, trois protéines forment un « conjuction complex » qui permet l'appariement des chromosomes homologues de manière stable au cours de la spermatogénèse (McKee et al., 2012; Thomas et al., 2005).

2.1 Prophase méiotique I

La condensation du génome et l'appariement des chromosomes homologues s'établit au cours des cinq étapes qui constituent la prophase I : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacynèse (Figure 5, Figure 6). Ces différentes étapes correspondent à différents niveaux de compaction de la chromatine.

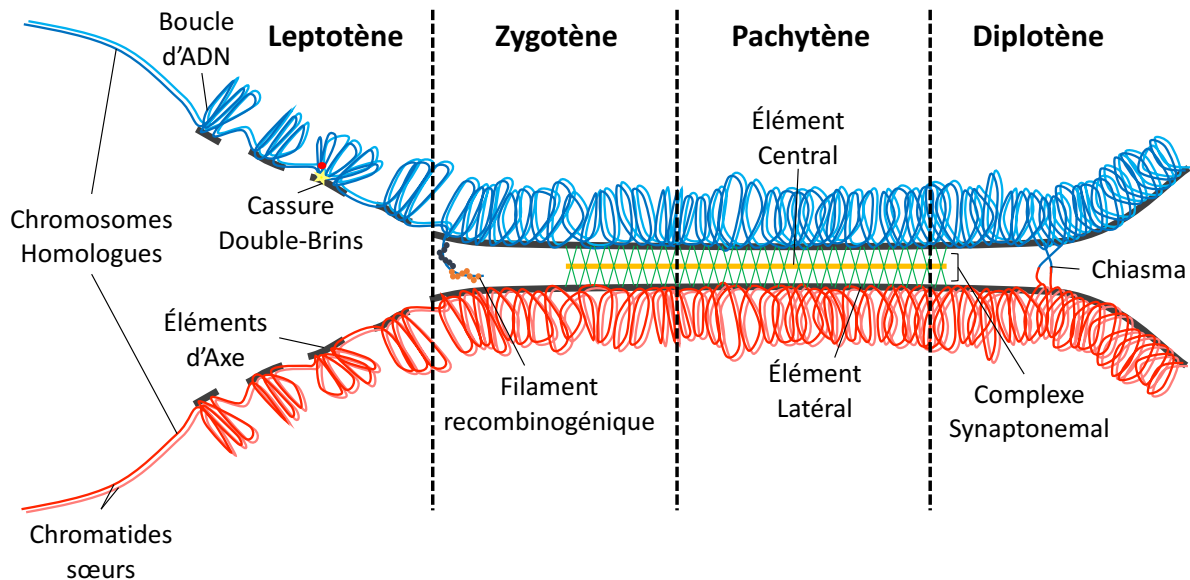


Figure 5 : Représentation des principales étapes et processus de la prophase I

Les quatre premières étapes de la prophase I sont présentées ici. Au cours du leptotène, la chromatine est condensée en boucle de chromatine *via* la formation d'un axe protéique (trait noir) et les premières cassures double-brin sont générées (★) par la machinerie de formation de cassures (●). La génération de cassures double-brin amène à la formation de filaments recombinogéniques où les recombinaisons (● ●) permettent la recherche et l'invasion d'une séquence homologue intacte sur le chromosome homologue en zygotène. La recombinaison homologue avec le chromosome homologue induit la formation du complexe synaptonemal (trait jaune : éléments centraux, trait vert : éléments transverses ; trait noir : éléments latéraux/axe), marquant la transition zygotène/pachytène. En pachytène, la synapse entre chromosome homologue est complète, médiée par le complexe synaptonemal. La totalité des cassures double-brin précédemment formées sont réparées à cette étape. Au cours du diplotène le complexe synaptonemal est désassemblé et les chromosomes homologues ne sont reliés entre eux que par les chiasmata résultant de la formation de crossovers à partir des DSBs générées. La prophase I finit avec la diacynèse qui n'est pas représentée ici. Adapté du manuscrit de thèse de Daniel Wells (Wells, 2020).

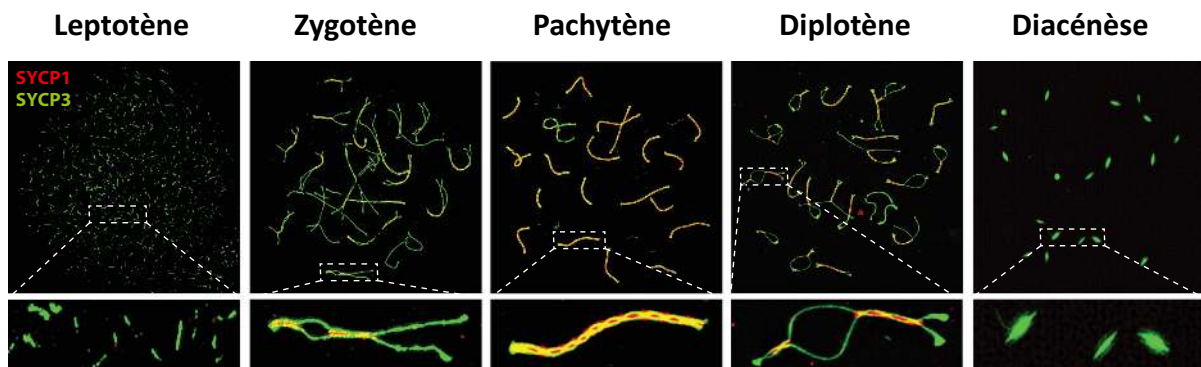


Figure 6 : Visualisation du processus de synapse des chromosomes homologues en prophase I

Visualisation de la formation du complexe synaptonémal chez la souris au cours de la prophase I par immunofluorescence. En rouge : SYCP1 (analogue de Zip1 chez *S. cerevisiae*). En vert : SYCP3 (analogue de Red1 chez *S. cerevisiae*). Adapté de Gray and Cohen (Gray and Cohen, 2016).

Leptotène

En leptotène, la chromatine est progressivement condensée sous l'action de complexes cohésines, amenant à la formation de la structure « axe-boucle » (Figure 5). Brièvement, chez *S. cerevisiae*, cette structure est constituée d'un axe nucléoprotéique composé des protéines Red1 et Hop1 ainsi que de complexes cohésines (dont la kleisin Rec8) d'où émanent des boucles de chromatine (Hollingsworth et al., 1990; Klein et al., 1999; Smith and Roeder, 1997). Cette structure fait l'objet d'une description plus détaillée en Partie II.

De manière concomitante, la recombinaison homologue est initiée *via* l'introduction de cassures double-brin programmées (Padmore et al., 1991; Sun et al., 1991) (*cf.* Partie III : Les cassures double-brin méiotiques). Les DSBs sont maturées amenant à la génération d'extrémités d'ADN simple brin qui s'associent aux protéines de la HR et forme des filaments de recombinaison (Figure 5). Ces filaments nucléoprotéiques pourront envahir une autre molécule d'ADN et s'apparier aux séquences homologues, afin de réparer la cassure initiale. La recherche d'homologie peut conduire le filament de recombinaison à s'apparier avec la chromatide sœur ou le chromosome homologue. Un biais permet cependant d'orienter la HR avec le chromosome homologue en méiose spécifiquement (Schwacha and Kleckner, 1997). Ce biais est implémenté progressivement au cours du leptotène et du zygotène par les protéines kinase Tel1 et Mec1 *via* la phosphorylation d'un élément de l'axe, Hop1 (Carballo et al., 2008; Joshi et al., 2015; Niu et al., 2005) (*cf.* Partie III – Recherche d'homologie et biais vers l'homologue). Ainsi, l'introduction de cassures double-brin conduit à la formation d'intermédiaires de recombinaison entre chromosomes

homologues qui forment des liens physiques entre eux et permettent leur alignement (Börner et al., 2004).

À la transition leptotène/zygotène, les chromosomes sont attachés à la périphérie nucléaire *via* leurs télomères, dans une conformation dite de « bouquet » (Scherthan, 2007; Trelles-Sticken et al., 1999). Via leur connexion à la membrane nucléaire, les chromosomes sont en lien avec le cytosquelette, permettant le mouvement des chromosomes au cours de la prophase I (Kozul et al., 2008). Il a rapidement été proposé que ces mouvements puissent promouvoir l'appariement entre chromosomes homologues. Certaines études démontrent que des défauts de mouvements (*ndj1Δ* chez *S. cerevisiae*, *taz1⁻* ou *dhc1⁻* chez *S. pombe*) sont associés à des défauts d'appariements (Ding et al., 2004; Trelles-Sticken et al., 2000). Cependant, d'autres études tendent à montrer que ces mouvements apparaissent trop tard en leptotène pour jouer ce rôle (Conrad et al., 2008; Scherthan, 2007), et la question reste ouverte (Kozul and Kleckner, 2009). Néanmoins, une autre hypothèse propose que les mouvements des chromosomes permettent de limiter les mésappariements entre chromosomes non homologues (Kozul and Kleckner, 2009). Chez *S. pombe*, la formation du bouquet favorise les interactions entre chromosomes homologues et limite les interactions entre non-homologues (Davis and Smith, 2006), et ce processus semble être conservé chez *S. cerevisiae* (Goldman and Lichten, 2000).

Zygotène

Au cours du zygotène, le biais de réparation des cassures avec l'homologue augmente (Joshi et al., 2015) et les intermédiaires de recombinaison formés lors de la recombinaison homologue permettent de rapprocher physiquement les chromosomes homologues et de consolider leurs appariements. Les intermédiaires de recombinaison sont notamment stabilisés par les protéines du ZMM qui promeuvent la formation de crossovers (Pyatnitskaya et al., 2019). Ce processus entraîne la formation du complexe synaptonemal, une structure protéique qui relie les chromosomes homologues. Le SC est composé d'éléments latéraux qui correspondent aux axes formés précédemment, et d'une région centrale où des éléments transversaux et centraux font le lien entre les chromosomes (Cahoon and Hawley, 2016) (Figure 5). Le SC permet de stabiliser l'alignement des chromosomes homologues et de consolider leur appariement. Bien que quelques espèces telles que *Tetrahymena thermophila* ou *S. pombe* ne forment pas de SC (Loidl, 2006; Lukaszewicz et al., 2013), cette structure est hautement conservée dans le vivant, y compris chez des espèces où les chromosomes homologues sont ségrégués sans CO (Zickler and Kleckner, 2015). Plus de détails sur sa composition et son rôle seront apportés dans la Partie II. Sa formation entraîne la synapse des

chromosomes homologues, et l'achèvement de sa formation marque la transition zygotène/pachytène.

Pachytène

Le pachytène est l'étape la plus longue de la prophase I et correspond visuellement à la synapse complète des chromosomes homologues (Figure 5, Figure 6). Au terme de cette étape, les chromosomes sont fortement condensés permettant la visualisation par microscopie optique des paires de chromosomes et des chiasmata qui les relient (Figure 3). Ces derniers résultent de la résolution des intermédiaires de recombinaison formés au cours du zygotène : ceux-ci peuvent donner lieu à un échange de bras chromosomique (« crossover », CO) ou non (« non-crossover », NCO). Tous les intermédiaires de recombinaison doivent être résolus au cours du pachytène pour passer le point de contrôle cellulaire (ou « checkpoint ») du pachytène qui bloque la progression méiotique en cas de HR incomplète (Lydall et al., 1996). Ce checkpoint repose sur deux facteurs : Mek1 et Ndt80. Ndt80 est un facteur de transcription dont l'activité permet la sortie du pachytène en stimulant la transcription de la cycline Clb1 (Chu and Herskowitz, 1998; Xu et al., 1995). Son absence induit l'arrêt du cycle méiotique en pachytène, et le SC est observable jusqu'à 15h après induction de la sporulation (Xu et al., 1995). Son activité est contrôlée par des modifications post-traductionnelles : l'utilisation d'une forme mimant la phosphorylation de la protéine Ndt80 (*NDT80-6D*) abolit la transcription de la cycline *CLB1* et donc l'arrêt du cycle cellulaire (Chen et al., 2018). Ces travaux ont permis de démontrer que l'activité de Ndt80 est contrôlée par la protéine kinase Mek1 qui, en présence de cassures, se lie et phosphoryle la protéine Ndt80 (Chen et al., 2018). Avec la réparation des cassures, l'activité de Mek1 est progressivement réduite, permettant alors l'activation de Ndt80 et le passage du checkpoint pachytène (Chen et al., 2018).

Diplotène

En diplotène, le SC est progressivement désassemblé, libérant les chromosomes homologues de leurs appariements avant la métaphase I. En fin de diplotène, les chromosomes homologues sont maintenus ensemble uniquement par l'association des COs et la cohésion des chromatides sœurs (Figure 3B, Figure 4) qui donnent visuellement les chiasmata.

Diacinèse

La diacénèse est l'étape finale de la prophase I. À cette étape, les chromosomes sont condensés au maximum (Figure 6), et leurs télomères se désolidarisent de la membrane nucléaire et du cytosquelette avant l'étape de ségrégation des chromosomes homologues.

2.2 Métaphase et Anaphase méiotique I

La première métaphase méiotique doit faire face à un défi important mais essentiel au programme méiotique : la ségrégation des homologues, un processus qui nécessite l'adaptation de la machinerie de ségrégation canonique. Cette ségrégation repose sur trois éléments spécifiques à la métaphase I : l'appariement des chromosomes homologues, l'attachement co-orienté des chromatides sœurs et le maintien de la cohésion entre elles jusqu'en métaphase II.

À l'instar des chromatides sœurs en mitose qui sont maintenues ensemble au cours de la métaphase mitotique, les chromosomes homologues doivent également être appariés en métaphase méiotique. Les COs formés en prophase I sont essentiels à l'alignement des chromosomes homologues sur la plaque métaphasique, leur absence entraînant une ségrégation aléatoire des chromosomes (Klein et al., 1999).

Le processus d'attachement des chromosomes aux réseaux de microtubules est également adapté. Les microtubules émanent de structures organisatrices de microtubules (« MTOC »), les « spindle pole body » chez *S. cerevisiae* ou les centrosomes chez la majorité des eucaryotes. À chaque division, cette structure est dupliquée et positionnée à chaque pôle de la cellule afin de générer le fuseau de microtubules (fuseau mitotique ou méiotique) qui ségrégera le matériel génétique. En méiose I, ce sont les chromosomes homologues qui sont connectés aux pôles opposés de la cellule. Les chromatides sœurs doivent co-ségrégier et sont attachées au même MTOC (Figure 7A). Il s'agit alors d'attachements dits « mono » ou « co-orientés », ou encore « syntéliques » (Marston and Amon, 2004). En mitose et en méiose II, les chromatides sœurs sont attachées de manière bi-orientée ou amphitélique : elles sont connectées aux pôles opposés de la cellule par les microtubules (Figure 7B).

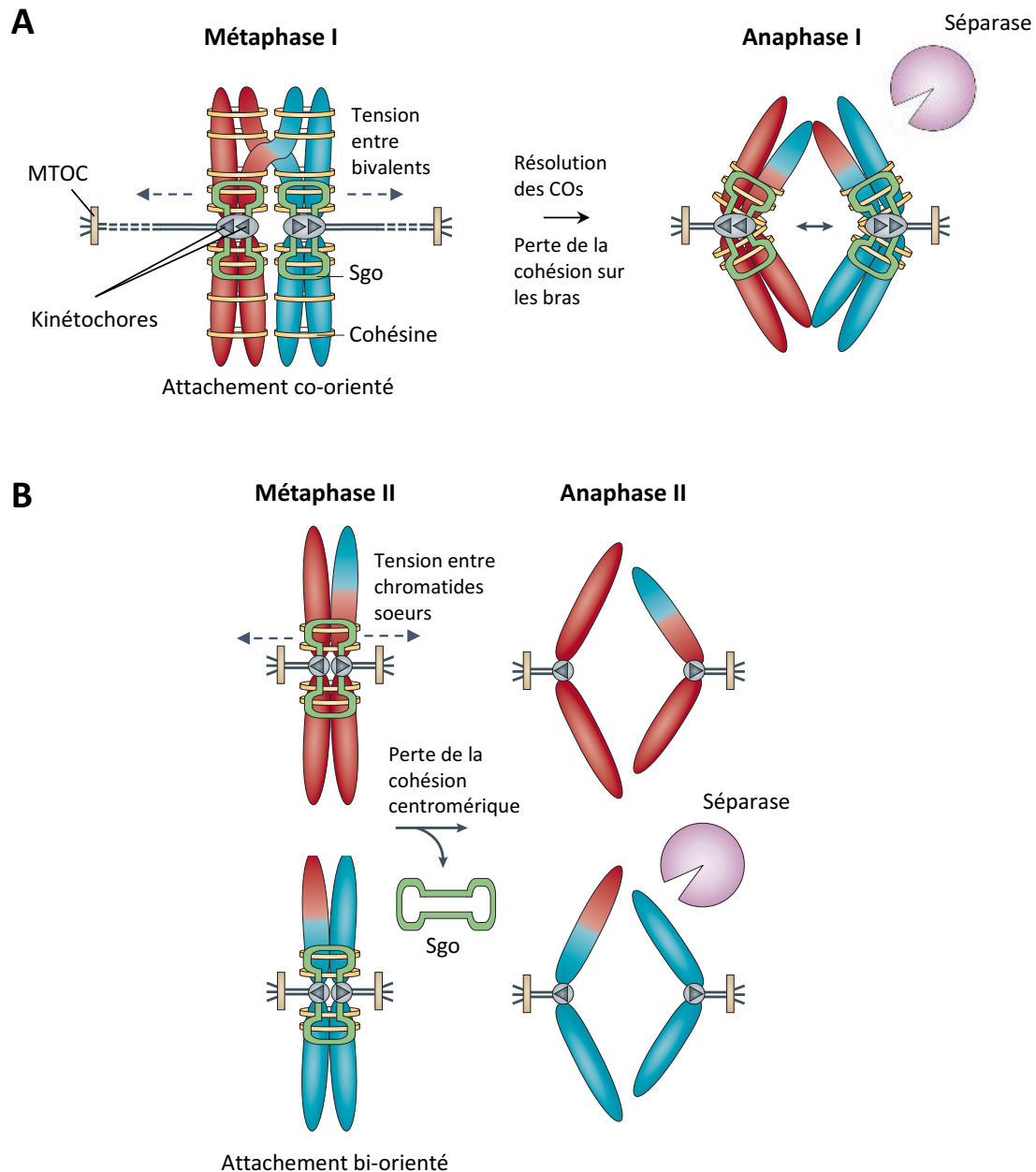


Figure 7 : Vue schématique des étapes de métaphase et anaphase en Méiose I et Méiose II

(A) La ségrégation des chromosomes homologues en M1 repose sur trois facteurs : (i) l'établissement de liens entre chromosomes homologues par au moins un chiasma, (ii) les kinétochores du même chromosome attaché à des microtubules émanant du même pôle cellulaire (attachement co-orienté), (iii) la cohésion des chromatides sœurs tout au long de la M1. Ces trois éléments permettent de mettre en tension les chromosomes homologues et de les aligner sur la plaque métaphasique. À l'Anaphase I, la séparase clive les cohésines pour dissocier les chromosomes. Les chromatides sœurs sont maintenue ensemble au cours de cette étapes grâce à la protéine Shugoshin (Sgo) qui protège les cohésines centromériques de la séparase.

(B) En MII, les kinétochores d'un même chromosome sont attachés à des microtubules émanant des pôles opposés (attachement bi-orienté) et la protéine Sgo est retirée. La mise en tension des chromatides sœurs permet leur alignement sur la plaque métaphasique, et à l'anaphase II les cohésines restantes sont clivées par la séparase.

Adapté de Marston et Amon (Marston and Amon, 2004).

L'alignement des chromosomes homologues sur la plaque métaphasique dépend donc de la formation de COs en prophase I, de la cohésion entre chromatides sœurs et de l'attachement de chaque chromosome homologue à des pôles opposés. Les réseaux de microtubules opposés vont tirer chaque chromosome d'une même paire (alors appariés) vers un pôle de la cellule, générant ainsi une tension permettant leur alignement avant leur ségrégation en anaphase I (Figure 7A).

La séparation des chromosomes homologues nécessite la résolution des chiasmata qui les relient, *via* la perte d'une partie de la cohésion entre chromatides sœurs (Figure 7A). Il est essentiel que la perte de cohésion ne soit pas totale afin que les chromatides sœurs co-ségrègent : la cohésion est donc éliminée sur les bras chromosomiques et maintenue au niveau des centrosomes (Klein et al., 1999; Watanabe and Nurse, 1999). En méiose comme en mitose, l'élimination de la cohésion résulte de l'action de la séparase qui clive les cohésines. En méiose cependant, les cohésines centromériques sont protégées de l'action de la séparase par une protéine associée aux kinétochores, shugoshin (Sgo1) (Figure 7A) (Katis et al., 2004; Kitajima et al., 2004; Klein et al., 1999). La répartition des chromosomes homologues se fait de manière aléatoire. Ainsi les chromosomes paternels 1 et 4 pourront être ségrégués avec les chromosomes maternels 2 et 3, etc. Cette répartition aléatoire permet un brassage inter-chromosomique qui, ajouté au brassage intra-chromosomique généré par les COs, augmente les combinaisons génétiques et participe à la diversité des individus au sein d'une espèce.

3. La division équationnelle ou Méiose II

La Méiose I est suivie d'une deuxième division permettant la séparation des chromatides sœurs, la Méiose II. Celle-ci est réalisée sans réplication préalable du génome. Comme en mitose, le patrimoine génétique est réparti équitablement sans réduction du nombre de chromosomes, lui donnant le qualificatif de division équationnelle. C'est une étape relativement peu étudiée, en comparaison à la Méiose I, qui semble suivre le même déroulé qu'une division mitotique.

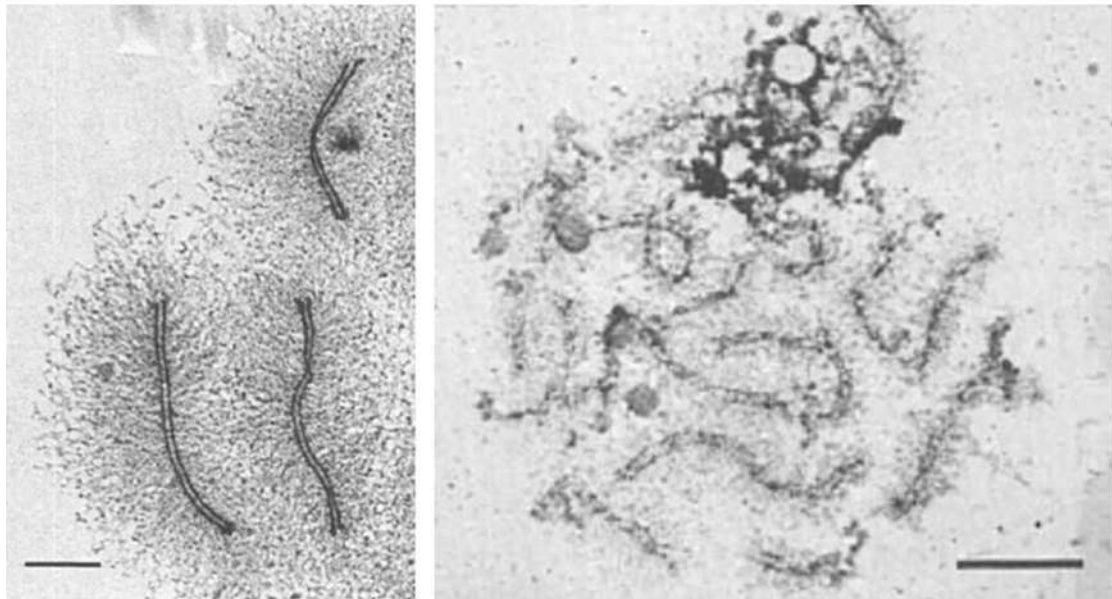
En prophase II, le MTOC est à nouveau dupliqué afin de ségréger les chromatides sœurs. Au cours de la métaphase II, les chromatides sœurs sont attachées au fuseau méiotique de manière bi-orientée (Figure 7B). Cet attachement associé à la cohésion centromérique des chromatides sœurs permet de générer une tension sur les chromosomes et leur alignement sur la plaque métaphasique (Marston and Amon, 2004). La tension exercée en bi-orientation sur les chromosomes entraîne l'éviction de la protéine Sgo1 (Nerusheva et al., 2014), et les cohésines centromériques ne sont alors

plus protégées. En anaphase II, la séparase est réactivée et les cohésines restantes sont clivées, libérant les chromatides sœurs.

Les défauts de ségrégation amenant à des aneuploïdies peuvent également provenir de la MII. Chez de nombreux eucaryotes, et notamment chez les mammifères, l'ovocyte est bloqué en métaphase II jusqu'à sa fécondation. Cet arrêt est provoqué par un « facteur cytotatique » (CSF), décrit pour la première fois chez le xénope (Masui and Markert, 1971). Sans entrer dans le détail, différentes voies permettent d'inhiber le complexe APC/C qui contrôle la transition métaphase II – anaphase II et la perte de la cohésion entre chromatides sœurs (Marston and Amon, 2004; Sanders and Jones, 2018). L'un de ces mécanismes repose sur la protéine Emi2 qui inhibe directement le complexe APC/C (Reimann et al., 2001; Sanders and Jones, 2018). Lors de l'arrêt en métaphase II de l'ovocyte, les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique, sous tension du fuseau de microtubules. Cette situation peut entraîner des pertes de cohésion entre chromatides sœurs, un phénomène connu sous le nom de « fatigue des cohésines » et entraîner des aneuploïdies (Daum et al., 2011). La fertilisation entraîne un relargage de Ca^{2+} dans la cellule qui à terme permet la transition métaphase – anaphase II *via* l'activation du complexe APC/C (Sanders and Jones, 2018).

Partie II : Architecture Chromosomique en méiose

L'architecture chromosomique est un élément important à l'appariement des chromosomes homologues en prophase I. La structure axe-boucle est non seulement essentielle à la condensation de la chromatine, une étape nécessaire à la ségrégation correcte des chromosomes (Figure 8), mais joue également un rôle important dans l'initiation de la recombinaison homologue. Le SC, quant à lui, permet la synapse des chromosomes (Figure 6). Cette Partie II est dédiée à la description de ces structures et leur mise en place. Leurs rôles dans la HR seront abordés dans la Partie III.



from Moens and Pearlman 1988

Figure 8 : Architecture chromosomique en méiose

Visualisation des boucles de chromatine et de l'axe par microscopie électronique. Panneau Gauche : Étalement de chromosomes (« Chromosome spread ») d'un noyau de *Hyalophora columbia* en pachytène. Les boucles s'étendent sur environ 3µm depuis l'axe nucléoprotéique. Barre d'échelle = 2µm. Panneau Droit : Étalement de chromosomes d'un noyau de *Sacharromyces cerevisiae* en pachytène. Les boucles sont ici plus petites en comparaison à la taille de l'axe. Barre d'échelle = 2µm. Adapté de Møens et Pearlman (Møens and Pearlman, 1988).

1. Le modèle axe-boucle

L'établissement d'une structure axe-boucle repose sur la condensation de la chromatine par des cohésines spécifiques à la méiose, entraînant la formation de boucles de chromatine, et la mise en place d'un axe nucléoprotéique à la base de ces boucles *via* le recrutement des protéines Red1 et Hop1. Cette structure semble largement conservée puisque des orthologues de ces protéines sont retrouvés chez la levure bourgeonnante, les mammifères, les plantes et le nématode (Tableau 1) (Kim et al., 2014; West et al., 2019).

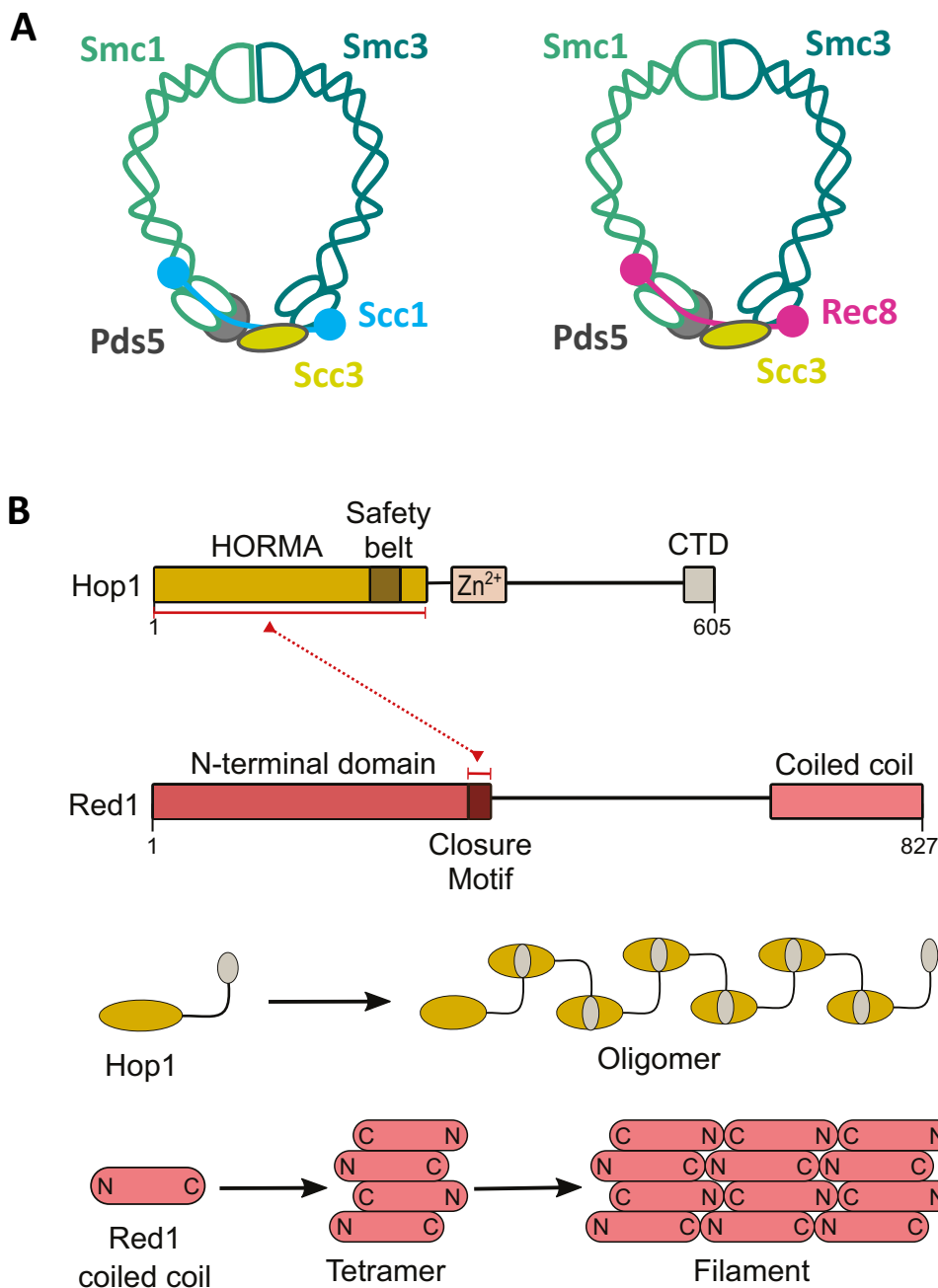


Figure 9 : Eléments structurel de l'axe nucléoprotéique

(A) Représentation schématique du complexe cohésine mitotique (gauche) et méiotique (droite). En méiose, la sous-unité α -klésin Scc1 est remplacée par la sous-unité spécifique de la méiose Rec8.

(B) Représentation schématique des protéines Red1 et Hop1. La protéine Hop1 forme un oligomère via l'interaction entre son domaine HORMA et son motif CTD. Le domaine « coiled-coil » de Red1 forme un filament composé de tétramères anti-parallèles de Red1. Le lien entre les deux polymères se fait *via* l'interaction entre le domaine HORMA de Hop1 et le « closure motif » de Red1. Adapté de Yadav et Bouuaert (Yadav and Claeys Bouuaert, 2021).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>M. musculus</i>	<i>A. thaliana</i>
Hop1	Hop1	HORMAD1/2	ASY1/2
Red1	Rec10	SYCP2	ASY3
Rec8	Rec8	REC8	DIF1

Tableau 1 : Conservation des protéines de l'axe

Tableau de conservation des protéines essentielles à la formation des cassures double-brin (Kariyazono et al., 2019).

Rec8 et le complexe cohésine spécifique de la méiose

La condensation de l'ADN est réalisée par les cohésines composées de sous-unités de la famille des SMCs (« Structural Maintenance of Chromosome) et d'une sous-unité α -klésine. Ce complexe protéique est essentiel à la cohésion entre chromatides sœurs au cours des divisions cellulaires, et joue un rôle important dans l'organisation des régions centromériques (Yatskevich et al., 2019). Les protéines Smc1 et Smc3 forment un anneau protéique, refermé par la klésine Scc1 (Figure 9A), qui sera clivée en métaphase pour libérer les chromatides sœurs et permettre leur ségrégation au cours de la mitose (Grey and de Massy, 2021). En méiose, la sous-unité Scc1 est remplacée par la protéine Rec8 (Figure 9A), une klésine spécifiquement exprimée en méiose (DeVeaux and Smith, 1994; Klein et al., 1999; Parisi et al., 1999). La protéine Rec8 est notamment essentielle à la non-disjonction de la cohésion entre chromatide sœur au cours de la Méiose I (*cf.* Partie I – Métaphase et Anaphase méiotique I) et à la formation de la structure axe-boucle.

Dès 1999, Klein *et al.* observent la formation de l'axe par microscopie électronique, qui est abolie en absence Rec8 (Klein et al., 1999). Par microscopie à fluorescence, les auteurs montrent que Rec8 est également requise pour le recrutement de Red1, puisqu'en absence de Rec8, Red1 ne forme plus de structure linéaire (Klein et al., 1999). Cependant, des foyers de Red1 sont toujours observés en absence de Rec8 (Klein et al., 1999), et des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sur Red1 et Hop1 montrent que les protéines sont toujours chargées sur l'ADN en fond *rec8 Δ* mais que leur localisation sur la chromatine est affectée (Panizza et al., 2011). L'analyse à l'échelle du génome des sites de chargement de Rec8 par ChIP suivi d'un séquençage (ChIP-seq) montrent que la protéine est principalement localisée dans les régions centromériques en début de phase S, avant d'être

progressivement relocalisée sur les bras chromosomiques en prophase I (Kugou et al., 2009). De plus, des analyses par ChIP-seq ont permis de démontrer que la protéine Rec8 est principalement enrichie dans des régions intergéniques entre des gènes convergents, où sont également localisés Red1 et Hop1 (Panizza et al., 2011; Sun et al., 2015). Ces régions génomiques, principalement enrichies en A-T, correspondent ainsi aux sites de l'axe (Blat and Kleckner, 1999; Blat et al., 2002; Glynn et al., 2004). Enfin, des techniques récentes de capture de la conformation de la chromatine (Hi-C) montrent que les points de fixation de Rec8 correspondent aux points de contact entre régions génomiques qui sont la base des boucles de chromatines (Muller et al., 2018; Schalbetter et al., 2019).

Les protéines de l'axe Red1 et Hop1

Les protéines Red1 et Hop1 sont des éléments importants pour la formation de l'axe nucléoprotéique, mais également pour la mise en place du complexe synaptonemal. Red1 est un élément central de l'axe (Smith and Roeder, 1997), qui forme un homotétramère capable de s'oligomériser formant ainsi un filament protéique (Figure 9B) (West et al., 2019). La protéine Hop1, également requise pour la formation de l'axe, contient un domaine HORMA (pour Hop1, Rev7 et Mad2 qui contiennent toutes trois ce domaine) (Figure 9B) (Hollingsworth et al., 1990). Ce domaine permet l'oligomérisation de la protéine Hop1 *via* l'interaction entre ce domaine et un motif situé en C-terminal de la protéine (Figure 9B) (West et al., 2018).

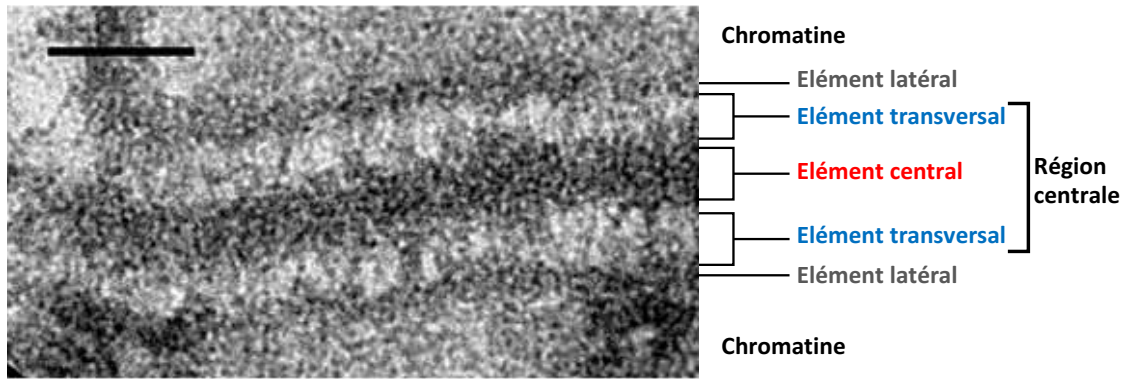
Les analyses par ChIP-seq de Sun *et al.* ont permis de démontrer que le recrutement de Hop1 à la chromatine est dépendant de la protéine Red1, tandis que l'absence de Hop1 n'altère pas le recrutement de Red1 (Sun et al., 2015). De plus, l'absence de Red1 et Hop1 n'abolit pas le recrutement de Rec8 (Sun et al., 2015), suggérant que Rec8 est à la base du recrutement des protéines de l'axe.

De manière surprenante, seule Rec8 semble essentielle à la formation de l'axe puisqu'en absence de Red1 ou Hop1 des structures linéaires correspondant à l'axe sont visibles par microscopie électronique (Hollingsworth and Byers, 1989; Klein et al., 1999; Rockmill and Roeder, 1988). Cependant, la structure de l'axe apparaît fragmentée et irrégulière dans ces mutants, suggérant que les protéines contribuent à la formation de l'axe et à sa stabilité. De plus, l'absence de Red1 induit des défauts de synapse des chromosomes homologues en abolissant le recrutement de Zip1, un élément essentiel du SC (Smith and Roeder, 1997). Ce défaut peut découler directement du rôle de Hop1 et Red1 dans la formation des cassures double-brin (*cf.* Partie III : Les cassures double-brin méiotiques). Ainsi, Red1 et Hop1 apparaissent comme essentiels à la formation du SC.

Boucles d'ADN

Les boucles d'ADN peuvent être observées par microscopie électronique (Figure 8), ce qui a permis d'estimer leur taille à ~20kb dès 1988 (Møens and Pearlman, 1988). Plus récemment, des techniques de capture de la conformation de la chromatine ont permis d'affiner ces mesures. Ainsi, Schalbetter *et al.* observent une hétérogénéité dans la taille et le positionnement des boucles, et ce même entre chromatides sœurs (Schalbetter et al., 2019). Cependant, leurs mesures corréleraient à celle de 1988, puisqu'ils estiment à ~26kb la taille d'une boucle en moyenne. Le mécanisme précis de formation des boucles est encore méconnu actuellement, bien que certaines études proposent que celles-ci soient formées par extrusion de l'ADN (Fudenberg et al., 2017; Schalbetter et al., 2019). La formation des boucles repose sur Rec8 (Schalbetter et al., 2019), et il a été proposé que celle-ci soit capable de moduler la structure de la chromatine à l'image des condensines (Yatskevich et al., 2019), cependant le mode d'action des cohésines méiotiques reste encore à être exploré.

A



B

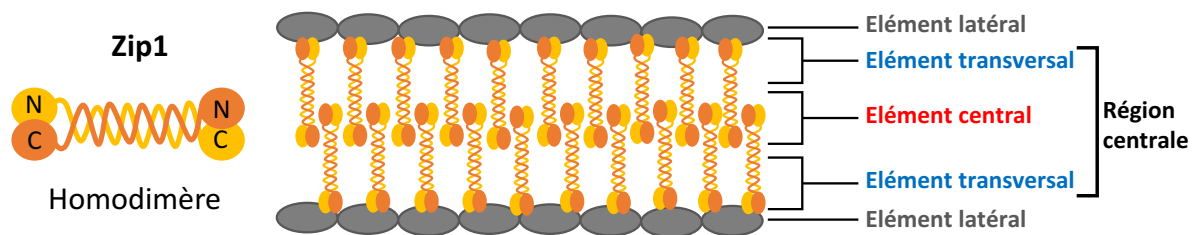


Figure 10 : Visualisation et schématisation du complexe synaptonémal

(A) SC de *Drosophila melanogaster* observé par microscopie électronique. Les différentes parties de la structure sont visibles par nuance de gris, correspondant au niveau de densité moléculaire de la structure. Barre d'échelle = 100nm. Adaptée de Cahoon et Hawley (Cahoon and Hawley, 2016)

(B) Schématisation de l'homodimère de Zip1 et du SC. Les éléments latéraux denses visibles en (A) correspondent à l'axe protéique associé aux têtes globulaires de Zip1. L'élément central dense également, correspond aux têtes globulaires de Zip1 qui se rejoignent au centre de la structure. Les éléments transversaux, moins denses, correspondent au domaine « coiled coil » de Zip1. Pour plus de clarté, les boucles de chromatine ne sont pas représentées.

2. Le complexe synaptonemal

Le complexe synaptonemal (SC) assure la synapse des chromosomes homologues en prophase I. C'est en 1956 que cette structure est pour la première fois observée par Moses *via* l'observation de spermatocytes d'écrevisses par microscopie électronique (Moses, 1956). La même année, cette structure est également décrite chez le pigeon, le chat et l'homme par Fawcett (Fawcett, 1956). Trois parties sont discernées : deux éléments latéraux et un élément central, tous très denses aux électrons et parallèles entre eux (Schmekel and Daneholt, 1995) et les éléments transversaux peu denses, perpendiculaires aux structures centrales et latérales (Figure 10). Les éléments latéraux correspondent à l'axe nucléoprotéique formé en début de prophase I par les cohésines, Hop1 et Red1, duquel émanent les boucles chromatiniennes et sur lesquels se repose la construction du SC (Page and Hawley, 2004). Les éléments transverses et centraux forment la région centrale et sont composés de la protéine Zip1. La protéine Zip1 est composée de deux domaines globulaires en N- et C-terminal, séparés par un long domaine « coiled-coil ». Zip1 forme un dimère antiparallèle où les domaines N-terminal et C-terminal de deux unités protéiques différentes s'associent (Page and Hawley, 2004). Chaque dimère se fixe ensuite à un axe, formant ainsi les filaments transversaux du SC. C'est ensuite l'association des dimères émanant des deux axes qui forment l'élément central. La protéine Zip1 fait partie d'un groupe nommé ZMM pour Zip1, Zip2, Zip3, Spo16, Mer3, Msh4 et Msh5. Ce groupe de protéines est associé à la formation du SC, sa polymérisation, et joue également un rôle dans la formation des COs (Pyatnitskaya et al., 2019).

La formation du SC est initiée par la réparation des premières DSBs par recombinaison homologue avec le chromosome homologue. La proximité physique entre les chromosomes homologues induite par les intermédiaires de recombinaison est essentielle à la nucléation de la structure (Albini and Jones, 1987; Oliver-Bonet et al., 2007). En effet, en absence d'éléments de la machinerie de formation de cassures (Spo11 ou Ski8), la formation du SC n'est pas complète (Henderson and Keeney, 2004). La formation de cassures double-brin semble être à l'origine du recrutement de la protéine Zip1 (Henderson and Keeney, 2004; Tung and Roeder, 1998). Ainsi, Zip1 interagit avec les protéines Zip2 et Zip3, membre du groupe ZMM, et forment ensemble le « synapsis initiation complex » (ou « SIC ») (Fung et al., 2004). À partir de ces points de nucléation, la polymérisation de la structure s'effectue sur toute la longueur du chromosome (Kleckner, 2006; Zickler and Kleckner, 2015). Cette structure est largement conservée puisque des analogues de Zip1 sont retrouvés chez tous les

organismes étudiés jusqu'à présent (Hawley, 2011; Higgins et al., 2005; Miao et al., 2013).

Deux rôles majeurs sont généralement attribués aux protéines du complexe synaptonemal. D'une part, la structure du SC stabilise l'alignement des chromosomes homologues au cours de la prophase I. D'autre part, les protéines du ZMM jouent à la fois un rôle dans la génération de crossovers (*cf.* Partie III : Les cassures double-brin méiotiques) et la mise en place du SC (Pyatnitskaya et al., 2019). Il est toutefois intéressant de noter que chez certaines espèces comme *Caenorhabditis elegans* ou la drosophile femelle *Drosophila melanogaster*, la synapse des chromosomes homologues *via* la formation du SC est indépendante de la formation des COs (Dernburg et al., 1998; McKim et al., 1998).

Partie III : Les cassures double-brin méiotiques

Les cassures double-brin correspondent à une rupture des deux brins de la double hélice d'ADN, et font partie des lésions les plus toxiques et complexes à réparer pour la cellule. Deux voies de réparation majeures peuvent être utilisées pour les réparer, le choix entre les deux dépendant de la phase du cycle cellulaire en cours. Avant réplication du génome, le mécanisme de « Non-Homologous End-Joining » (NHEJ) répare les cassures en raboutant les deux extrémités d'ADN ensemble. Cette méthode de réparation a l'avantage d'être rapide et peu complexe à mettre en place, mais elle peut être à l'origine de mutations par délétion ou insertion de bases. Après réplication du génome, les cellules ont la possibilité de réparer de manière fidèle la lésion via la recombinaison homologue. Ce processus utilise généralement la chromatide sœur comme substrat de réparation de la cassure en croissance végétative. La réparation par recombinaison homologue peut mener à la formation de crossovers ou de non-crossovers, et est généralement associée à de la conversion génique. Cet aspect de la recombinaison homologue est un puissant moteur de l'évolution des espèces et a été détourné pour certains processus physiologiques où elle promeut la diversité génétique.

Les cassures double-brin accidentelles peuvent être engendrées par de nombreux agents exogènes (*e.g.* rayons ionisants ou produits chimiques) et endogènes (*e.g.* radicaux libres ou stress réplicatif). Celles-ci sont source d'instabilité génétique et représentent un danger pour l'organisme en participant à l'émergence de certaines pathologies, notamment cancéreuses (Ceccaldi et al., 2016). De manière paradoxale, les DSBs peuvent également être formées de manière programmée par la cellule. Bien qu'elles représentent un danger, celles-ci sont essentielles à certains processus physiologiques. Ainsi, la formation de DSBs permet d'initier la recombinaison homologue qui assure la ségrégation correcte des chromosomes homologues en méiose, ou peut permettre la conversion d'allèle au cours du « mating-type switching » chez *S. cerevisiae*. De la même manière, l'introduction de DSBs est également essentielle à la recombinaison V(D)J qui s'opère au cours de la formation des lymphocytes B et T (Schatz and Swanson, 2011), ou encore dans les neurones où celles-ci participent à la régulation de l'expression de certains gènes (Alt and Schwer, 2018).

Le programme méiotique assure donc l'introduction de DSBs *via* une machinerie complexe, ainsi que leur réparation qui aboutit à la formation de COs et de NCOs. Cette partie sera dédiée à la description du programme de recombinaison méiotique, de la formation des DSBs à la génération des COs et NCOs finaux, avec une attention toute particulière sur le mécanisme de formation des DSBs. La régulation spatio-temporelle de leur formation sera abordée dans le Chapitre II.

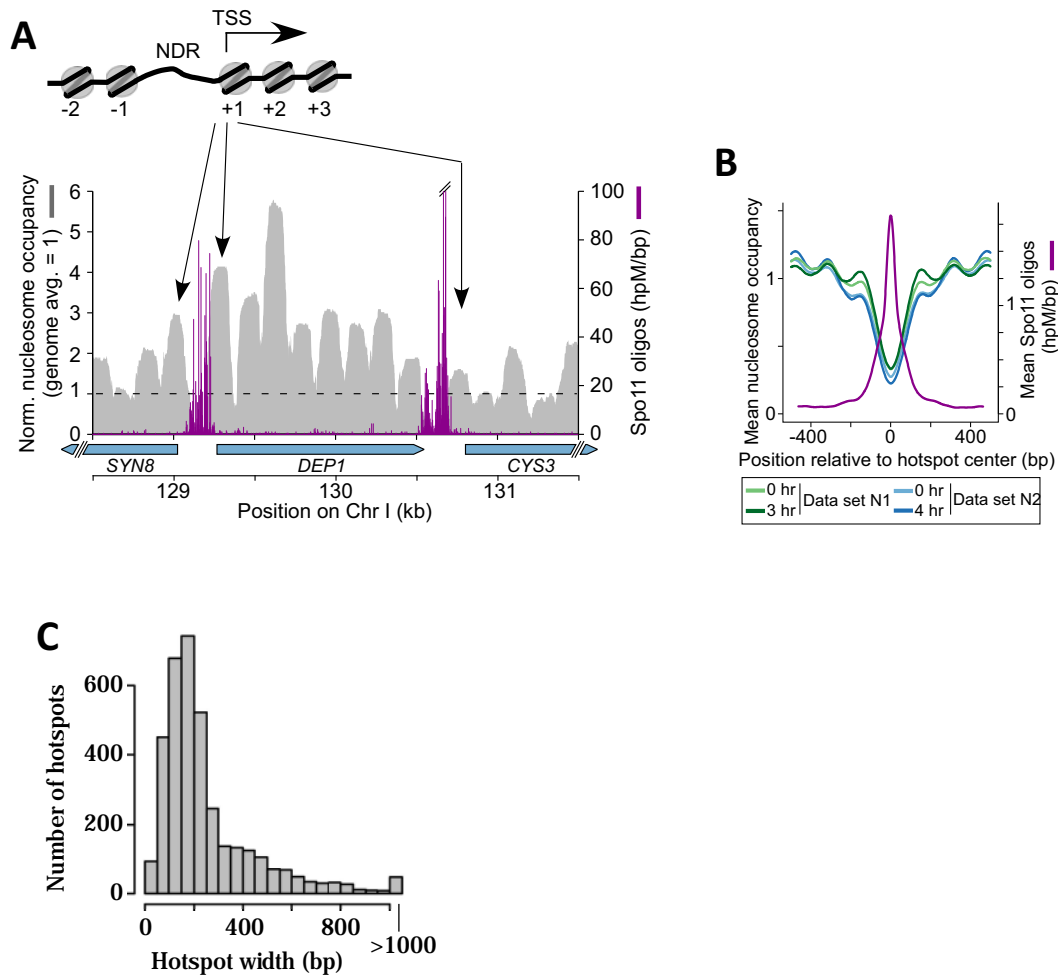


Figure 11 : Formation de DSBs au sein de hotspots de cassures

(A) Localisation des Spo11-oligos dans les zones appauvries en nucléosomes (NDRs). Le schéma présente le positionnement classique des nucléosomes d'un promoteur par rapport au site d'initiation de la transcription (TSS). En gris est représenté l'enrichissement local en nucléosome. En violet est représenté l'enrichissement en Spo11-oligo sur le génome. Les flèches indiquent le premier nucléosome de chaque unité de transcription présente sur cette portion du génome.

(B) « Pile-up » de l'enrichissement des nucléosomes et des Spo11-oligos relatif au centre des hotspots.

Adapté de Pan *et al.* (Pan et al., 2011)

1. Formation des cassures double-brin méiotiques

1.1 Point chaud de cassures ou « Hotspot »

Bien que cela puisse varier en fonction des espèces, de nombreuses cassures sont formées en prophase I : de l'ordre de 140 à 170 DSBs réparties sur les 16 paires de chromosomes de *S. cerevisiae* ; 200 à 250 DSBs réparties sur 20 paires de chromosomes chez la souris et ~200 DSBs réparties sur les 5 paires de chromosomes de *A. thaliana* (Cole et al., 2012; de Massy, 2013; Pan et al., 2011).

Ces DSBs ne sont pas réparties aléatoirement sur le génome. La détection des DSBs par Southern Blot sur le chromosome III chez *S. cerevisiae* a permis de démontrer qu'il existe une alternance de zones « chaudes » et de zones « froides » de cassures sur les bras chromosomiques, tandis que les zones télomériques et centromériques sont des zones froides (Baudat and Nicolas, 1997).

La structure chromatinienne est un élément déterminant dans la formation des cassures. Les sites d'initiation de la HR sont majoritairement détectés dans des régions intergéniques et montrent une hypersensibilité à la nucléase micrococcale (MNase), attestant d'un appauvrissement en nucléosomes dans ces zones (Ohta et al., 1994; Wu and Lichten, 1994). Ces sites sont des points chauds de cassures, ou plus communément appelés « hotspots » de cassures. Chez *S. cerevisiae*, les hotspots de cassures correspondent notamment aux régions promotrices de gènes (Wu and Lichten, 1994). Plus récemment, une carte complète des sites de cassures a été réalisée chez *S. cerevisiae*, mettant en évidence ~3600 hotspots sur le génome (Pan et al., 2011). Cette carte a été réalisée par immunoprécipitation suivie d'un séquençage des Spo11-oligonucléotides, un intermédiaire du processus de réparation des DSBs. Brièvement, lors de la génération d'une DSB, la protéine Spo11, qui catalyse la réaction, reste lié de manière covalente à l'ADN (Keeney et al., 1997). Lors de la maturation des DSBs, un clivage endonucléolytique permet de libérer la protéine attachée à un petit fragment d'ADN simple-brin, un complexe nommé « Spo11-oligos » (Neale et al., 2005; Pan et al., 2011). Leur analyse sur gel à haute résolution permet de distinguer deux populations de Spo11-oligos (Neale et al., 2005) et leur séquençage a permis la réalisation d'une carte des DSBs (Pan et al., 2011). Cette cartographie à haute résolution des DSBs confirme les précédents résultats obtenus par Southern Blot et cartographie de l'ADN simple brin (Baudat and Nicolas, 1997) : dans la région présentée en Figure 11A, les DSBs sont détectées dans les zones appauvries en nucléosomes, correspondant aux promoteurs de gènes. Sur l'ensemble du génome, la localisation des Spo11-oligos est anti-corrélée à l'enrichissement en nucléosomes (Figure 11B), indiquant que les DSBs sont générées dans des zones appauvries en nucléosome,

celles-ci correspondant majoritairement à des promoteurs de gènes chez *S. cerevisiae* (Pan et al., 2011).

De plus, l'analyse de fréquence de coupure au sein d'une population montre que tous les hotspots ne sont pas coupés aussi fréquemment les uns que les autres. Chez *S. cerevisiae*, le hotspot le plus fort est situé dans le promoteur de *GAT1* et est retrouvé coupé dans ~15% des cellules en fond génétique *rad50S* (Pan et al., 2011; Yamashita et al., 2004). La taille des hotspots varie de 50pb à 1kb (Figure 11C), et au sein des hotspots certaines zones concentrent plus de Spo11-oligos que d'autres (Pan et al., 2011). Ainsi dans la Figure 11A, deux zones de cassures sont détectées au sein du hotspot *CYS3*, témoignant de l'existence de régions préférentielles de coupure au sein des hotspots. Aucune séquence consensus n'a été identifiée, mais un biais des bases qui composent cette zone a été mis en évidence (Gerton et al., 2000; Pan et al., 2011). Dès 2000, Gerton *et al.* réalisent une première carte des DSBs dans un fond génétique *rad50S* par CHIP suivi d'un génotypage par puce à ADN (CHIP-chip) et notent un enrichissement local en bases GC aux sites de coupures (Gerton et al., 2000). De même, Pan *et al.* observent une corrélation entre la fréquence de cassure et l'enrichissement local en GC sur une fenêtre de 5 à 20kb, bien que les promoteurs soient des régions riches en AT (Pan et al., 2011). Ce biais sera présenté plus en détail en 1.2 Spo11 et la machinerie de formation de cassures.

En outre, les régions promotrices de gènes sont enrichies en marques épigénétiques qui influencent la formation des DSBs. La tri-méthylation des Lysines 4 de l'histone 3 (H3K4me3) est une marque retrouvée notamment sur les premiers nucléosomes des ORFs (« open reading frame » ou « cadre de lecture ouvert ») adjacents aux hotspots (Bernstein et al., 2005; Pokholok et al., 2005), et dont la présence est corrélée à la formation de DSBs chez *S. cerevisiae* (Borde et al., 2009). Cette marque est déposée par le complexe Set1 (ou COMPASS) (Briggs et al., 2001; Roguev et al., 2001) en amont de la formation des cassures. Le complexe Set1 est associée à l'ARN polymérase II et mono-, di- ou tri-méthyle H3K4 au cours de la transcription (Pokholok et al., 2005). La tri-méthylation est retrouvée principalement en 5' des ORFs, la di-méthylation dans le corps de l'ORF tandis que la mono-méthylation se concentre en 3' du gène (Pokholok et al., 2005). En absence de Set1, la formation des DSBs est réduite mais non abolie (Sollier et al., 2004), suggérant que la tri-méthylation de H3K4 n'est pas essentielle à la formation de DSBs.

Chez les mammifères, la formation des DSBs est guidée par une protéine à spécificité de séquence : PRDM9 (Baudat et al., 2010; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010). Cette protéine possède une activité méthyltransférase ainsi qu'un domaine à « doigts de zinc » qui permet la reconnaissance de séquences spécifiques de l'ADN.

La protéine cible des séquences consensus *via* son domaine à doigts de zinc, et guide la formation des DSBs, notamment en apposant la marque H3K4me3 sur les nucléosomes à proximité (Baudat et al., 2010; Hayashi et al., 2005; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010). Il est à noter que la séquence du gène *PRDM9* connaît une évolution rapide, notamment la région codant pour les domaines à doigt de zinc, ceux-ci étant codés par des séquences « mini-satellites » (Oliver et al., 2009; Thomas et al., 2009). Cette particularité a mené à une diversification des allèles codants pour *PRDM9* et des séquences reconnues et ciblées par la protéine. Ainsi, la distribution des DSBs et les profils de recombinaison associés varient considérablement entre espèces et même entre individus de la même espèce (Baudat et al., 2010; Berg et al., 2010; Myers et al., 2010; Parvanov et al., 2010). De façon remarquable, dans les souris *PRDM9*^{-/-}, les DSBs sont formées dans les régions promotrices de gènes enrichies en marque H3K4me3, à l'instar de *S. cerevisiae* (Brick et al., 2012). De la même manière, chez le chien et les oiseaux, qui ont perdu *PRDM9* au cours de leur histoire évolutive, les points chauds de cassures correspondent principalement aux promoteurs de gènes (Auton et al., 2013). Le mode d'action de *PRDM9* apparaît donc comme un mécanisme actif dominant permettant de guider la formation des DSBs en méiose dans certaines espèces, mais l'avantage de ce mode de détermination des hotspots reste encore peu compris.

1.2 Spo11 et la machinerie de formation de cassures

La formation de DSB est un processus induit par le programme méiotique. La communauté scientifique s'intéresse à cette étape cruciale depuis des décennies et les travaux de recherche ont permis d'identifier les protéines impliquées dans ce processus et de mieux comprendre le mécanisme de formation des DSBs, bien qu'il reste encore aujourd'hui de nombreuses inconnues. Les cassures méiotiques sont générées par une machinerie protéique, dont l'activité catalytique repose sur la protéine Spo11.

La protéine Spo11 joue un rôle essentiel dans la formation des DSBs. Son gène *SPO11* est identifié en 1969 lors d'un crible génétique visant à identifier des gènes impliqués dans le processus de sporulation (Esposito and Esposito, 1969) et son implication dans la recombinaison méiotique à l'origine du défaut de sporulation est exposée dès 1985 par l'étude du mutant *spo11-1*, un allèle thermosensible de Spo11 (Klapholz et al., 1985). Par la suite, l'observation de DSBs par Southern Blot dans un mutant *spo11Δ* révèle un défaut de formation des cassures indiquant un rôle de la protéine dans la génération des DSBs (Cao et al., 1990). Des études menées en 1995 démontrent que les extrémités des DSBs sont « modifiées » et proposent que la formation des DSBs génère des intermédiaires ADN-protéines liés de manière

covalente (Keeney and Kleckner, 1995; Liu et al., 1995; de Massy et al., 1995). C'est en 1997 que Spo11 est identifiée comme responsable de la formation des DSBs et que son mécanisme d'action est mis en évidence (Bergerat et al., 1997; Keeney et al., 1997). Spo11 est une protéine apparentée à la famille des topoisomérases de type II, et plus précisément à la sous-unité A de TopoVI, une topoisomérase retrouvée chez les archées (Bergerat et al., 1997).

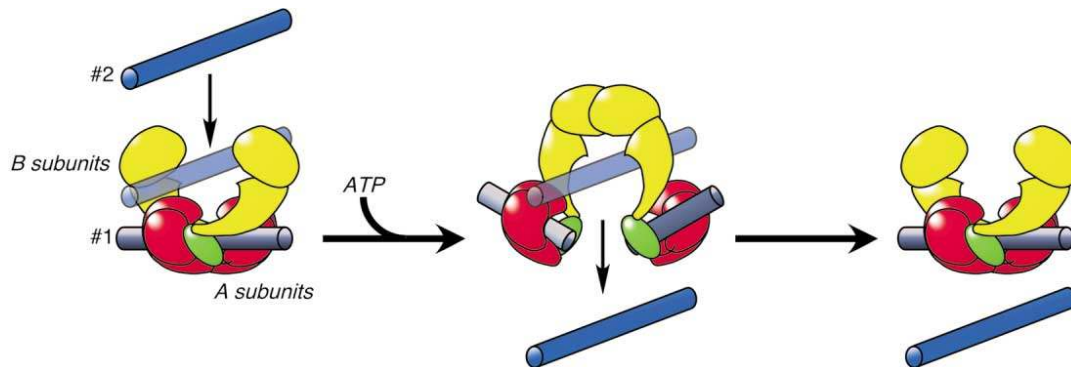


Figure 12 : Fonctionnement des topoisomérases de type II

Schématisation du fonctionnement des topoisomérases de type II. Etape 1 : le segment d'ADN #1 (gris) est lié aux sous-unités TopoVIA. Etape 2 : le segment d'ADN #2 est piégé par l'enzyme après assemblage des deux sous-unités TopoVIB. De manière concomitante, le segment #1 est clivé et ouvert, permettant le passage du segment #2 au travers. Etape 3 : le segment #1 est religué et relâché.

La sous unité A est en rouge (domaine toprim) et verte (domaine CAP-like). La sous unité B est en jaune.

De Corbett et Berger (Corbett and Berger, 2003).

Les topoisomérases sont des enzymes essentielles à la gestion de la topologie de l'ADN et résolvent notamment les états de super-enroulements de l'ADN. Les topoisomérases de type II génèrent des DSBs et jouent un rôle majeur dans la décaténation de l'ADN (Wendorff and Berger, 2018). Le fonctionnement de TopoVI repose sur ses deux sous-unités TopoVIA et TopoVIB, où TopoVIA porte l'activité endonucléolytique et reste attachée de manière covalente à l'ADN après clivage, tandis que TopoVIB porte l'activité ATPase essentielle à la dimérisation de TopoVI (Figure 12). Après décaténation de l'ADN, la molécule d'ADN coupée est religuée directement par la topoisomérase (Wendorff and Berger, 2018). De manière analogue, la protéine Spo11 peut cliver l'ADN par une réaction de transestérification, liant la Tyrosine 135 de son site catalytique à l'ADN, et ce de manière covalente (Keeney et al., 1997). Cependant, contrairement aux topoisomérases, Spo11 est incapable de réaliser la religature de l'ADN, et son éviction de l'ADN dépend entièrement des étapes de

résection de la cassure (Neale et al., 2005). La protéine Spo11 agit sous la forme d'un dimère à l'image des deux sous-unités TopoVIA qui agissent de concert pour former une DSB (Sasanuma et al., 2007). Cependant, si l'homologie entre Spo11 et la sous-unité TopoVIA a été établie, l'homologue de la sous-unité TopoVIB est resté méconnu pendant de nombreuses années. Ce n'est qu'en 2016 qu'est identifié un analogue de la sous-unité B chez *Arabidopsis thaliana* par Vrielynck *et al.* et chez la souris par Robert *et al.* (Robert et al.; Vrielynck et al., 2016). Par une approche « phylo-génomique » (basée sur des recherches de similarités de structures et de séquences), Robert *et al.* établissent un lien phylogénétique entre la TopoVIB murine et la protéine Rec102 chez *S. cerevisiae*, dont l'implication dans la formation des DSBs était connue, mais le rôle incompris.

De manière intéressante, aucune séquence consensus n'a été mise en évidence au sein des hotspots de cassures chez *S. cerevisiae* ou chez d'autres espèces (*cf.* Point chaud de cassures ou « Hotspot »). Cependant en 2009, Murakami et Nicolas démontrent que les cassures sont formées dans des « fenêtres ciblées » au sein des hotspots, et proposent que la protéine Spo11 ait des préférences de séquences (Murakami and Nicolas, 2009). Par l'analyse fine des Spo11-oligos, Pan *et al.* observent une préférence de coupure sur les petits sillons de la double hélice, et préférentiellement en 3' d'un C (Pan *et al.*, 2011). De plus, les auteurs observent un enrichissement en G sur la troisième base des Spo11-oligos (Pan et al., 2011).

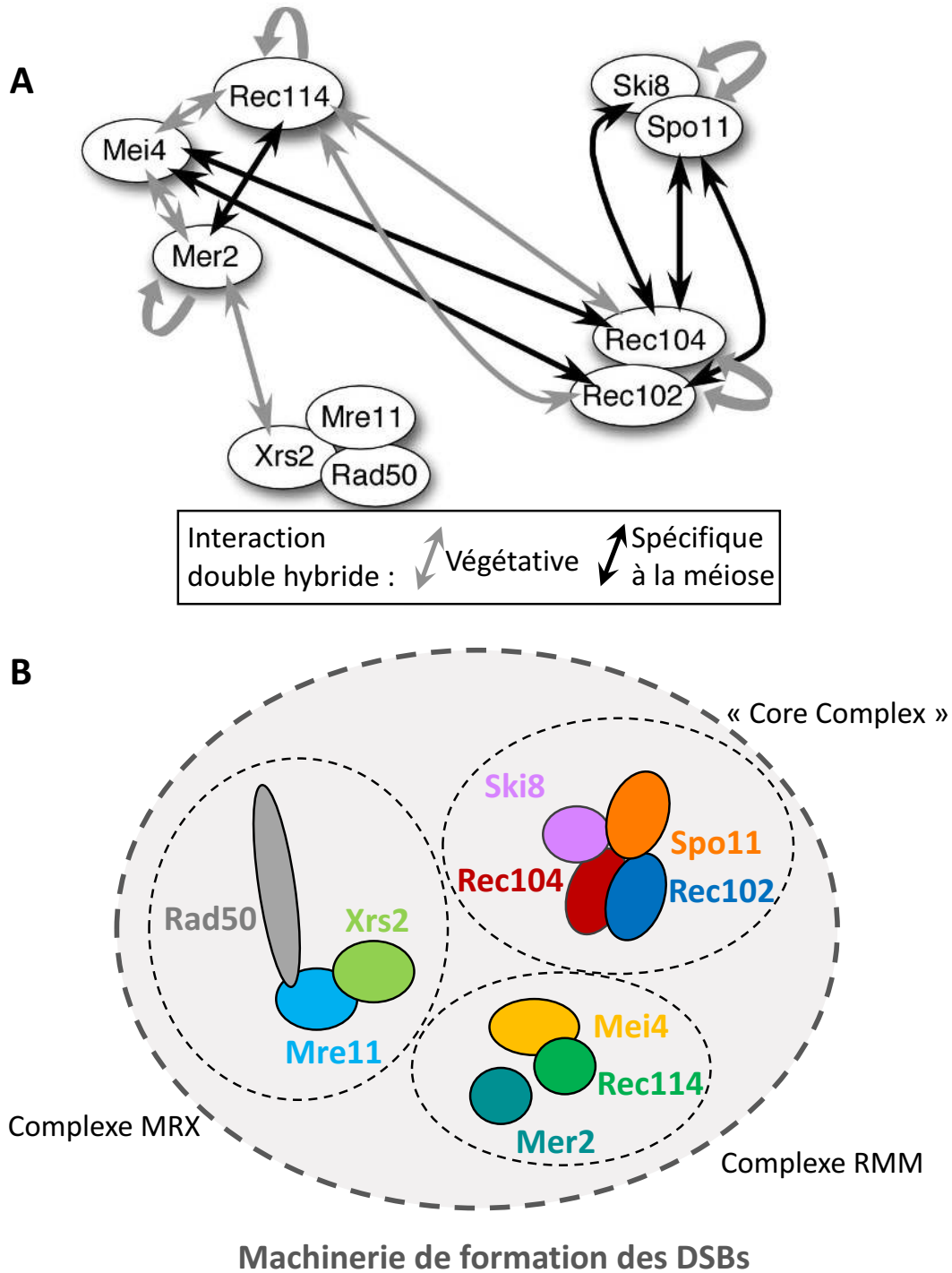


Figure 13 : Protéines essentielles à la formation des cassures

(A) Représentation des interactions connues entre les protéines requises pour la formation des DSBs. Les interactions représentées par des flèches représentent les interactions obtenues par test « double hybride », en cellule végétative ou en méiose. Adapté de Maleki *et al.* (Maleki *et al.*, 2007)

(B) Représentation de la machinerie de formation des DSBs méiotique. Trois complexes constituent cette machinerie : le « core complex », le complexe RMM et le complexe MRX. L'articulation et l'assemblage des différents complexes ensemble n'est pour l'instant pas connu, bien que toutes ces protéines soient essentielles à la formation des DSBs

Si Spo11 est essentielle à la formation des DSBs, la protéine seule n'est pas suffisante. Chez *S. cerevisiae*, la formation des DSBs dépend de trois complexes, regroupant dix protéines au total : le « core complex » composé de Spo11, Rec102, Rec104 et Ski8 ; le complexe RMM composé de Rec114, Mei4 et Mer2 ; et enfin le complexe MRX, pour Mre11-Rad50-Xrs2 (Figure 13B). Toutes ces protéines sont essentielles à la formation des DSBs, et leur absence abolit les événements de HR et d'appariement des chromosomes homologues chez *S. cerevisiae*. Les orthologues de ces protéines ont été retrouvés chez la majorité des espèces de la levure à l'humain (Tableau 2). Cependant, toutes ne jouent pas un rôle dans la formation des DSBs chez certaines espèces.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>	<i>M. musculus</i>	<i>A. thaliana</i>
Spo11	Rec12	SPO11	SPO11-1, SPO11-2, SPO11-3
Rec102	Rec6	TOP6BL	MTOPVIB
Rec104	-	-	-
Ski8	Rec14	WDR61	SKI8/VIP3
Mer2	Rec15	IHO1	AtPRD3
Mei4	Rec24	MEI4	PRD2
Rec114	Rec7	REC114	PHS1
Mre11	Rad32	MRE11 ⁿ	MRE11
Rad50	Rad50	RAD50 ⁿ	RAD50
Xrs2	Nbs1	NBS1 ⁿ	-

Tableau 2 : Conservation des protéines essentielles à la formation des DSBs de *S. cerevisiae*

Gris : non requis pour la formation des DSBs
n : Role dans la formation des DSBs non testé
(Kariyazono et al., 2019; Lam and Keeney, 2015)

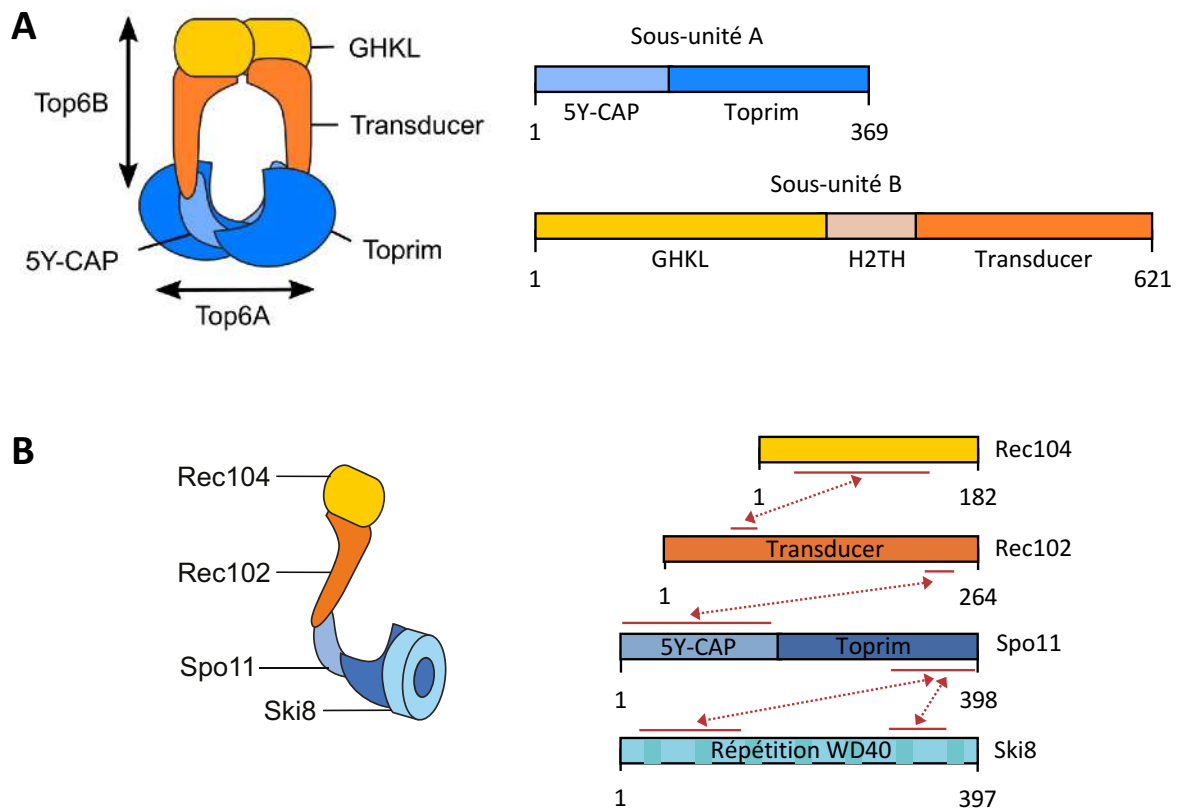


Figure 14 : Présentation de TopoVI et du complexe Spo11

(A) Schématisation de la topoisomérase VI composé des sous unités A et B. La sous unité A porte le domaine catalytique 5Y-CAP. La sous-unité B porte les domaines GHKL et le domaine « transducer ».

(B) Schématisation du complexe « core » ou complexe Spo11. Le code couleur permet de visualiser les analogies entre les domaines de TopoVI et les protéines du complexe Spo11. Les traits pleins et traits pointillés rouges indiquent les zones d'interaction entre les protéines du complexe.

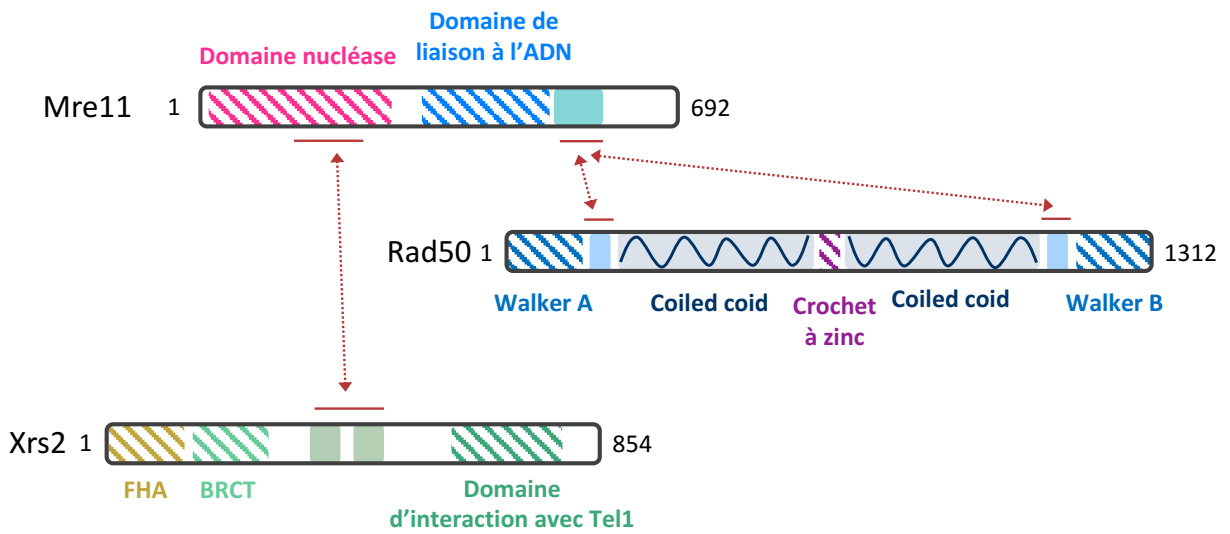
Adapté de Yadav et Bouuaert (Yadav and Claeys Bouuaert, 2021).

Le « core complex » ou complexe Spo11

Chez *S. cerevisiae*, Spo11 est retrouvée fortement associée aux protéines Rec102, Rec104 et Ski8, en test double hybride ou par purification du complexe (Figure 13A) (Arora et al., 2004; Claeys Bouuaert et al., 2021a). Les protéines Rec102 et Rec104 interagissent en méiose et sont retrouvées ensemble par co-immunoprécipitation (Jiao et al., 2003). Celles-ci sont requises pour la dimérisation de Spo11, sa fixation à la chromatine et sa localisation aux points chauds de cassures (Prieler, 2005; Sasanuma et al., 2007). La protéine Ski8, qui est impliquée dans le métabolisme de l'ARN en cycle mitotique (Masison et al., 1995), se relocalise dans le noyau en méiose où elle interagit avec Spo11 et Rec102-Rec104 et participe à la formation des DSBs (Arora et al., 2004).

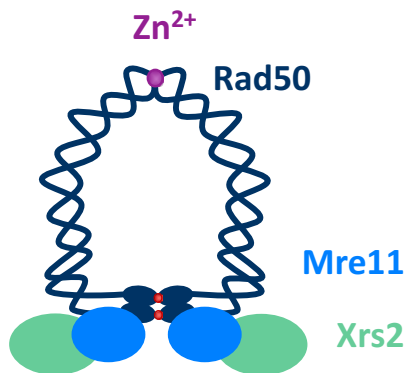
L'association de ces protéines a été désignée comme le « core complex » ou complexe Spo11 (Claeys Bouuaert et al., 2021a). Comme mentionnée précédemment, il a été proposé que Rec102 puisse correspondre à la sous-unité TopoVIB, et qu'en association avec Spo11 elles forment un complexe « TopoVI-like » (TOPOVIL) (Robert et al.). Cependant, la modélisation structurelle de Rec102 révèle que la protéine ne possède pas de domaine « GHKL » qui porte l'activité ATPase, essentiel à la dimérisation de TopoVI (Robert et al., 2016; Vrielynck et al., 2016). Récemment, Bouuaert *et al.* ont proposé que Rec104 puisse correspondre au domaine « GHKL » : après fixation par agent chimique du complexe (« cross-link ») et spectrométrie de masse, les auteurs démontrent que Rec104 est fortement associée à la partie N-terminale de Rec102, ce qui correspond au positionnement du domaine « GHKL » de TopoVIB (Claeys Bouuaert et al., 2021a). Ainsi, si Spo11 correspond à la sous-unité A de TopoVI, Rec102 jouerait le rôle du domaine « transducer » de la sous-unité B et Rec104 celui du domaine « GHKL » essentiel à la dimérisation du complexe, bien que sa fonction de re-ligation des extrémités ne soit pas retrouvée chez Rec104 (Figure 14) (Claeys Bouuaert et al., 2021a). Bien que le rôle exact de Ski8 reste à être élucidé, celle-ci est retrouvée associée de manière stœchiométrique 1:1:1:1 à Spo11-Rec102-Rec104, et les auteurs proposent que l'association de ces quatre protéines forme le complexe TopoVIL (Figure 14) (Claeys Bouuaert et al., 2021a). Le mécanisme de dimérisation du complexe en un hétérooctamère (Spo11₂Rec102₂Rec104₂Ski8₂) essentiel au clivage double-brin de l'ADN est à ce jour inconnu, bien que celle-ci puisse dépendre de Rec114, membre du complexe RMM, également essentiel à la dimérisation de Spo11 (Sasanuma et al., 2007).

A



B

Configuration fermée



Configuration ouverte

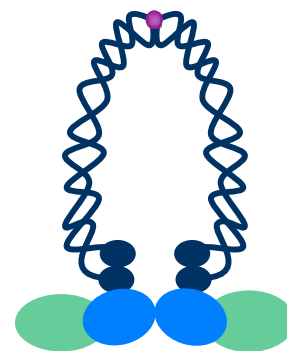


Figure 15 : Le complexe MRX

(A) Représentation des domaines principaux de Mre11, Rad50 et Xrs2. Les régions d'interaction entre les protéines sont indiquées par des traits rouges.

(B) Illustration du complexe MRX selon ses deux configurations possibles. En configuration fermée, les domaines globulaires Walker A et B de Rad50 fixent l'ATP et Mre11 n'a pas accès à l'ADN. Le complexe adopte une configuration ouverte après hydrolyse de l'ATP par Rad50, et Mre11 peut accéder à l'ADN.

Le complexe RMM

Les protéines Mer2, Mei4 et Rec114 ont été identifiées au cours de différents cribles génétiques visant à identifier des gènes impliqués dans la HR (Ajimura et al., 1993; Engebrecht et al., 1990; Malone et al., 1991; Menees and Roeder, 1989) et leur absence abolit la formation de DSBs (Jiao et al., 1999; Keeney et al., 1997; Rockmill et al., 1995). En se basant sur des données de co-immunoprécipitation et de co-localisation par microscopie à fluorescence, Li *et al.* proposent que les trois protéines forment un complexe (Li et al., 2006). Récemment, une purification du complexe par chromatographie à exclusion stérique (SEC-MALS) et une analyse par spectrométrie de masse ont permis de montrer que la protéine Rec114 forme un complexe de stœchiométrie 2:1 avec la protéine Mei4 en association avec un homotétramère de Mer2 (Claeys Bouuaert et al., 2021b).

L'expression de Rec114 et Mei4 est spécifique à la méiose, tandis que le transcrit *MER2* est exprimé de manière constitutive, mais contient un intron spécifiquement épissé en méiose (Engebrecht et al., 1991; Nandabalan and Roeder, 1995). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) démontrent que le complexe RMM se positionne sur l'axe (Panizza et al., 2011). En absence de Mer2, Rec114 et Mei4 ne sont plus retrouvées sur la chromatine (Panizza et al., 2011) et il a été proposé que Mer2 amorce le recrutement de la machinerie de formation de cassures (Murakami et al., 2003). Ce mécanisme de recrutement sera abordé dans le Chapitre II : Régulation des DSBs et Interférence.

Le complexe MRX

Le complexe MRX ou MRN, pour Mre11-Rad50-Xrs2/Nbs1, est un élément clé dans la maintenance de l'intégrité génomique *via* sa reconnaissance des DSBs, son rôle dans leur réparation, sa participation aux checkpoints cellulaires ou encore son rôle aux télomères (Haber, 1998; Johzuka and Ogawa, 1995; Ritchie and Petes, 2000; Usui et al., 1998). MRX joue un rôle essentiel dans la résection des DSBs méiotiques comme mitotiques, une étape clé de la HR, *via* ses activités endo- et exonucléases (Casari et al., 2019). Son rôle dans la résection sera abordé plus en détail en 2.1 Maturation des cassures double-brin. Chez *S. cerevisiae*, MRX est essentiel à la formation des DSBs méiotiques (Johzuka and Ogawa, 1995). Contrairement à son rôle dans la réparation des DSBs qui est conservé dans tous les organismes, son implication dans la formation des DSBs méiotiques est peu conservée. Ainsi, MRX est essentiel à la formation des DSBs méiotiques chez *S. cerevisiae* et *C. elegans* (Chin and Villeneuve, 2001), mais pas chez *A. thaliana* ou encore *S. pombe* (Puizina et al., 2004; Young et al., 2004) et son rôle dans ce processus reste à être démontré chez la souris (Lam and Keeney, 2015).

La protéine Mre11 porte les activités nucléases du complexe *via* son domaine nucléase et possède un domaine de liaison à l'ADN (Figure 15A). L'activité nucléase de Mre11 n'est pas impliquée dans la formation des DSBs, puisque les mutants *mre11-D16A*, *mre11-D56N* et *mre11-H125N*, sans activité nucléase, sont toujours aptes à former des cassures (Haber, 1998). Cependant son domaine de fixation à l'ADN semble important pour la formation des DSBs puisqu'une version tronquée en carboxy-terminal de la protéine conduit à la production de spores non viables, tandis que les fonctions mitotiques de la protéine ne sont pas affectées (Furuse et al., 1998; Usui et al., 1998). Mre11 est retrouvée associée aux hotspots de cassure en amont de leur formation (Borde et al., 2004), et semble jouer un rôle dans leur structure chromatinienne. En effet, des traitements à la MNase montrent que l'accessibilité aux sites de cassures augmente en amont de la formation des DSBs (Ohta et al., 1994). En absence de Mre11, les sites de cassures sont moins sensibles à la MNase (Ohta et al., 1998), suggérant un rôle de Mre11 dans l'ouverture de la chromatine.

La protéine Rad50 est une ATPase, composée de deux motifs « Walker » A et B en N et C-terminal, séparés par un domaine « coiled-coil » qui permet le repliement de la protéine sur elle-même et la formation d'un domaine « zinc-hook » (« crochet de zinc ») (Hopfner et al., 2001) (Figure 15A). L'activité ATPase de Rad50 permet de moduler la configuration du complexe : en présence d'ATP, le complexe adopte une configuration dite « fermée » où Mre11 ne peut pas accéder à l'ADN (Casari et al., 2019; Tisi et al., 2020) (Figure 15B). L'hydrolyse de l'ATP permet « l'ouverture » du complexe et donne à Mre11 l'accès à l'ADN (Casari et al., 2019; Tisi et al., 2020) (Figure 15B). Le rôle de Rad50 dans la formation des DSBs reste peu compris. La protéine a été identifiée comme essentielle à la formation des DSBs (Johzuka and Ogawa, 1995), et si en son absence Mre11 ne s'associe pas aux sites de cassures, l'interaction entre Mre11 et Rad50 ne semble pas requise pour la localisation de Mre11 (Borde et al 2004). Il a ainsi été proposé que la formation du complexe MRX n'est pas requis pour la formation des DSBs (Usui et al., 1998). Enfin, le domaine de fixation à l'ADN de Rad50 et son crochet de zinc apparaissent essentiel à la formation des DSBs (Alani et al., 1990; Wiltzius et al., 2005).

La protéine Xrs2, orthologue de la protéine NBS1 chez d'autres espèces, vient compléter ce complexe. Xrs2 s'apparente à une protéine plateforme puisqu'elle possède différents domaines d'interaction avec d'autres protéines (Figure 15A). Xrs2 porte une séquence de localisation nucléaire (NLS) qui est essentielle à la localisation de la protéine Mre11 dans le noyau (Tsukamoto et al., 2005). En contexte *xrs2Δ*, la fusion de la séquence NLS à Mre11 (Mre11-NLS) restaure en partie les activités du complexe (Oh et al., 2016). Notamment, les défauts de sporulation du mutant *xrs2Δ*

sont partiellement restaurés, et les spores présentent un taux de viabilité de 70%, signifiant que les activités de formation et de réparation des DSBs de Mre11 sont fonctionnelle en absence de Xrs2 (Oh et al., 2016). Xrs2 n'est pas essentielle à l'activité de résection du complexe, mais la protéine est indispensable au mécanisme de réparation par NHEJ et au recrutement de Tel1 aux télomères raccourcis et aux sites de cassure HO en cycle végétatif (Nakada, 2003; Oh et al., 2016) (*cf.* Chapitre III : Tel1/ATM). Enfin, des données de CHIP ont permis de démontrer que le recrutement de Mre11 aux hotspots dépend de Xrs2 mais pas de Rad50 (Borde et al., 2004), bien que Rad50 soit requise pour la formation des DSBs (Johzuka and Ogawa, 1995). Xrs2 montre une interaction avec Mer2 par test double-hybride (Arora et al., 2004; Henderson et al., 2006) et il a été proposé que cette interaction puisse permettre l'association du complexe MRX à la machinerie de formations de DSBs. Néanmoins, l'orthologue de Xrs2 chez *C. elegans*, NBS-1, n'est pas requis pour la formation des DSBs, contrairement à MRE-11 et RAD-50 (Chin and Villeneuve, 2001; Girard et al., 2018; Hayashi et al., 2007). Le rôle de Xrs2 dans la formation des DSBs chez *S. cerevisiae* reste donc à être exploré. De plus, le rôle de MRX au sein de la machinerie de formation de DSBs est encore peu compris et demande à être éclairci.

1.3 Formation de cassures dans le contexte « axe-boucle »

Le processus de formation des DSBs s'opère dans le contexte architectural axe-boucle, présenté précédemment. En 2002, Blat *et al.* étudient l'enrichissement des protéines de l'axe Rec8 et Red1 sur le génome par CHIP et le comparent à la carte des DSBs du chromosome III réalisée *via* électrophorèse à champ pulsé par Baudat et Nicolas en 1997 (Baudat and Nicolas, 1997; Blat et al., 2002). Ils démontrent ainsi une anti-corrélation entre les sites de DSBs et les sites d'enrichissement des protéines de l'axe et proposent que les DSBs soient principalement formées sur les boucles de chromatine (Blat et al., 2002). De plus, un CHIP de Spo11 sans « cross-link » des protéines à l'ADN dans un fond génétique *rad50S*, où seule Spo11 liée de manière covalente à l'ADN après génération de cassures est détectée, montre que l'enrichissement de la protéine est anti-corrélé à celui de Rec8 (Kugou et al., 2009), renforçant l'idée que les DSBs sont formées sur les boucles d'ADN et non sur l'axe. Plus tard, l'amélioration des techniques de détection des DSBs méiotiques a permis d'explorer cette hypothèse à l'échelle du génome. En 2011, Pan *et al.* réalisent une carte des sites de cassures à l'échelle du génome par immunoprécipitation et séquençage des Spo11-oligos et montrent une anti-corrélation entre les sites d'enrichissement de Rec8 et les pics de cassures (Pan et al., 2011). Il est donc communément admis que les DSBs se forment principalement dans les boucles d'ADN.

De manière contre-intuitive, alors que les DSBs sont formées dans les boucles, la majorité des protéines essentielles à la formation des DSBs sont localisées sur l'axe. Par ChIP, avec « cross-link », il est démontré qu'une partie des sites d'enrichissement de Spo11 corrèle avec les sites d'enrichissement de Rec8 (Kugou et al., 2009). Par la suite, il est démontré que les sites d'enrichissement des protéines du complexe RMM correspondent aux sites d'enrichissement de Red1, Hop1 et Rec8 et qu'ils sont anti-corrélés aux pics de DSBs (Panizza et al., 2011). Les protéines Rec102 et Rec104 présentent également une préférence pour les sites de l'axe, bien que celle-ci soit moins marquée que pour le complexe RMM (Panizza et al., 2011). Au vu des dernières études sur le complexe Spo11-Rec102-Rec104-Ski8 (Claeys Bouuaert et al., 2021a), il peut être supposé que la protéine Ski8 se localise également sur l'axe, bien que cela reste à être démontré. Quant au complexe MRX, sa localisation à l'axe n'a pas été démontrée.

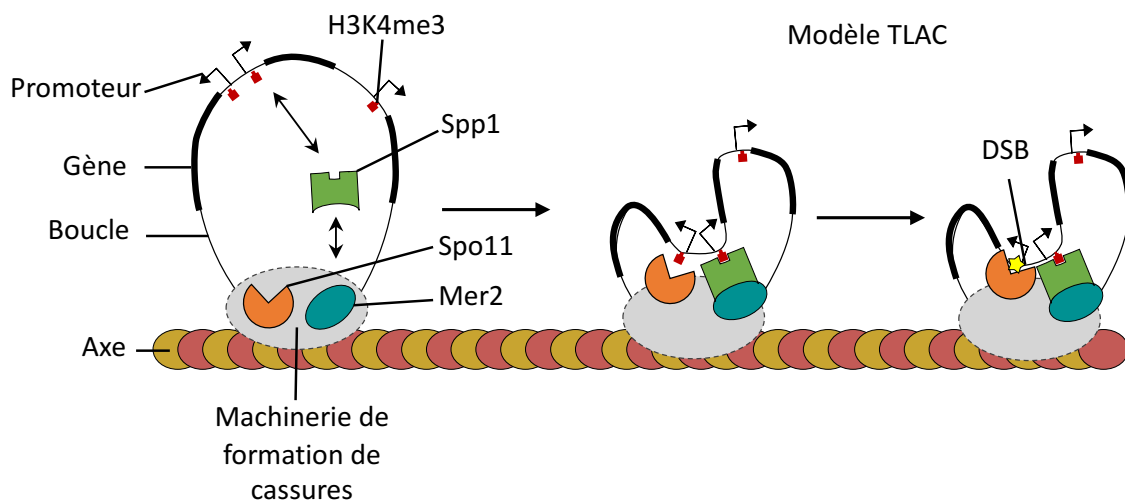


Figure 16 : Formation des DSBs dans le modèle axe-boucle

Représentation schématique du modèle axe-boucle ou « tethering loop-axis complex » (TLAC). La protéine Spp1 interagit avec la marque H3K4me3 déposé sur les premiers nucléosomes des ORFs *via* son domaine PHD et avec la protéine Mer2, qui fait partie de la machinerie de formation de coupure. Ce lien permet d'amener la boucle d'ADN près de l'axe où se trouve Spo11. Une fois à proximité, ce dernier peut cliver l'ADN. Adapté de Yadav et Bouuaert (Yadav and Claeys Bouuaert, 2021).

Il existe donc un découplage physique entre sites de cassures et localisation de la machinerie de formation de DSBs, ajoutant une inconnue sur le mécanisme de formation de cassure. Dès 2002, Blat *et al.* ont proposé l'existence d'un mécanisme de liaison des boucles à l'axe, ou « tethered loop-axis complex » (TLAC) (Blat et al., 2002). Initialement, ce modèle est proposé pour concilier les résultats obtenus par les auteurs, *i.e.* la formation des DSBs sur les boucles d'ADN, avec la HR qui se déroule au niveau de l'axe : les auteurs proposent qu'une boucle d'ADN soit amenée à proximité

de l'axe où elle est clivée et où la recombinaison avec le chromosome homologue peut avoir lieu au sein de « recombinosomes » (Blat et al., 2002). Ce concept est repris par la suite en 2013 par Acquaviva *et al.* et Sommermeyer *et al.* pour concilier la localisation des hotspots de cassures sur les boucles avec celle de la machinerie de formation de DSBs sur l'axe. Les auteurs de ces études identifient la protéine Spp1 comme médiateur de cette liaison boucle-axe (Acquaviva et al., 2013; Sommermeyer et al., 2013).

La protéine Spp1 fait partie du complexe Set1 et est essentielle à la triméthylation de H3K4 (Acquaviva et al., 2013) (*cf.* Point chaud de cassures ou « Hotspot »). Cette protéine possède un domaine PHD qui médie son interaction avec H3K4me3, et des mutations de ce domaine diminuent la formation de DSBs au sein des hotspots (Acquaviva et al., 2013; Sommermeyer et al., 2013). En absence de Spp1, les DSBs sont toujours formées mais principalement à proximité des sites de l'axe : les hotspots proches de l'axe habituellement peu coupés ont une fréquence de cassures plus élevée en absence de Spp1 (Adam et al., 2018; Sommermeyer et al., 2013). D'autre part, il est démontré par co-immunoprécipitation que Spp1 interagit avec Mer2 (Acquaviva et al., 2013; Sommermeyer et al., 2013), interaction médiée par le motif CXXC de Spp1. En absence de ce motif, Mer2 n'est plus retrouvé aux sites de cassures (Acquaviva et al., 2013), et l'abolition de l'interaction entre les deux protéines réduit la formation de DSBs (Acquaviva et al., 2013; Adam et al., 2018). De plus, les ChIPs de Mer2 et Spp1 montrent qu'elles co-localisent sur les régions de l'axe (Sommermeyer et al., 2013). Ces différents éléments ont mené à proposer le modèle suivant : Spp1 reconnaît et se lie à un hotspot *via* l'interaction entre son domaine PHD et H3K4me3, puis amène le site de cassure à proximité de l'axe *via* son interaction avec Mer2 ; ainsi, le site de cassure à proximité de la machinerie de formation de DSBs peut être clivé par Spo11 (Figure 16). En contexte *spp1Δ* ou *spp1-PHDΔ*, la liaison boucle-axe n'a pas lieu et seuls les hotspots les plus proches de l'axe sont coupés.

La structure axe-boucle joue un rôle central dans la formation des DSBs puisque la perte complète ou partielle de cette structure altère la formation des cassures. En absence de Rec8, la formation des boucles d'ADN est abolie (Schalbetter et al., 2019) mais les DSBs sont toujours formées bien que moins nombreuses (Kugou et al., 2009). Dans ce contexte, les protéines Red1-Hop1 sont toujours trouvées sur la chromatine, mais pas aux mêmes positions qu'en fond sauvage (Panizza et al., 2011). De manière remarquable, en absence de Rec8, les DSBs se forment aux sites d'enrichissement de Red1-Hop1 (Sun et al., 2015), soit à proximité de la machinerie de formation de

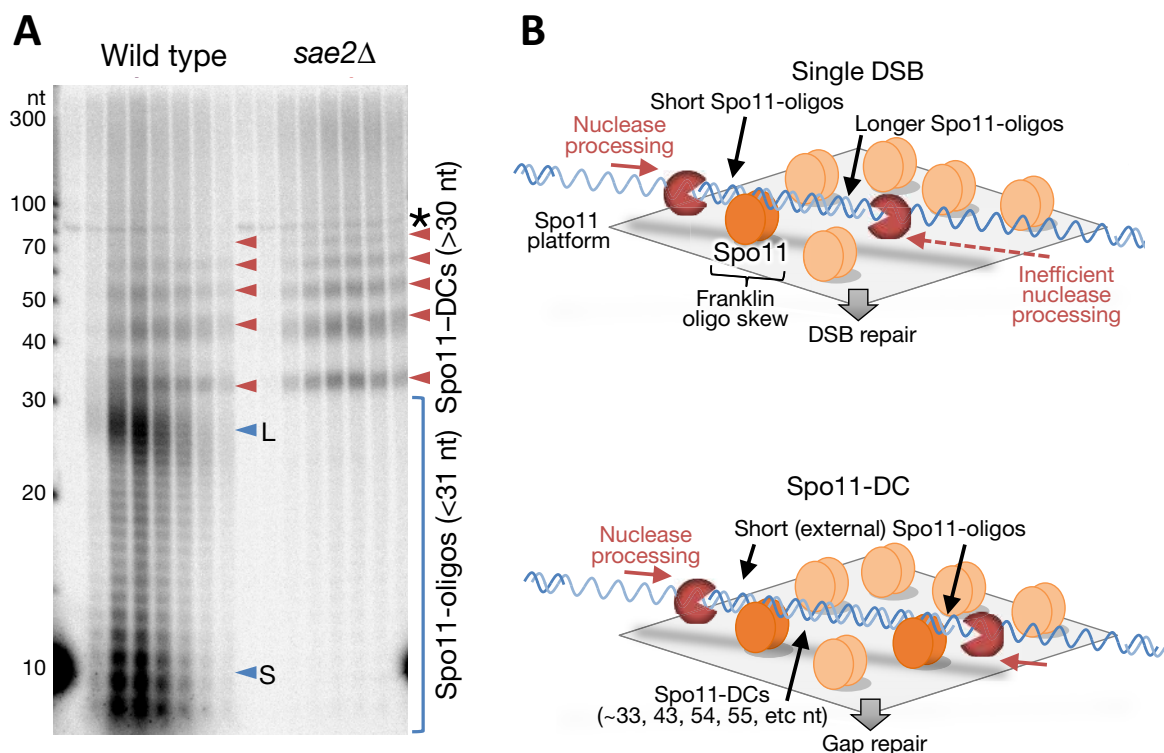


Figure 17 : Modèle de formation des doubles-cassures intra-hotspots

(A) Séparation sur gel à haute résolution (19% urée-PAGE) des Spo11-oligos radiomarqués après traitement à la protéinase K et TDP2 (Tyrosyl DNA phosphodiesterase 2) en contexte WT et *sae2Δ*.

(B) Schématisation du modèle proposé par Johnson *et al.* Les hotspots de cassures interagissent avec une surface composée de facteurs pro-DSBs sur lequel des dimères de Spo11 sont présents. Selon la position et l'orientation des dimères de Spo11, une ou plusieurs DSBs peuvent être générées lorsqu'une boucle est amenée à proximité de l'axe. La formation d'une simple cassure amène à la génération d'un Spo11-oligo « court » et un « long ». La formation d'une DC amène à la génération deux Spo11-oligos court et un long Spo11-DC. Adapté de Johnson *et al.* (Johnson et al., 2021)

cassure. En absence de Red1, l'effet sur la formation des DSBs est minime bien qu'il y ait une réduction de formation de DSBs, alors qu'en absence de Hop1 la formation des DSBs et la localisation de Rec114 sont fortement affectées (Sun et al., 2015).

1.4 Formation de multiples cassures au sein des hotspots

La carte des DSB méiotiques a été réalisée par le séquençage des Spo11-oligos (Pan et al., 2011) qui sont générés lors de la maturation des cassures (Neale et al., 2005) (*cf.* Maturation des cassures double-brin). L'analyse des Spo11-oligos sur gel à haute résolution a mis en évidence l'existence de deux populations majoritaires : l'une de ~8-12 nucléotides et l'autre de ~25-35 nucléotides (Neale et al., 2005).

Cependant, l'analyse sur gel à haute résolution des Spo11-oligos indique la présence de molécules de plus grande taille, jusqu'à 100nt (Figure 17A), dont la formation est indépendante de la machinerie de résection (Sae2, Mre11) (Figure 17A) (Johnson et al., 2021). Ainsi, les auteurs proposent que ces fragments correspondent à des événements de doubles cassures (DCs) formées sur la même molécule d'ADN, et plusieurs stratégies ont été utilisées pour explorer cette hypothèse. D'une part, Prieler *et al.* ont procédé à un traitement par l'exonucléase ExoV des immunoprécipitats de Spo11-oligos : ainsi l'ADN libre (non-couvert par Spo11) est digéré par la nucléase. Après traitement, des fragments d'ADN sont toujours retrouvés dans l'immunoprécipitat, indiquant la présence de fragments protégés de part et d'autre par Spo11 (Prieler et al., 2021). D'autre part, Johnson *et al.* observent le biais de coupure de Spo11 aux deux extrémités des fragments d'ADN (Johnson et al., 2021). Leurs observations ont permis de conclure que des DCs sont formées physiologiquement au sein des hotspots ainsi que dans les zones adjacentes (Johnson et al., 2021; Prieler et al., 2021). Ces fragments, nommés Spo11-DCs, sont de tailles variables supérieures à ~30 nucléotides, avec une périodicité de ~10,4pb (Johnson et al., 2021; Prieler et al., 2021), correspondant à un tour d'hélice d'ADN. Cette caractéristique corrèle avec la préférence de Spo11 de couper les petits sillons de l'ADN (Pan et al., 2011). Ainsi, Johnson *et al.* proposent un modèle dans lequel plusieurs dimères de Spo11 se positionneraient sur une plateforme (Figure 17B). Lorsque l'ADN d'une boucle est amené à l'axe, plusieurs Spo11 peuvent avoir l'occasion de couper la même molécule d'ADN si un petit sillon d'ADN, respectant le biais de coupure de Spo11, leur est présenté (Figure 17B) (Johnson et al., 2021). Ce modèle est appuyé par des travaux récents de Bouuaert *et al.* qui témoignent de l'existence de « condensats » de RMM (Claeys Bouuaert et al., 2021b). Les auteurs proposent que ceux-ci forment une plateforme sur laquelle plusieurs complexes Spo11 sont recrutés et peuvent cliver l'ADN (Claeys Bouuaert et al., 2021b).

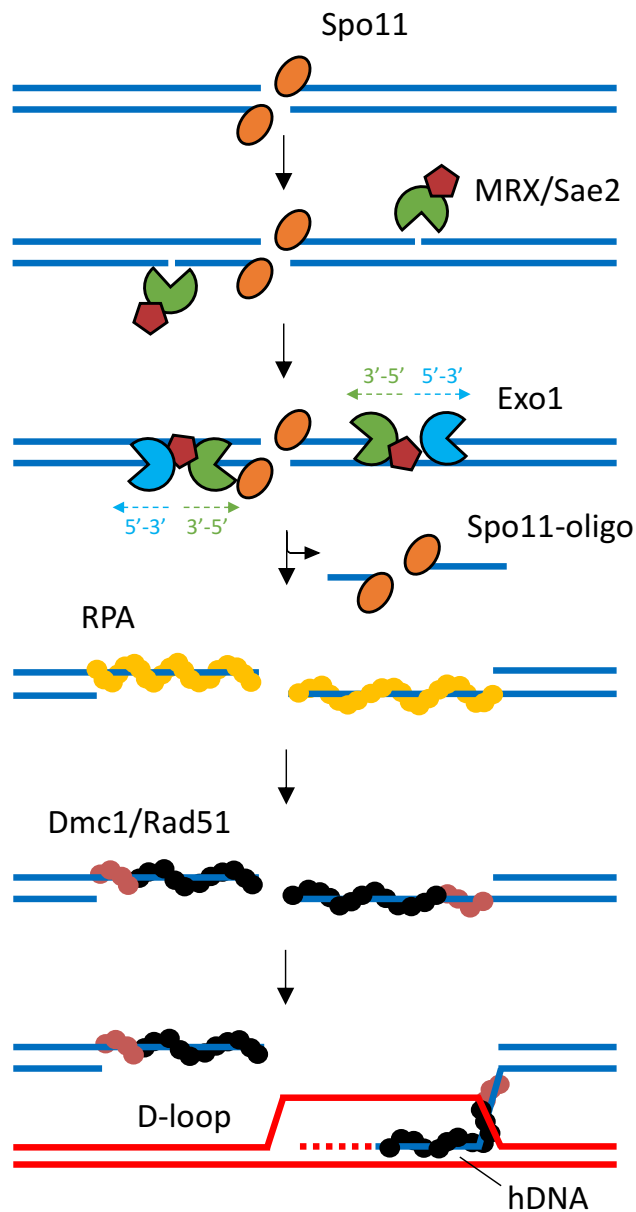


Figure 18 : Maturation des cassures double-brin et recherche d'homologie

Représentation schématique des étapes succédant la formation des DSBs par Spo11. MRX et Sae2 initient la résection *via* l'activité endonucléase de Mre11, tandis que son activité exonucléase permet la résection 3'→5' du brin coupé. Dans le même temps, la résection longue distance 5'→3' *via* la protéine Exo1 permet de former des extrémités 3' sortantes. La résection permet l'éviction de Spo11-oligos. L'ADN simple brin est recouvert par la protéine RPA, puis par les recombinaisons Dmc1/Rad51 qui permettent l'invasion d'une séquence d'ADN intacte. Cette étape amène à la formation d'une D-loop, un intermédiaire de recombinaison important pour les étapes suivantes.

2. Réparation des cassures double-brin et formation des « Crossovers »

La présence de DSBs est une menace pour l'intégrité du génome, et leur réparation est nécessaire. En méiose, les DSBs sont réparées par HR qui se déroule en trois étapes principales : (i) la résection de la cassure qui permet la formation de filaments simples brins (ii) l'invasion d'une séquence homologue intacte et la formation d'un intermédiaire de recombinaison et (iii) la résolution de l'intermédiaire de recombinaison menant à la formation de COs ou de NCOs.

2.1 Maturation des cassures double-brin

La réparation des cassures double-brin par recombinaison homologue repose sur la formation d'un filament d'ADN simple brin capable d'envahir une molécule d'ADN homologue pour en recopier la séquence. La formation d'ADN simple brin résulte de l'étape de maturation des cassures, en méiose comme en mitose. Cependant, les DSBs formées en méiose présentent une particularité par rapport aux DSBs trouvées en cycle végétatif : Spo11 reste attachée de manière covalente à l'ADN après clivage (Figure 18) (Keeney et al., 1997). Il est essentiel de retirer Spo11 pour réparer la cassure et cette étape est assurée par le complexe MRX et la protéine Sae2. La maturation est initiée par clivage endonucléolytique : Mre11 génère une cassure simple brin (Neale et al., 2005) jusqu'à 300 paires de bases de part et d'autre de la cassure initiale (Garcia et al., 2011) (Figure 18). L'activité endonucléolytique de Mre11 est stimulée par l'hydrolyse de l'ATP par Rad50 et la protéine Sae2 (Cannavo and Cejka, 2014; Cannavo et al., 2018). D'une part, l'activité de Rad50 est requise pour l'activité endonucléase de Mre11 puisque l'utilisation d'analogue non-hydrolysable d'ATP ou des mutants du domaine de fixation de l'ATP (Walker A, *rad50K40A*, *rad50K40R*) abolissent cette activité (Cannavo and Cejka, 2014; Chen et al., 2005). D'autre part, Sae2 est phosphorylée au cours du cycle cellulaire par la CDK Cdc28 (Huertas et al., 2008; Manfrini et al., 2010) et par les protéines kinase Tel1 et Mec1 en réponse aux dommages à l'ADN (Cartagena-Lirola et al., 2006). La phosphorylation de Sae2 en C-terminal est nécessaire à son interaction avec Rad50 (Cannavo et al., 2018) et il a été proposé que la forme phosphorylée de Sae2 stimule l'hydrolyse de l'ATP par Rad50 et donc l'activité nucléase de Mre11 (Casari et al., 2019). De plus, l'absence de Sae2 (*sae2Δ*) ou des mutations ponctuelles de Rad50 ou Mre11 (*rad50S*, *mre11S*) abolissent le clivage endonucléolytique des cassures. Récemment, il a été démontré que l'interaction Rad50-Sae2 est altérée par la mutation *rad50S*, suggérant que les défauts observés dans ce mutant résultent de la non-association de Sae2 au complexe MRX (Cannavo et al., 2018). Dans ces mutants, les DSBs s'accumulent sans être réparées et

activent le checkpoint méiotique dépendant de Tel1 (Usui et al., 2001) bloquant la progression méiotique (*cf.* Partie III : Les cassures double-brin méiotiques).

Après clivage endonucléolytique, l'activité exonucléase 3'→5' de Mre11 amorce une résection courte distance, du site de clivage endonucléolytique précédemment généré vers Spo11 (Figure 18) (Garcia et al., 2011). De manière concomitante, la résection longue distance est initiée par l'exonucléase 5'→3' Exo1 (Figure 18) (Tran et al., 2002; Zakharyevich et al., 2010). Les résections de MRX et Exo1 combinées permettent de générer un filament simple brin, nommé « extrémité 3' sortante », de ~800 nucléotides (Garcia et al., 2011; Zakharyevich et al., 2010).

Le corolaire de cette étape de résection est l'éviction de la protéine Spo11 de l'ADN (Figure 18) (Neale et al., 2005). Le clivage induit par Mre11 permet de libérer la protéine attachée à un petit fragment d'ADN simple brin. Ce complexe ADN-Spo11 est nommé « Spo11-oligo » et sa purification a notamment permis d'établir la cartographie des cassures doubles-brins méiotiques sur le génome (Pan et al., 2011). Pour chaque DSB formée, deux Spo11-oligos sont générés par la résection de la cassure, amenant à l'apparition de deux populations de Spo11-oligos sur gel à haute résolution (Neale et al., 2005). Récemment, il a été proposé que cette asymétrie provienne de contraintes induites par la plateforme de coupure formé par Spo11 et les condensats de RMM qui limitent la résection 3'→5' (Johnson et al., 2021).

2.2 Recherche d'homologie et biais vers l'homologue

L'ADN simple brin généré par la résection est immédiatement couvert par la protéine RPA, qui protège la molécule simple brin de dommages supplémentaires et prévient la formation de structures secondaires (Brown and Bishop, 2014; Raderschall et al., 1999). La protéine RPA est progressivement remplacée par deux recombinaisons : Rad51 et Dmc1 (Figure 18) (Bishop et al., 1992; Shinohara et al., 1992). Ce filament nucléoprotéique, qualifié de « recombiginique » ou de « présynaptique », va pouvoir chercher dans la chromatide sœur ou le chromosome homologue, une séquence d'ADN homologue intacte pour réaliser une synthèse d'ADN réparatrice. Ce sont les recombinaisons Rad51 et Dmc1 qui permettent l'invasion d'une autre molécule d'ADN et la recherche d'homologie. L'invasion d'une molécule d'ADN intacte par ce filament va entraîner l'ouverture de la double hélice et le déplacement du brin non complémentaire, formant une structure nommée « D-loop » (pour « displacement loop » ou boucle de déplacement en français) (Figure 18). L'association des deux brins d'ADN provenant de molécules différentes est nommée hétéroduplexe d'ADN (hDNA). La stabilisation du hDNA et de la D-loop dépend du niveau de polymorphisme entre les deux molécules d'ADN. Les fortes divergences de séquences sont reconnues par les

protéines de réparation des mésappariements (MMR, pour « Mismatch Repair ») qui recrutent l'hélicase Sgs1 pour dissocier les deux molécules d'ADN et limiter la réparation avec une séquence non homologue (Sugawara et al., 2004). Au contraire, si les deux séquences sont complémentaires, la protéine Dmc1 est retirée de l'ADN afin de procéder à la réparation de la cassure par synthèse d'ADN (Brown and Bishop, 2014).

Après réplication du génome, une DSB peut être réparée avec la chromatide sœur, parfaitement identique, ou le chromosome homologue, qui présente des polymorphismes. En méiose, un tropisme de « biais vers l'homologue » pousse les cassures à être réparées avec le chromosome homologue malgré les différences de séquences qui peuvent exister (Schwacha and Kleckner, 1997). Ce biais repose d'une part sur l'adaptation de la machinerie de recombinaison : Dmc1 est une protéine spécifique de la méiose, qui n'est pas exprimée au cours du cycle mitotique (Bishop et al., 1992). En mitose, seule la protéine Rad51 est chargée sur l'ADN, tandis qu'en méiose, un mélange de Rad51 et Dmc1 couvre l'ADN simple brin (Hinch et al., 2020). Dmc1 serait plus permissive que Rad51 sur l'homologie entre les séquences d'ADN, ce qui permettrait un appariement entre deux molécules présentant un léger polymorphisme (Lee et al., 2015). D'autre part, les composants de l'axe poussent à la recombinaison avec le chromosome homologue. En effet, il a été démontré que la protéine Hop1 est phosphorylée par les protéines kinase Tel1 et Mec1 en présence de DSBs, et cette phosphorylation induit la dimérisation et l'activation de la protéine kinase Mek1 qui se localise sur l'axe en méiose (Carballo et al., 2008; Niu et al., 2005). L'absence de Mek1 ou l'utilisation de formes non phosphorylable de Hop1 (*hop1^{SCD}*) abolit le biais vers l'homologue, et les DSBs sont réparées avec la chromatide sœur (Carballo et al., 2008; Niu et al., 2005). De plus, la dimérisation artificielle de Mek1 induit une augmentation du nombre d'évènements de recombinaison entre chromosomes homologues (Wu et al., 2010). Ainsi il a été proposé que l'activation de Mek1 participe à la régulation de checkpoints méiotiques et inhibe les mécanismes de recombinaison avec la chromatide sœur (Carballo et al., 2008; Niu et al., 2005; Wu et al., 2010).

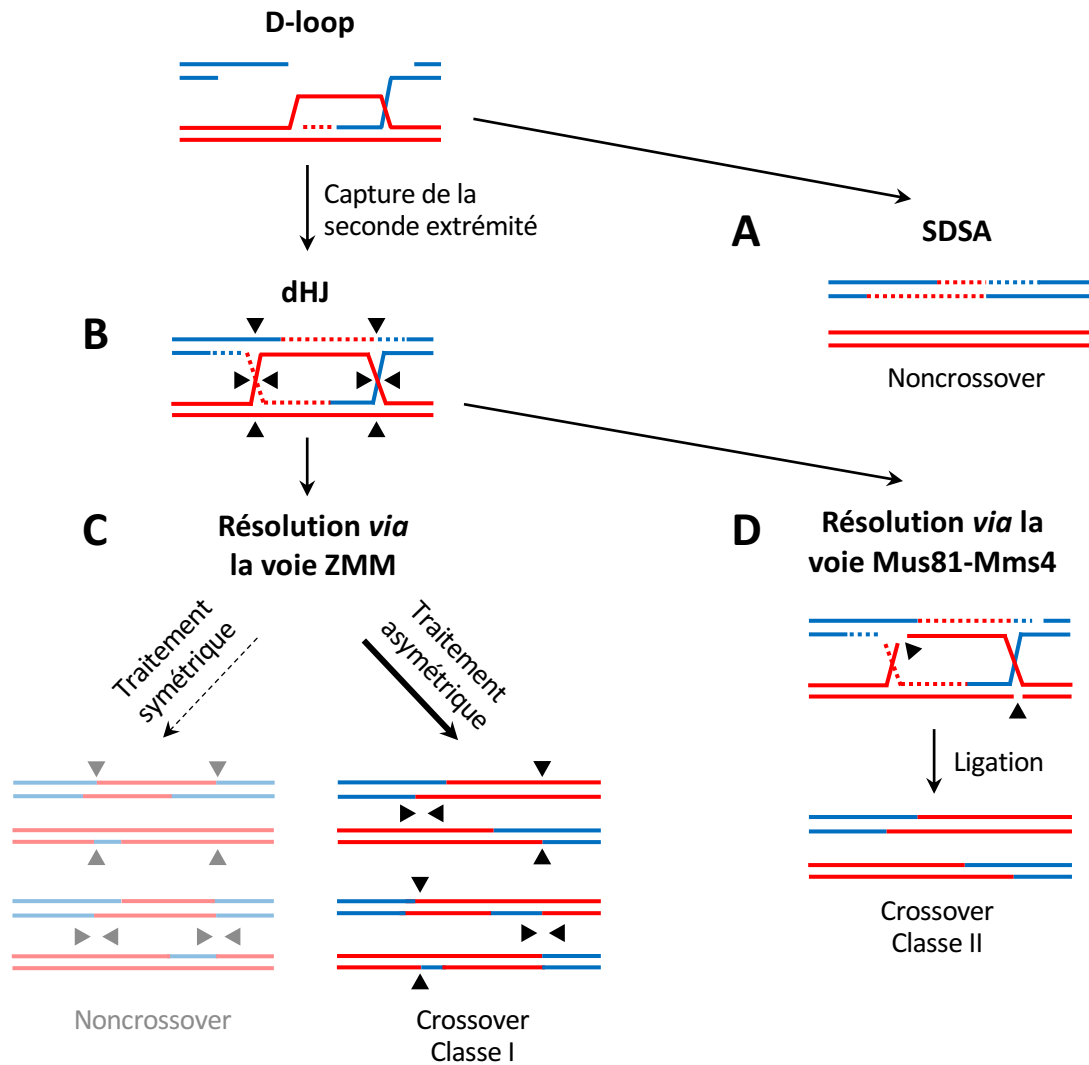


Figure 19 : Mécanismes de résolution des intermédiaires de recombinaison méiotiques

Les intermédiaires de recombinaison peuvent être résolus par différents mécanismes présentés ici. Les traits pleins représentent les molécules d'ADN initiale, bleu et rouge correspondant à deux molécules homologues. Les traits pointillés représentent l'ADN néosynthétisé.

En **(A)** le mécanisme de SDSA qui repose sur la dissolution de la D-loop par l'hélicase Sgs1, et mène à la formation de NCOs. La capture de la seconde extrémité par le brin déplacé de la D-loop mène à la formation de dHJ en **(B)**. Celles-ci peuvent être résolues par la voie ZMM **(C)** ou Mus81 – Mms4 **(D)**. ► représente les sites de coupures simple brins nécessaire à la résolution des dHJs. Quatre coupures simple brin sont réalisées, selon deux configurations possibles : asymétrique donnant lieu à des COs de classe I ou symétrique conduisant à la formation de NCOs. Cependant, cette voie favorise de manière importante le traitement asymétrique de la dHJ. Lors de la génération de CO de classe I, deux orientations sont possibles et c'est majoritairement celle du haut qui est privilégiée (Marsolier-Kergoat et al., 2018). Enfin, la résolution par endonucléases spécifiques de structures **(D)** peut amener à la formation de COs de classe II.

Adapté de Gray et Cohen (Gray and Cohen, 2016).

2.3 Formation des COs et NCOs

La dernière étape de la HR consiste en la résolution de l'intermédiaire de recombinaison qu'est la D-loop. La formation de la D-loop permet d'amorcer la synthèse du brin complémentaire à partir de l'extrémité 3' (Figure 19). À partir de cette étape, l'intermédiaire de recombinaison peut être pris en charge par trois voies majoritaires en méiose, aboutissant à la formation de COs ou de NCOs.

Un premier mécanisme simple consiste à désassembler la D-loop précédemment formée, nommé SDSA (pour « Synthesis-Dependent Strand Annealing »). Le désassemblage de la D-loop par des hélicases entraîne l'appariement de la molécule néosynthétisée à la molécule d'origine (McMahill et al., 2007). L'action de ligases permet de reconnecter le brin néosynthétisé à l'extrémité 5' libre, et le brin complémentaire est synthétisé, menant obligatoirement à la formation d'un NCO (Figure 19A).

La D-loop peut également être stabilisée *via* la capture de la seconde extrémité 3' sortante par le brin déplacé (Figure 19B). Cette étape entraîne la formation d'une double jonction de Holliday (dHJ) qui peut être prise en charge par deux voies de résolution : la voie ZMM ou la voie Mus81-Mms4 (Figure 19C, Figure 19D).

En méiose, les dHJs sont majoritairement résolues *via* la voie ZMM, qui fait intervenir les protéines Zip1, Zip2, Zip3, Zip4/Spo22, Mer2, Msh4, Msh5 et Spo16, celles-ci participant à la stabilisation de la D-loop (Gray and Cohen, 2016). La résolution de la dHJ est réalisée par l'endonucléase Mlh1-Mlh3 selon deux configurations possibles : les coupures peuvent être faites de manière asymétrique, conduisant à la formation de COs ; ou les coupures peuvent être faites de manière symétrique, conduisant à la formation de NCOs (Figure 19C). Cependant, la quasi-totalité (~85%) des dHJs prises en charge par la voie ZMM conduisent à la formation de COs, nommé CO de classe I (Figure 19C). L'analyse des hDNAs formés au cours de la réparation des DSBs permet d'observer ce biais : la perte de protéine du ZMM entraîne une augmentation du nombre de NCOs formés après résolution d'une dHJ (Marsolier-Kergoat et al., 2018), démontrant l'existence d'un biais de résolution au sein de la voie. Récemment, il a été démontré que ce biais agit sur les endonucléases Mlh1-Mlh3 en favorisant le traitement asymétrique de la dHJ (Cannavo et al., 2020). La formation de NCOs *via* la voie ZMM est donc possible mais très rarement observée, la majorité des NCOs étant formés par SDSA en méiose (Martini et al., 2011).

Lorsque la dHJ n'est pas prise en charge par la voie ZMM, elle peut être résolue *via* la voie Mus81-Mms4 (Figure 19D). Cette voie repose sur les endonucléases spécifiques de structures telles que Mus81-Mms4, Slx1-Slx4 ou encore Yen1 (Hollingsworth and Brill, 2004; Zakharyevich et al., 2012). Ces endonucléases

reconnaissent notamment les structures « 3'-flap » et génèrent des coupures simple brin sur ces structures (Hollingsworth and Brill, 2004). La résolution *via* endonucléases spécifiques de structures conduit à la formation de COs, dits de classe II (Figure 19D).

Ainsi, il existe deux classes de COs, I et II, qui correspondent aux deux voies de résolution exposés précédemment. Ces deux classes se distinguent par la capacité des COs générés à interférer les uns avec les autres : les COs de classe I interfèrent tandis que les COs de classe II n'interfèrent pas. Le mécanisme d'interférence sera décrit à la suite. De manière intéressante, ces deux classes ne sont pas retrouvées chez toutes les espèces puisque seuls les COs de classe I sont formés chez *C. elegans* (Lui and Colaiácovo, 2013), tandis que *S. pombe* ne produit que des COs de classe II (Cromie et al., 2006).

Enfin, il existe également une voie de dissolution des dHJs non représentée ici, qui repose sur la migration des deux HJs l'une vers l'autre et la décaténation de cette structure par des topoisomérases. Cependant, les traces spécifiques correspondantes à ce mécanisme restent questionnables à travers l'analyse des hDNAs résultants de la réparation des DSBs méiotiques (Marsolier-Kergoat et al., 2018).

Régulation de la formation des COs

La ségrégation correcte des chromosomes homologues repose sur la formation de COs, et ceux-ci ont été observés chez la majorité des espèces étudiées (Jones and Franklin, 2006). Afin d'assurer la stabilité du génome tout en promouvant la diversité génétique, les COs ne doivent pas être générés en trop grande ou en trop faible quantité (Jones and Franklin, 2006). Ce constat a mené la communauté scientifique à proposer l'existence de trois mécanismes qui régulent finement la formation et la distribution des COs sur le génome : l'assurance, l'interférence et l'homéostasie des COs (Wang et al., 2015).

L'assurance des COs garantirait l'établissement d'au moins un CO par paire de chromosomes homologues, et il est en effet très rare d'observer un chromosome n'ayant subi aucun CO au cours d'une division méiotique (Jones and Franklin, 2006).

Le mécanisme d'homéostasie des COs réfère à la non-proportionnalité qu'il existe entre le nombre de COs formés en fonction du nombre de DSBs générées (Jones and Franklin, 2006). L'homéostasie des COs favorise la formation d'un nombre optimal de COs pour la division méiotique. Ce mécanisme a été initialement décrit chez *S. cerevisiae* : la fréquence de COs est maintenue malgré une réduction du nombre de DSBs causée par un allèle hypomorphe de *SPO11*, tandis que le nombre NCOs est diminué par rapport au contexte sauvage (Martini et al., 2006). Dans ce contexte, la

formation de COs est favorisée au détriment des NCOs pour pallier la réduction du nombre de DSBs et maintenir un nombre suffisant de CO.

Enfin, l'interférence des COs, décrite pour la première fois par Muller au début du XXe siècle, est observée chez *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *D. melanogaster*, *A. thaliana*, la souris ou encore l'humain (Muller, 1916). Ce mécanisme de régulation a pour effet d'inhiber la formation d'un CO à proximité d'un CO déjà formé. L'interférence entre COs permettrait une distribution équitable des COs sur l'ensemble du génome. Cependant, seuls les COs de classe I interfèrent, contrairement aux COs de classe II (Gray and Cohen, 2016). Ce phénomène semble donc dépendant de la voie ZMM, mais son mécanisme et sa mise en place reste mal connus à ce jour.

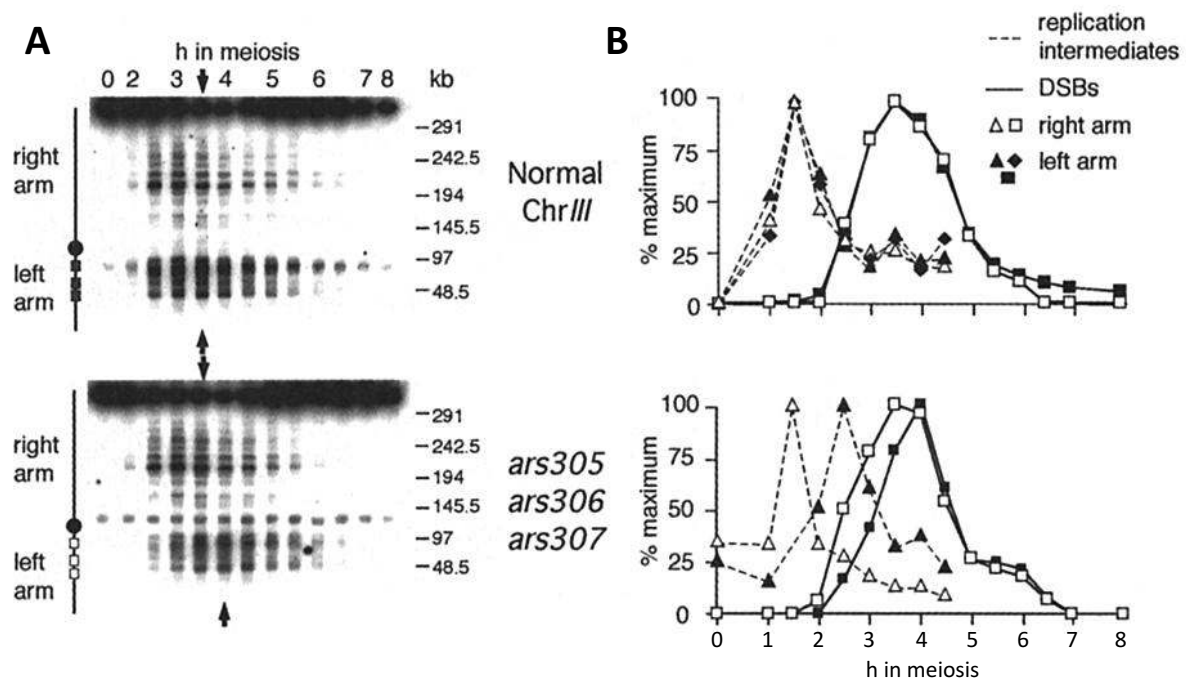


Figure 20 : Les retards de réplication affectent la formation de DSB

(A) Détection des DSBs sur le chromosome III par électrophorèse à champs pulsé (PFGE). Les DSBs sont détectées *via* marquage radioactif à l'aide d'une sonde sur le bras gauche du chromosome. Les flèches indiquent le temps auquel un maximum de DSBs est détecté. Le PFGE du haut a été réalisé sur une souche sauvage. Le PFGE du bas a été réalisé sur une souche mutante à laquelle les *ARS305*, *306* et *307* du bras gauche ont été enlevés, représentés par o sur la carte du chromosome.

(B) Quantification des intermédiaires de réplication et des DSBs sur les bras droit et gauche du chromosome III en souche sauvage (haut) et mutante *ars305* Δ *ars306* Δ *ars307* Δ (bas). Les lignes pointillées correspondent aux intermédiaires de réplication mesurés par gel2D, sur le bras droit (Δ) et le bras gauche (\blacktriangle ◆). Les lignes pleines correspondent au niveau de DSBs mesuré par PFGE sur le bras droit (\square) et sur le bras gauche (\blacksquare).

(Borde et al., 2000)

Chapitre II : Régulation des DSBs et Interférence

L'introduction de cassures double-brin représente un réel danger pour la cellule, mais est essentielle à la RH méiotique. En raison des sources d'instabilité génomique qu'il représente, le processus de formation de DSB est soumis à une forte régulation spatiotemporelle. Ainsi, différents mécanismes de régulation temporelle permettent d'initier la formation des DSBs en prophase I et de limiter leur formation à cette étape. En parallèle, d'autres mécanismes s'assurent de la répartition des DSBs sur tout le génome, afin que leur réparation aboutisse à la formation d'au moins un CO par paire de chromosomes homologues. La répartition des DSBs sur le génome limite également le risque de cassures trop proche les unes des autres, ce qui pourrait engendrer des pertes d'informations génétiques. Dans ce chapitre, les principaux mécanismes de régulation temporelle et spatiale de la formation des DSBs seront présentés, et un accent particulier sera posé sur le mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques auquel ce travail de thèse s'est intéressé.

Partie I : Régulation de la formation des DSBs

1. Couplage réplication – formation des DSBs

Les DSBs ne sont pas formées tout au long du programme méiotique, mais dans une fenêtre de temps bien définie qu'est la prophase I. Un des processus permettant de réguler l'initiation de la formation des DSBs est la réplication du génome. Dès 2000, Borde *et al.* démontrent que la formation des cassures est couplée à la réplication de l'ADN (Borde *et al.*, 2000). Dans cette étude, trois origines de réplication (« ARS ») ont été supprimées sur le bras gauche du chromosome III, retardant localement la réplication de cette région chromosomique par rapport au bras droit du chromosome (Figure 20B). Ce délai est corrélé à un retard de formation des DSBs, mesuré par technique d'électrophorèse à champs pulsés (Figure 20), démontrant l'existence d'un couplage entre réplication méiotique et formation des DSBs. De plus, l'utilisation d'hétérozygotes *ARS+/arsΔ* pour le chromosome III a permis de démontrer que ce couplage s'effectue en *cis* localement : l'hétérozygotie induit un retard de réplication et de formation de cassures uniquement sur le chromosome dont les origines de réplication ont été enlevées (Murakami *et al.*, 2003).

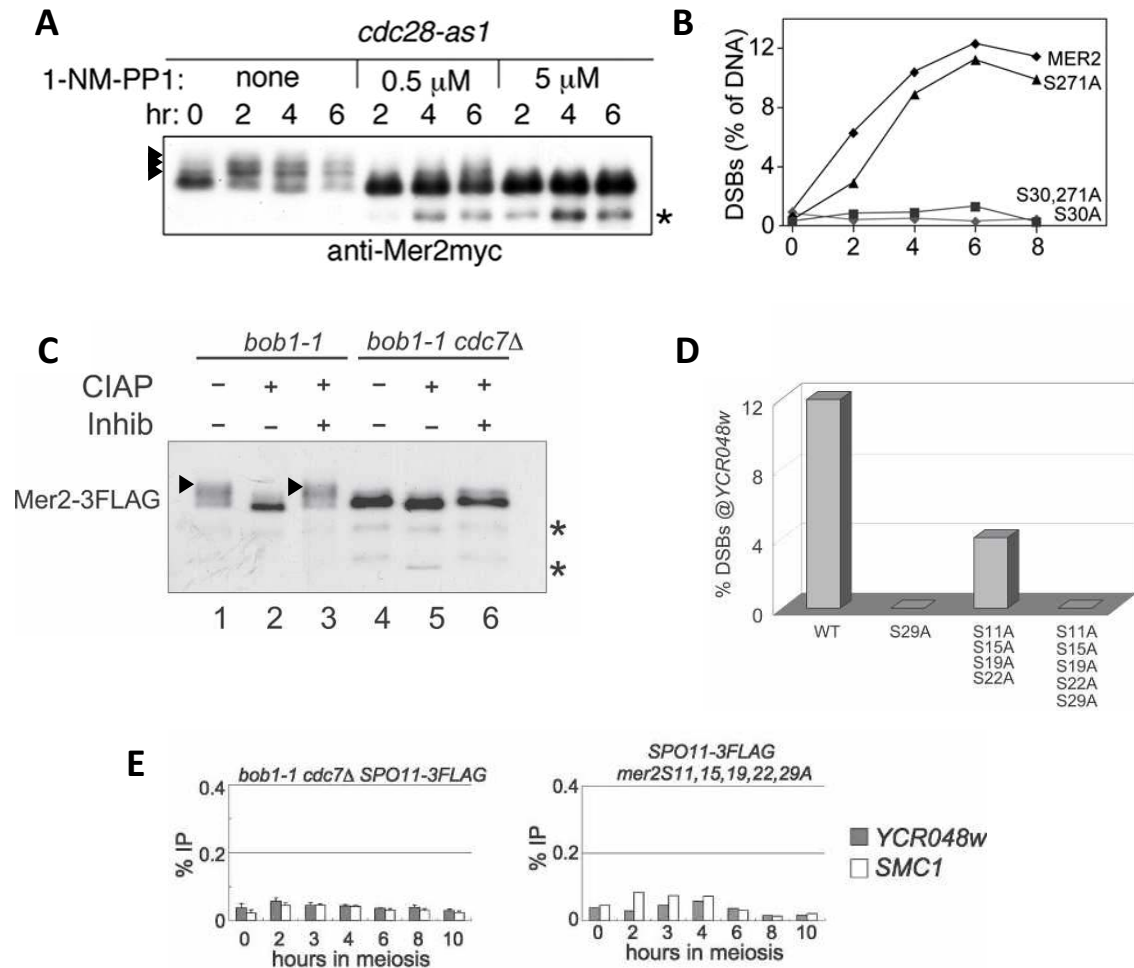


Figure 21 : Phosphorylation de Mer2 par les complexes CDK et DDK

(A) Détection de la protéine Mer2 par Western Blot sur des extraits protéiques. Ici les auteurs utilisent le mutant *cdc28-as1* qui permet d'inactiver la protéine par ajout de la substance 1-NM-PP1.

(B) Quantification niveau de DSBs au locus *ARE1* (ou *YCR048w*) en présence de la protéine Mer2 sauvage ou de la protéine Mer2 dont les sites de phosphorylation par CDK ont été mutés.

(C) Détection de la protéine Mer2 par Western Blot après immunoprécipitation de la protéine. Les échantillons sont traités ou non avec une phosphatase (CIAP), en combinaison ou non avec un inhibiteur de phosphatase (Inhib). Les auteurs utilisent ici un fond génétique *bob1-1* qui permet de contourner les défauts de réplication induits par l'absence de Cdc7 et d'étudier le rôle de cette dernière dans la phosphorylation de Mer2 et la formation des DSBs.

(D) Quantification du niveau de DSBs au locus *ARE1* en fond génétique sauvage ou en présence de la protéine Mer2 dont les sites de phosphorylation par les DDK ont été mutés.

(E) Détection de la protéine Spo11 au locus *ARE1* par ChIP en absence de Cdc7 ou en présence de la forme phosphomutée de Mer2.

A et C : ► indique les formes phosphorylées de Mer2 sur les Western Blot ; * indique les produits de dégradation

(A – B) : (Henderson et al., 2006)

(C – E) : (Sasanuma et al., 2008)

Ce couplage est également observé chez les céréales (Higgins et al., 2012) et plus récemment chez les mammifères (Pratto et al., 2021) où la réplication précoce de certaines parties du génome est associée à une formation plus précoce de DSBs. En outre, la réplication méiotique est connue pour être plus longue que la phase S mitotique, et il est très tôt proposé que cette durée pourrait être due à la mise en place d'éléments essentiels à la recombinaison méiotique (Borde et al., 2000; Cha et al., 2000). En effet, Spo11 semble avoir un effet répresseur sur la progression de réplication méiotique puisqu'en contexte *spo11Δ* la durée de la phase S est raccourcie (Cha et al., 2000). En revanche, l'absence de Rec102 n'altère pas la durée de la phase S, suggérant que la machinerie de formation de DSBs dans son ensemble n'est pas requise. Néanmoins, l'effet répresseur de Spo11 accentue l'idée d'un dialogue entre phase de réplication de l'ADN et formation des DSBs.

Il est rapidement apparu que la compréhension de ce couplage réplication-formation des DSBs passerait par l'identification de facteurs impliqués dans ces deux processus, et c'est l'étude de Mer2 qui a permis d'établir le lien entre ces deux phases. Mer2 est en effet phosphorylée par Cdc28-Clb5/6 (Henderson et al., 2006) (Figure 21A) et par Cdc7-Dbf4 (Sasanuma et al., 2008) (Figure 21C). Pour rappel, le couple Cdc28-Clb5/6 (complexe CDK) promeut l'entrée en phase S, tandis que Cdc7-Dbf4 (complexe DDK) est impliqué dans l'activation des origines de réplication. En absence de phosphorylation de Mer2 par les complexes CDK et DDK, la formation des DSBs est altérée (Henderson et al., 2006; Sasanuma et al., 2008) (Figure 21B, Figure 21D). En effet, il est démontré par CHIP que le recrutement de Spo11 au hotspot de cassure *ARE1* est aboli en absence de phosphorylation de Mer2 par le complexe DDK (Figure 21E), ce qui renforce l'hypothèse d'un couplage entre la réplication et la formation des DSBs. Par la suite, les travaux de Murakami *et al.* relient directement la machinerie de formation de cassure à celle de réplication de l'ADN en démontrant que la phosphorylation de Mer2 dépend de l'association du complexe DDK avec le réplisome (Murakami and Keeney, 2014). Un modèle émerge alors, présentant Mer2 sur la chromatine avant réplication de l'ADN où une première vague de phosphorylation par Cdc28-Clb5/6 s'opère, puis au passage de la fourche de réplication, le complexe DDK associé au réplisome phosphoryle à son tour Mer2 (Figure 22). Cette phosphorylation permet le recrutement de Rec114 et Mei4 (Panizza et al., 2011), et probablement par cascade de recrutement, le reste de la machinerie de formation de DSBs (Figure 22).

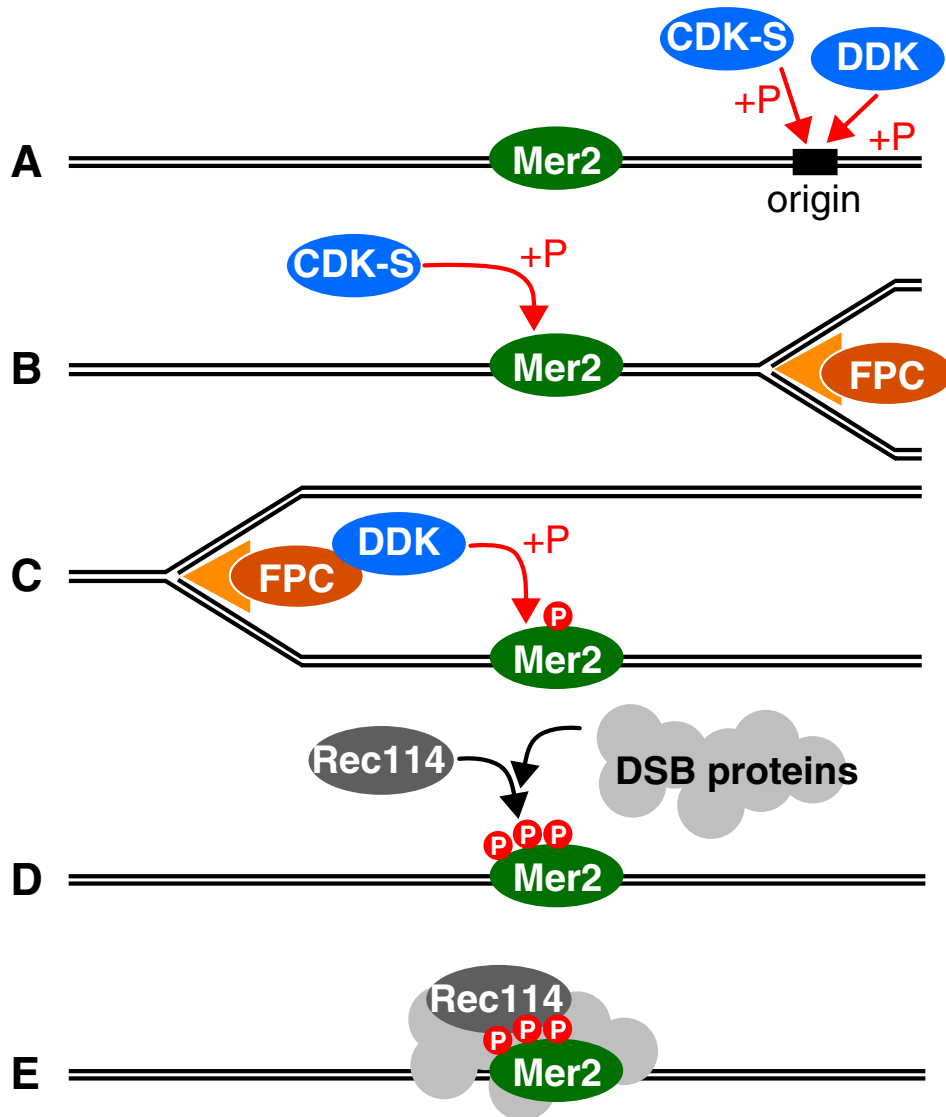


Figure 22 : Couplage spatiotemporel entre réplication méiotique et recrutement de la machinerie de formation de DSBs

Schématisation des évènements menant de l'initiation de la réplication par les complexes Cdc28-Clb5/6 (CDK-S) et Cdc7-Dbf4 (DDK) au recrutement de la machinerie de formation des DSBs. FPC = Machinerie de la fourche de réplication

(A) Mer2 est recrutée sur la chromatine indépendamment de sa phosphorylation ; les origines de réplication sont activées lorsque le niveau en CDK-S et DDK est suffisamment élevé. **(B)** Mer2 est partiellement phosphorylé par CDK-S indépendamment de la réplication. **(C)** Le complexe DDK est associé au FPC et phosphoryle Mer2 au passage de la fourche. **(D-E)** La phosphorylation de Mer2 permet le recrutement de Rec114 et Mei4 et potentiellement les autres protéines nécessaires à la formation des DSBs.

(Murakami and Keeney, 2014)

La réplication apparaît donc comme un prérequis à la recombinaison méiotique, et c'est un argument souvent exposé en raison du couplage réplication-formation des DSBs (Borde et al., 2000; Smith et al., 2001). Néanmoins, Spo11 est capable de cliver l'ADN en absence de Cdc6, et donc sans réplication de l'ADN (Blitzblau et al., 2012). La réplication ne semble donc pas être un prérequis *per se*, mais il est cependant légitime de considérer la réplication comme une « sécurité » à la formation des DSBs, puisque la synthèse d'une chromatide sœur assure la présence d'un support de réparation en cas d'impossibilité de réparer avec le chromosome homologue. De plus, le couplage temporel de ces deux événements permet d'éviter la formation de cassures avant le passage de la fourche de réplication, qui résulterait en l'arrêt de la fourche de réplication et la génération de deux DSBs au même locus.

2. Arrêt de la formation de DSBs

Avant séparation des chromosomes homologues, il est important que toutes les DSBs aient été réparées et que la fenêtre de formation de DSBs ait été clôturée. Plusieurs boucles de rétrocontrôles négatifs sont utilisées par la cellule pour limiter la formation des DSBs, mais c'est essentiellement le désassemblage de la machinerie de formation de cassure qui marque l'arrêt de leur formation.

La formation du SC et l'appariement des chromosomes homologues sont des éléments clés dans l'arrêt de la formation de DSBs. En 2014, Thacker *et al.* observent l'accumulation et la persistance de DSBs lorsque des protéines du ZMM sont mutées chez *S. cerevisiae* (Thacker et al., 2014). Le ZMM étant essentiel à la formation des COs et la synapse des chromosomes homologues, ces processus semblaient jouer un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la formation des DSBs. Plus récemment, deux études ont démontré que c'est l'assemblage du SC qui influe sur la formation de DSBs (Lee et al., 2021; Mu et al., 2020). En absence de Gmc2 et Ecm11, des protéines de la région centrale du SC impliquées dans son élongation, les auteurs observent une augmentation de la formations de DSBs (Lee et al., 2021; Mu et al., 2020).

Le lien entre l'assemblage du SC et l'inhibition de formation de DSBs pourrait être médié par l'éviction de la protéine Hop1. En effet, lors de la formation du SC, Hop1 est dissociée de Red1 sous l'action de la protéine Pch2 (Börner et al., 2008; Chen et al., 2014). En absence de Pch2, des données de microscopie à fluorescence montrent que Hop1 et Zip1 co-localisent sur les chromosomes contrairement au fond sauvage (Börner et al., 2008). Le même phénomène est observé chez la souris où les protéines HORMAD1/2 se dissocient de l'axe sous l'action de TRIP13, l'homologue de Pch2 chez les mammifères (Acquaviva et al., 2020; Wojtasz et al., 2009).

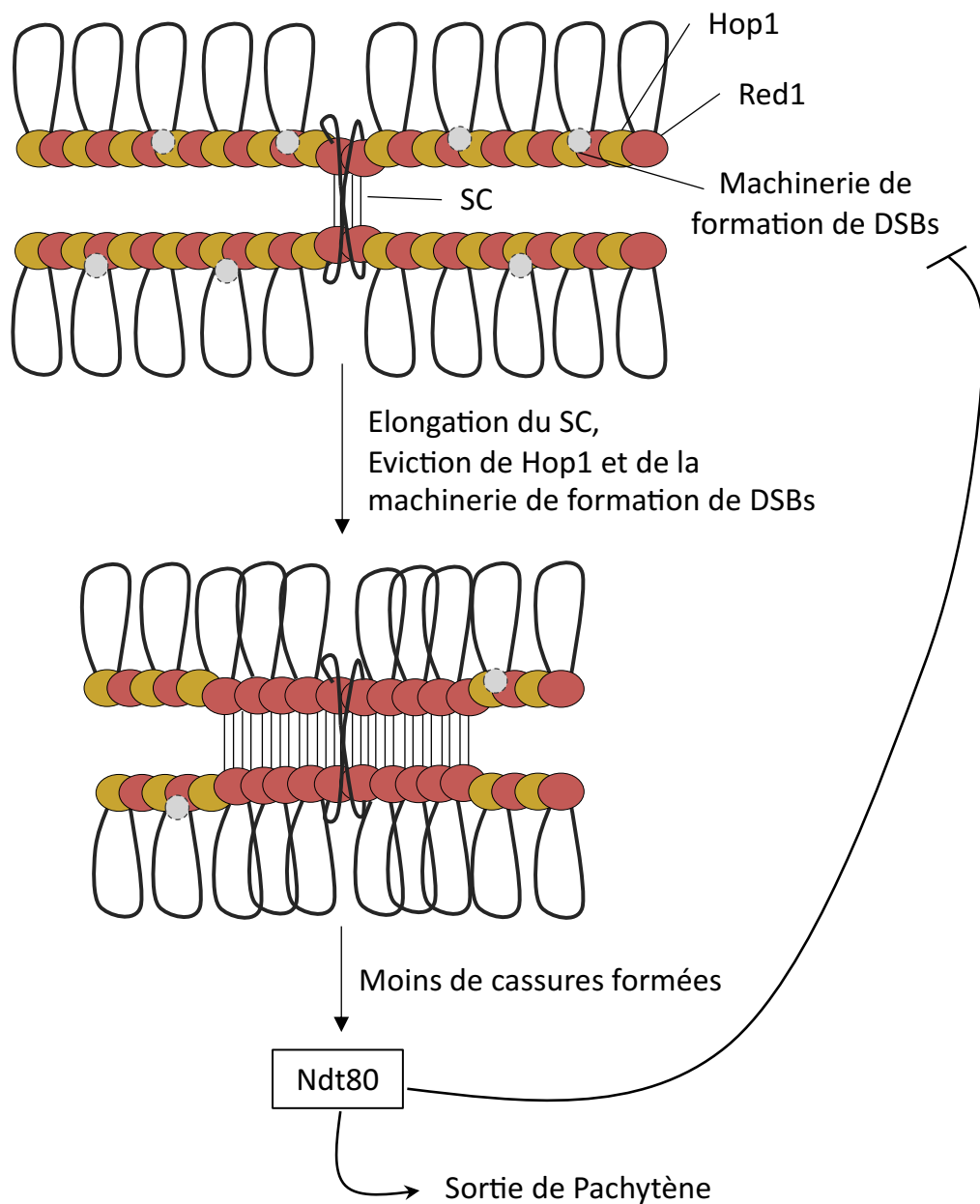


Figure 23 : Arrêt de la formation des DSBs et sortie de pachytène

La réparation par HR avec le chromosome homologue permet la mise en place de Zip1 et du SC. La mise en place du SC permettrait l'éviction de la protéine Hop1, et potentiellement celle de la machinerie de formation de DSBs. La diminution de formation de DSBs permet l'activation de la protéine Ndt80, qui inhibe également la machinerie de formation de DSBs jusqu'au passage complet du checkpoint du pachytène.

Le rôle de Hop1 est également appuyé par l'étude de la formation des DSBs sur les petits chromosomes de *S. cerevisiae* (Murakami et al., 2020). Une répartition uniforme des DSBs devrait amener à une très faible quantité, voire une absence, de formation de DSBs sur les plus petits chromosomes. Cependant, ceux-ci forment plus de cassures que les grands chromosomes, proportionnellement à leur taille. En 2020, Murakami *et al.* observent plusieurs caractéristiques propres aux petits chromosomes qui permettraient d'expliquer ce phénomène. D'une part, les auteurs observent un enrichissement important des protéines Red1, Hop1 et Rec114 sur les petits chromosomes à des temps précoces et tardifs du programme méiotique (Murakami et al., 2020). Dans un mutant *zip3Δ*, où l'engagement avec l'homologue est aboli, les grands chromosomes accumulent également Rec114, et l'enrichissement spécifique des petits chromosomes est perdu à des temps tardifs, mais pas aux temps précoces. L'enrichissement précoce de Rec114 est perdu en absence de Red1 ou Hop1 et Murakami *et al.* suggèrent qu'un biais de recrutement de Red1 et Hop1 soit responsable de la surreprésentation de Red1, Hop1 et Rec114 sur les petits chromosomes (Murakami et al., 2020). D'autre part, les auteurs observent un fort enrichissement des protéines Red1, Hop1 et Rec114 dans les régions centromériques et subtélomériques, qui représentent une proportion importante des petits chromosomes (Murakami et al., 2020). De plus, Hop1 reste associée aux régions subtélomériques après synapse des chromosomes homologues tandis que des DSBs sont formées tardivement en pachytène dans ces régions (Subramanian et al., 2019). Ainsi, il a été proposé que la présence de Hop1 favorise la formation de DSBs tandis que son éviction limite leur formation, et sa surreprésentation sur les petits chromosomes explique en partie la formation accrue de cassures sur ces chromosomes (Murakami et al., 2020; Subramanian et al., 2019). Enfin, il a également été démontré que les protéines Rec102, Rec104, Rec114 et Mei4 ne se localisent plus sur le génome après synapse des chromosomes homologues (Carballo et al., 2013; Kee et al., 2004; Li et al., 2006; Maleki et al., 2007; Panizza et al., 2011).

Il est donc proposé que l'assemblage du SC en pachytène entraîne la dissociation de la protéine Hop1 et de la machinerie de formation de DSBs, clôturant ainsi la fenêtre d'opportunité de formation de cassures sur le génome (Figure 23) (Mu et al., 2020).

Le passage du checkpoint du pachytène est également clé dans l'arrêt de la formation des cassures. En absence de Ndt80, les DSBs s'accumulent dans la cellule (Keeney, 2001; Xu and Kleckner, 1995). Il a été proposé que les défauts de rétrocontrôle de la formation de DSB observé dans des mutants ZMM soient dus à l'activation du checkpoint, mais l'étude de double mutant *ndt80Δ zip3Δ* montre une

accumulation de DSBs plus importante que dans les simples mutants (Thacker et al., 2014). Dans ce double mutant, l'extension de la prophase I et les défauts d'assemblage du SC participent de concert à la persistance de DSBs. Il apparaît ainsi que l'expression de Ndt80 et le passage du checkpoint du pachytène participe au rétrocontrôle négatif de la formation de cassures indépendamment du SC (Figure 23).

3. Homéostasie des DSBs

À l'image de l'homéostasie des COs, le programme méiotique assure que suffisamment de cassures seront formées pour aboutir à la formation d'au minimum un CO par paire de chromosomes homologues. L'homéostasie des DSBs passe par le contrôle du nombre de DSBs sur le génome qui implique les protéines kinase Tel1/ATM et Mec1/ATR (Cooper et al., 2014).

D'une part, la protéine Mec1/ATR favorise la formation de DSBs dans des conditions non optimales pour la catalyse de DSBs (Argunhan et al., 2013; Gray et al., 2013). Ainsi, une boucle de rétroaction positive composée de Mec1-Rad24-Rad17 stimule la formation de DSBs pour compenser la perte induite par l'utilisation de mutants hypomorphes de Spo11 (Argunhan et al., 2013; Gray et al., 2013). D'autre part la protéine Tel1/ATM inhibe la formation de DSBs et en absence de la protéine, le nombre de DSBs augmente (Lange et al., 2011; Mohibullah and Keeney, 2017). Cependant, chez les hétérozygotes *Spo11*^{-/+} le nombre de DSBs formées diminue de moitié dans un contexte *Atm*^{-/-} alors cette diminution est modérée (~20%) dans un contexte sauvage (Lange et al., 2011). Ce résultat illustre l'homéostasie des DSBs en contexte sauvage où le programme méiotique s'assure qu'un nombre suffisant de cassures sont formées.

Les rôles de Mec1/ATR et Tel1/ATM dans l'homéostasie des DSBs sont néanmoins peu compris. En effet, si Mec1 peut favoriser la formation de DSBs dans le contexte d'une catalyse de DSBs non optimale, elle peut également inhiber la formation de cassure, notamment au cours de la phase de réplication (Blitzblau and Hochwagen, 2013) ou en association avec Tel1/ATM dans la *trans*-interférence (*cf.* Partie II : Distribution des DSBs sur le génome). Il semble donc que le rôle de Mec1 dans la promotion ou l'inhibition de la formation des DSBs dépende du cycle cellulaire.

De plus, il a été proposé que le contrôle de la formation des DSBs par Mec1-Tel1 puisse être médié par la phosphorylation de Hop1 et Rec114. Celles-ci sont phosphorylées par Mec1-Tel1 (Carballo et al., 2008, 2013), et Hop1 semble participer à l'arrêt de la formation de DSBs (*cf.* Partie I – 2. Arrêt de la formation de DSBs). Cependant, le double mutant de phosphorylation *rec114-8A hop1-scd* ne montre pas d'augmentation de formation de DSBs (Mohibullah and Keeney, 2017). Le mécanisme

d'action de Tel1/ATM et Mec1/ATR dans l'homéostasie des DSBs reste donc méconnue à ce jour.

Partie II : Distribution des DSBs sur le génome

Au cours de la prophase I méiotique, ~150 DSBs sont réparties sur 12Mb du génome de *S. cerevisiae* et ~200 DSBs sur les 2,5Gb du génome de la souris, et ces DSBs ne sont pas formées aléatoirement sur le génome. Dans une population de cellules, chacune d'entre elles coupe des hotspots différents parmi les milliers à sa disposition, et il est nécessaire que les DSBs soient réparties sur tous les chromosomes afin d'assurer la formation d'au moins un CO par paire de chromosomes homologues. Ainsi la formation des DSBs est soumise à une régulation spatiale assurant la distribution de ces centaines de cassures sur tout le génome. Néanmoins, les connaissances sur ces mécanismes de régulation sont encore limitées et cette partie vise à présenter la littérature scientifique et les principales conclusions traitant de ce sujet.

1. Dialogue entre sites de cassures

Les premières pistes d'une communication entre sites de cassures ont été émises en 1993 par Goyon et Lichten (Goyon and Lichten, 1993). Dans cette étude, les auteurs ont cherché à étudier la formation des intermédiaires de recombinaison qui fait suite à l'introduction de DSBs. Pour ce faire, les auteurs ont déplacé le locus *ARG4*, premier locus identifié comme un hotspot de cassures, vers le locus *MATa*. En mesurant la formation des DSBs à ce nouveau locus, les auteurs remarquent que la fréquence de coupure est réduite par rapport au locus d'origine. Ce phénomène est étudié plus en profondeur par la suite, en déplaçant le locus *ARG4* vers différents sites de cassures connus (Wu and Lichten, 1994). À chaque insertion de la construction, les auteurs mesurent la formation de DSBs sur la construction et sur le site de cassure à proximité duquel elle a été insérée. Ceux-ci ont pu observer que l'insertion de la construction pouvait diminuer la fréquence de cassures des hotspots adjacents ou la formation de DSBs sur la construction elle-même, selon le site d'insertion. Ainsi, les auteurs concluent que les hotspots exercent une influence les uns sur les autres qui modulent la fréquence de formation de DSBs. Dans le même temps, Xu et Kleckner étudient le locus *HIS4::LEU2* (Xu and Kleckner, 1995) qui possède deux sites de cassures de part et d'autre du gène *LEU2* dont les fréquences de coupures sont connues (~14% pour le site I et ~4,4% pour le site II) et cherchent à caractériser l'influence des hotspots l'un sur l'autre. Les auteurs insèrent une courte séquence d'ADN au niveau du site I et observent la formation de cassures. Ceux-ci notent

notamment une augmentation de la fréquence de cassure à ce site (~22%), ainsi qu'une diminution de la fréquence de cassure au site II (~2,2%). Ces résultats les mènent également à proposer l'existence d'une communication entre les hotspots de cassures. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ce phénomène dont une compétition entre hotspots (Wu and Lichten, 1995). Dès 1995, il est proposé que la compétition entre hotspots pourrait reposer sur une structure chromosomique impliquée dans la formation des DSBs où l'accès aux « enzymes de coupures » serait limité (Wu and Lichten, 1995). Un parallèle entre la régulation de la transcription (où la chromatine est organisée en domaines) et celle de la formation des DSBs est également proposé : les hotspots d'un même domaine pourraient être en compétition pour l'accès à la machinerie de coupure (Wu and Lichten, 1995). En 1997, Fan *et al.* ajoutent une notion de compétition en *cis* et en *trans* en reproduisant le même type d'expérience : deux constructions de hotspots sont intégrées en *cis* (sur la même chromatide) ou en *trans* (sur le chromosome homologue) et la formation de DSBs est mesurée (Fan et al., 1997). Leurs résultats démontrent que la compétition entre hotspots est plus importante en *cis* qu'en *trans* (Fan et al., 1997).

Cette notion n'est pas davantage explorée à cette époque, et ce n'est que plusieurs années plus tard avec l'identification de Spo11, des protéines impliquées dans la formation des DSBs et l'amélioration des techniques de biologie moléculaire que ce phénomène a pu être plus étudié. En 2008, Fukuda *et al.* utilisent la construction *GAL4BD-Spo11* pour diriger l'activité de la protéine à un locus précis sur le génome (Fukuda et al., 2008). Ils observent que l'introduction de coupures dirigées via le système *GAL4BD-Spo11* ou via l'endonucléase I-SceI impacte négativement la formation de DSBs sur les hotspots adjacents. Ces différentes observations les mènent à proposer que l'influence entre sites de cassures puisse être due à une limitation de facteurs essentiels à la formation de DSBs, potentiellement la protéine Rec114 en raison de son rôle dans le chargement de Spo11 sur la chromatine (Fukuda et al., 2008).

Il existe donc une communication entre DSBs qui limite la formation de plusieurs cassures à proximité. Une limite est cependant à soulever dans les premières études : l'effet observé ici résulte de l'insertion d'un hotspot artificiel ou de la formation de DSBs de manière ectopique sur le génome, et ne témoigne pas du dialogue qui peut exister entre hotspots naturels. Il faut attendre 2015 et les travaux de Garcia *et al.* pour constater la communication qui existe entre sites physiologiques de DSBs (Garcia et al., 2015). Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'un mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques, à l'image de l'interférence entre COs, dépendant de la protéine Tel1/ATM (Garcia et al., 2015).

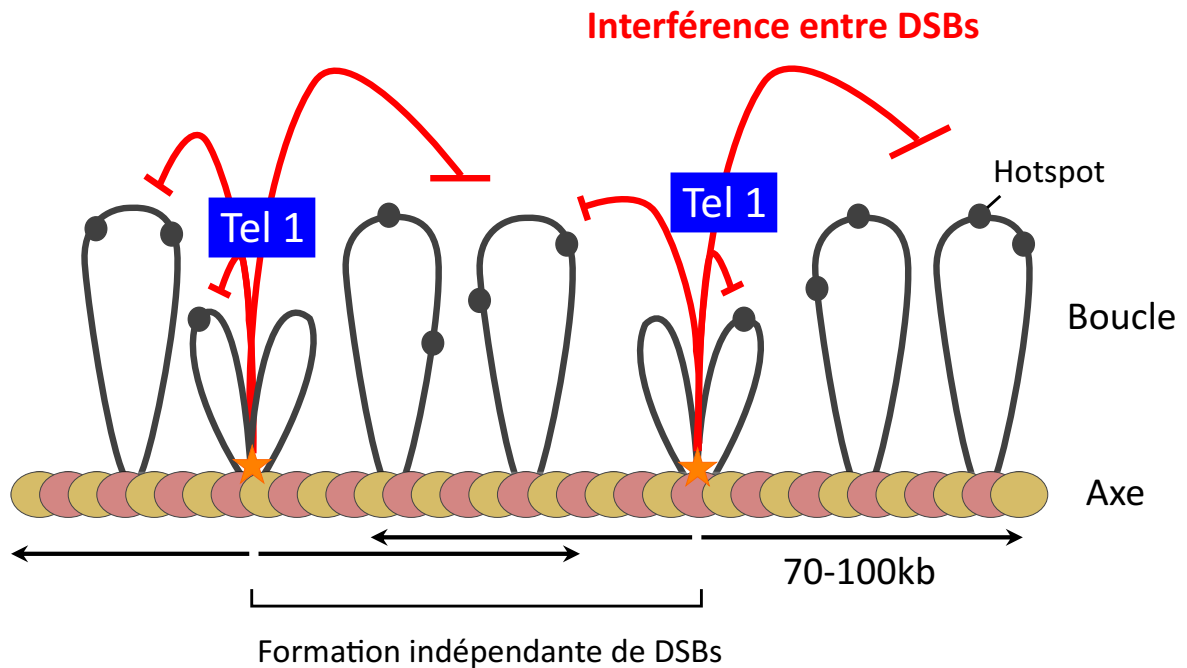


Figure 24 : Interférence entre DSBs méiotiques médiée par la protéine Tel1/ATM

Après formation d'une DSB, l'interférence est mise en place par la protéine Tel1. Ce mécanisme inhibe la formation de DSBs à proximité de la cassure initiale, dans la même boucle et dans les boucles adjacentes. L'inhibition se répand sur 70 à 100kb. Au de-là de cette distance, les DSBs sont formées indépendamment l'une de l'autre. L'interférence entre DSBs médiée par la protéine Tel1 participe à la répartition des DSBs sur le génome.

2. Interférence entre DSBs méiotiques

2.1 Définition

L'interférence entre DSBs méiotiques participe à la distribution des DSBs sur le génome. Ce mécanisme limite la formation de DSBs trop proche l'une de l'autre par l'intermédiaire de la protéine Tel1/ATM (Figure 24). La génération d'une DSB entraîne l'inhibition de la formation de DSBs autour de la cassure initiale, sur une distance de 70 à 100kb (Figure 24) : les sites de coupures interfèrent. Au-delà de cette distance, une nouvelle cassure peut être formée sans influence de la part de la première DSB : les deux cassures sont formées de manière indépendante l'une de l'autre (Figure 24). Ce phénomène a été mis en évidence par Garcia *et al.* qui ont étudié l'apparition d'évènements de doubles cassures (« double-cuts », DC) résultant de la formation simultanée de DSBs sur la même molécule (Garcia et al., 2015). La quantification des DCs permet ainsi de mesurer l'interférence entre deux sites de coupures, nommé « DSB I » et « DSB II ».

Dans cette étude, le niveau de DSBs est mesuré à chaque hotspot par Southern Blot ou par mesure des Spo11-oligo, et les évènements de DCs entre les deux hotspots étudiés sont également détectés et mesurés par Southern Blot. La mesure du niveau de DSBs de chaque hotspot permet de calculer le niveau de DCs attendues (DC_{exp}) si les DSBs sont formées de manière indépendante à chaque hotspots *via* la formule suivante :

$$DC_{exp} = \frac{DSB I \times DSB II}{100}$$

Les niveaux de DCs observées (DC_{obs}) et de DC_{exp} permettent de calculer l'interférence (I) entre les deux hotspots considérés :

$$I = 1 - \frac{DC_{obs}}{DC_{exp}}$$

Ainsi, si le niveau de DC_{obs} correspond au niveau de DC_{exp} , l'interférence sera nulle, signifiant que les deux hotspots sont indépendants l'un de l'autre. En revanche, lorsque le niveau de DC_{obs} est inférieur à celui attendu en cas d'indépendance, l'interférence calculée sera proche de 1, indiquant une inhibition de formation de cassure en *cis*. Enfin, le nombre de DCs observées peut également être supérieur à celui attendu en cas d'indépendance. Dans ce cas, l'interférence calculée sera négative, et ce cas sera abordé en 2.3 Interférence dans le contexte axe-boucle.

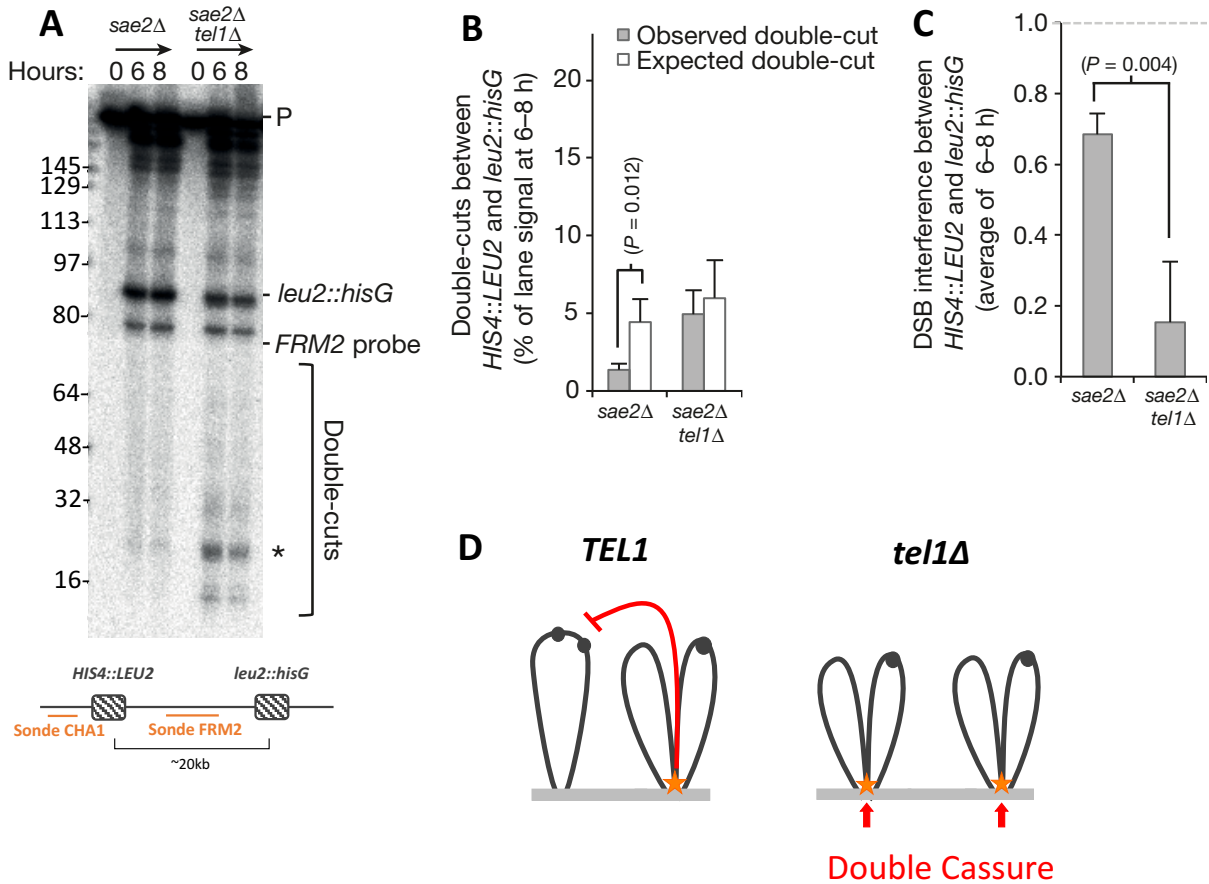


Figure 25 : Perte d'interférence entre hotspots localisés sur des boucles adjacentes en absence de Tel1

(A) Détection de DCs entre les sites *HIS4::LEU2* et *leu2::hisG*. L'ADN en plug de souche *sae2Δ* et *sae2Δ tel1Δ* est fragmenté par migration en champs pulsés (PFGE). La sonde radiomarquée *FRM2* permet de visualiser et mesurer les DCs formées. * désigne la forme de DCs majoritairement retrouvée.

(B) Quantification des DCs observées en (A) et des DCs attendues. La fréquence de DCs attendue est calculée par mesure des niveaux de cassures à chaque hotspot avec la sonde radiomarquée *CHA1*.

(C) Calcul de l'interférence entre les sites *HIS4::LEU2* et *leu2::hisG* en contexte *sae2Δ* et WT, en présence ou en absence de Tel1.

(D) Schématisation de la perte d'interférence entre deux hotspots localisés sur des boucles adjacentes. En contexte sauvage, la formation d'une DSB à un locus inhibe la formation d'une seconde cassure sur les hotspots à proximité via l'interférence médiée par Tel1. En absence de Tel1, l'interférence est perdue et la formation de DSB à chaque locus se fait de manière indépendante pouvant entraîner la formation de DCs

Adaptée de Garcia *et al.* (Garcia et al., 2015).

Les auteurs ont caractérisé l'interférence entre hotspots à différentes échelles : (i) Hotspots très éloignés, séparés de 150kb ; (ii) Hotspots localisés sur des boucles adjacentes, séparés par plus de ~ 10 kb ; (iii) Hotspots localisés sur la même boucle, séparés par moins de 10kb.

(i) Dans le cas de hotspots très éloignés, aucune interférence n'est détectée, et les auteurs concluent que les DSBs se forment de manière indépendante à cette distance.

(ii) Dans le cas d'hotspots localisés sur des boucles adjacentes, les auteurs ont mesuré l'interférence entre deux hotspots bien caractérisés localisés sur le chromosome III : *HIS4::LEU2* et *leu2::hisG*, distant d'à peu près 20kb. Le niveau de DSBs de chaque hotspot ainsi que les DCs formées sont visualisées et quantifiées par électrophorèse à champs pulsés (PFGE) suivie d'un Southern blot (Figure 25A). L'interférence est mesurée dans un fond génétique *sae2Δ* où les DSBs ne sont pas réparées, permettant leur accumulation et une meilleure visualisation de celles-ci par rapport au fond WT où les DSBs sont rapidement réparées. Ainsi, dans le cas contrôle (*sae2Δ*), le niveau de DC_{obs} est significativement inférieur à celui attendu en cas d'indépendance (Figure 25B), ce qui indique un phénomène d'interférence entre les deux hotspots (Figure 25C). En absence de Tel1, de nombreuses doubles cassures sont formées et détectées par PFGE (Figure 25A, Figure 25B). Dans ce cas, l'interférence mesurée est proche de 0 signifiant qu'elle est perdue entre les hotspots (Figure 25C) : les hotspots sont clivés de manière indépendante. Des résultats similaires ont été obtenus dans un fond génétique sauvage, où l'interférence entre *HIS4::LEU2* et *leu2::hisG* est également dépendante de Tel1 (Figure 25D) (Garcia et al., 2015). Enfin, le cas (iii) d'interférence entre hotspots très proches sera détaillé dans la partie 2.2 Interférence dans le contexte axe-boucle.

La distribution des DSBs le long des chromosomes résulte donc d'un phénomène d'interférence en *cis* médié par la protéine Tel1. Le phénomène d'interférence ne semble cependant pas se limiter à la molécule initialement coupée et permet également d'inhiber la formation de DSBs *en trans*, c'est-à-dire au même locus sur la chromatide sœur et le chromosome homologue (Zhang et al., 2011). Dès 2011, Zhang *et al.* élaborent différents scénarios probabilistes sur le nombre de cassures formées à un locus particulier parmi les quatre chromatides : un même locus peut ne pas être coupé n'entraînant aucun évènement de recombinaison ; être coupé une seule fois parmi les quatre chromatides ; deux fois ou plus... Dans chaque

scénario, les profils de recombinaison finaux seront différents, et les auteurs peuvent comparer les résultats obtenus au locus *HIS4::LEU2* aux différentes prédictions établies. Les résultats obtenus sont majoritairement compatibles avec l'établissement d'une seule cassure par paire de chromatides et par paire de chromosomes homologues pour un même locus. Ainsi, les auteurs proposent qu'une communication entre les quatre chromatides limite la formation de cassures au même locus. De plus, les auteurs démontrent que ce phénomène de *trans*-interférence est dépendant des protéines Tel1/ATM et Mec1/ATR (Zhang et al., 2011). Ce mécanisme permettrait de répartir sur les différentes chromatides et sur les deux homologues l'initiation de la RH menant à la formation de CO ce qui participe à la distribution des COs le long d'un chromosome (Figure 26). De plus, ce mécanisme peut également être vu comme une sécurité permettant la réparation d'une DSB : si un même locus est clivé sur plusieurs chromatides, la réparation par HR sera impossible. Ce mécanisme assure ainsi la préservation de locus intacts permettant la réparation par RH d'une DSB.

Ainsi, l'interférence entre DSBs participe à la répartition des DSBs sur l'ensemble du génome. Ce mécanisme est entièrement dépendant de Tel1, bien que son mode d'action reste inconnu. Comment l'interférence se propage-t-elle sur de longues distances ? Comment Tel1 inhibe concrètement la formation de DSBs en *cis* ? En 2013, il a été démontré que la phosphorylation de Rec114 par Tel1 participe au contrôle du niveau de DSBs (Carballo et al., 2013), et Rec114 apparaissait comme un candidat potentiel dans le cadre de l'interférence. Cependant aucune perte d'interférence n'est observable en présence d'une version non phosphorylable de la protéine Rec114 (Garcia et al., 2015), et les cibles de Tel1 dans le mécanisme de l'interférence restent à ce jour inconnues.

La répartition des DSBs sur le génome est la première étape permettant la distribution des COs sur le génome. Les COs de classe I sont également soumis à de l'interférence assurant leur répartition sur le génome. Cependant, la distribution des COs dépend en premier lieu de leur site d'initiation, et il a été proposé que l'interférence entre DSBs puisse influencer l'interférence entre COs (Boer et al., 2006). Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Anderson *et al.* où les auteurs constatent une perte partielle d'interférence entre COs en absence de Tel1 ainsi qu'une redistribution de tous les produits de RH (COs classe I, classe II, NCOs) (Anderson et al., 2015). Ainsi, l'interférence entre DSBs pourrait participer à la distribution des produits de recombinaison et plus particulièrement à celle des COs méiotiques.

2.2 Interférence dans le contexte axe-boucle

L'interférence entre DSBs s'applique aussi entre hotspots proches. Garcia *et al.* l'ont étudiée à différents loci sur le génome, et plus particulièrement aux loci *HIS4::LEU2* et *ARE1* (Figure 27). Au locus *ARE1*, l'un des hotspots les plus forts se situe dans le promoteur du gène *ARE1*, et de nombreux hotspots sont localisés à proximité de celui-ci (Figure 27). Le locus *HIS4::LEU2* est un locus artificiel intégré au génome contenant deux sites de cassures séparés de 2,4kb (Figure 27). Bien qu'il soit artificiel, ce locus est bien caractérisé et ne contient que deux sites de coupures dont les taux de DSBs sont connus. Ainsi, c'est un outil fréquemment utilisé pour étudier les mécanismes de la recombinaison homologue, dont la formation des DSBs.

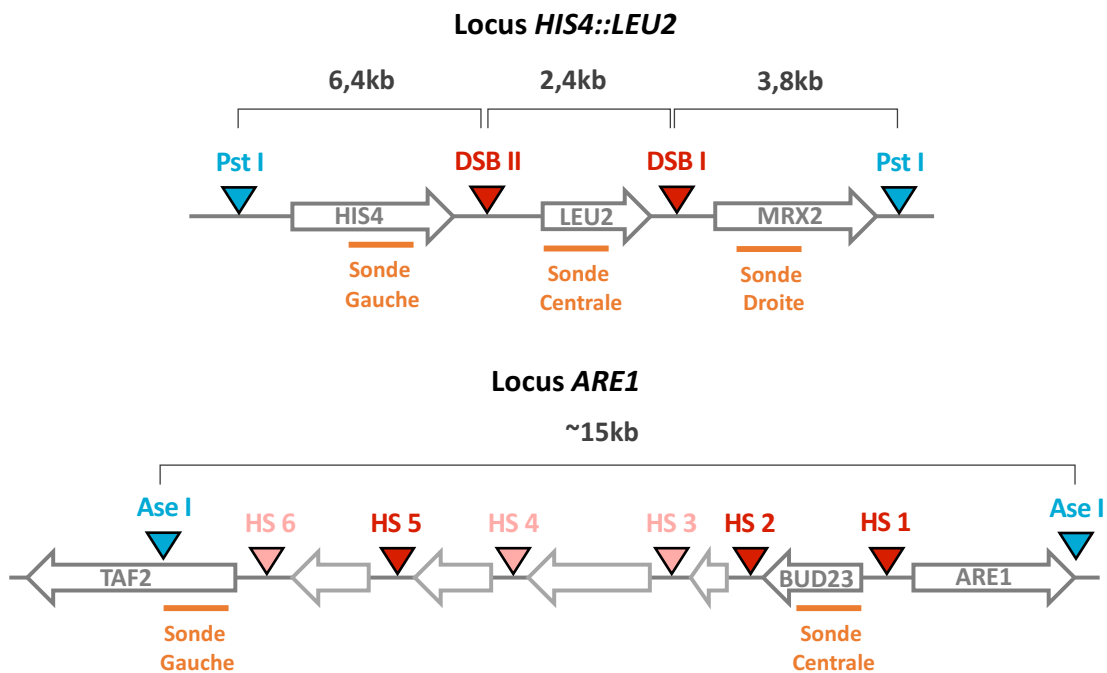


Figure 27 : Loci *HIS4::LEU2* et *ARE1*

Locus *HIS4::LEU2* : Ce locus contient deux sites de cassures (DSB I et DSB II) de part et d'autre du gène *LEU2*, séparé par ~2,4kb. La sonde radiomarquée centrale *LEU2* permet de visualiser les DCs formées (Figure 27A central probe). Après digestion de l'ADN par *Pst*I, les sondes gauche et droite (*LEU2LH* et *MRX2* respectivement) permettent de mesurer la fréquence de cassure au site II et au site I respectivement (Figure 27A Left probe et Right probe).

Locus *ARE1* : De nombreux hotspots sont présent dans la région *ARE1*. Ceux-ci sont notés HS, les hotspots rouges étant fortement coupés, les roses plus faiblement. Avec la sonde centrale *BUD23*, les DCs entre le HS1 et les autres hotspots sont détectés. Après digestion par *Ase*I, les DSBs formées à chaque hotspots sont détectées.

De manière surprenante, des DCs sont observées par Southern blot dans le contrôle *sae2Δ* au locus *HIS4::LEU2* (Figure 28A) dans les mêmes proportions qu'attendu si les hotspots étaient indépendants (Figure 28B) amenant à une « interférence nulle » après calcul (Figure 28C). En absence de Tel1, le niveau de DCs augmente de manière importante (Figure 28A) et est plus important que celui attendu en cas d'indépendance (Figure 28B), amenant à une interférence négative (Figure 28C), et ce en contexte sauvage et *sae2Δ*. L'absence d'interférence favorise donc les évènements de DCs entre hotspots proches.

Les mêmes observations sont faites au locus *ARE1* où le niveau d'interférence a été mesuré sur ~15kb de part et d'autre du locus *ARE1* (Garcia et al., 2015). En absence de Tel1, les auteurs mesurent une augmentation de la fréquence des évènements de DCs entre le hotspot *ARE1* et les hotspots adjacents, alors qu'en contexte *sae2Δ* ces évènements sont moins fréquents. Il est intéressant de noter qu'en absence de Tel1 la co-occurrence de DSBs est très forte à proximité du hotspot *ARE1*, et que la fréquence de DCs diminue avec la distance jusqu'à atteindre le même niveau qu'en contexte contrôle (Garcia et al., 2015). En présence de Tel1, il y a donc une interférence très forte au niveau du hotspot *ARE1* qui décroît avec la distance (Garcia et al., 2015).

Une manière d'expliquer la présence de DCs en contexte *sae2Δ* et l'interférence négative en absence de Tel1 repose sur le contexte dans lequel les DSBs sont formées : la structure axe-boucle. Il est proposé que lorsque la boucle d'ADN est amenée à proximité de l'axe et clivée, une seconde cassure peut être générée sur un hotspot adjacent : Spo11 pourrait couper l'ADN par opportunisme du fait de la proximité induite par le TLAC. Cependant, l'interférence médiée par Tel1 limiterait en grande partie ces évènements. En absence de Tel1, la formation d'une DSB promouvrait la formation d'une seconde DSB sur un hotspot adjacent (Figure 28D). Ainsi, la co-occurrence de DSBs entre hotspots d'une même boucle est limitée par l'interférence médiée dépendante Tel1 (Garcia et al., 2015).

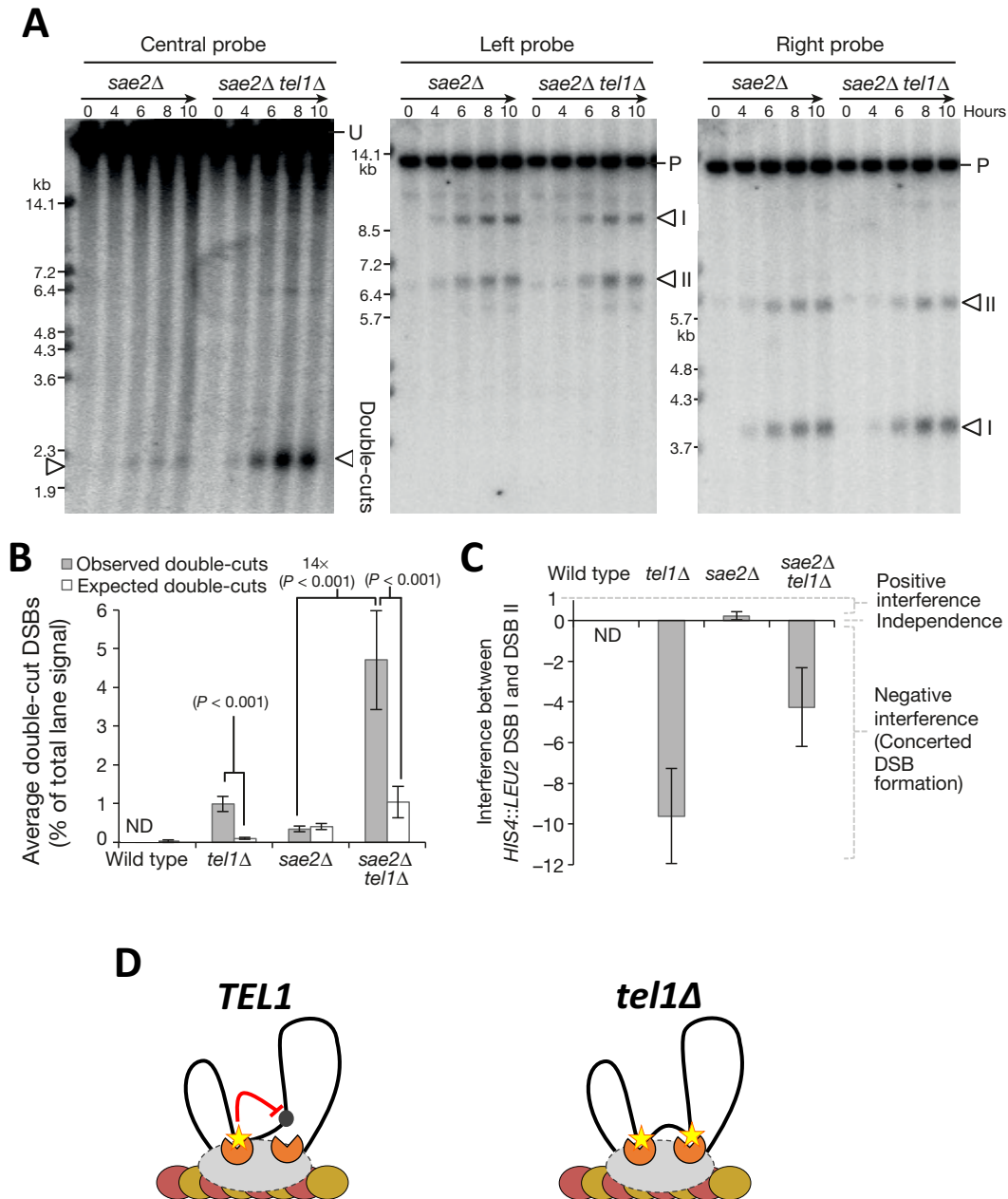


Figure 28 : Perte d'interférence entre hotspots au sein d'une même boucle

(A) Southern Blot sur ADN non digéré (Central probe) ou digéré par PstI (Left probe et Right probe) permettant la visualisation des DSBs et DCs générées au locus *HIS4::LEU2*.

(B) Quantification des DCs observées et attendues, en contexte WT et *sae2Δ*.

(C) Calcul de l'interférence entre les Sites I et II du locus *HIS4::LEU2*. En contexte WT, aucune DC n'est détectée rendant impossible le calcul de l'interférence.

(D) Schématisation de la perte d'interférence au sein d'une boucle. La formation d'une DSB *via* TLAC expose les hotspots à proximité à la machinerie de formation de DSBs. L'interférence médiée par Tel1 limite la formation de plusieurs DSBs au sein de la boucle. En absence de Tel1, le TLAC favorise la formation de plusieurs DSBs dans la boucle en raison de la proximité physique qu'il induit.

Adapté de Garcia *et al.* (Garcia et al., 2015)

3. Compétition vs Interférence ?

Après la mise en évidence du mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques, il était tentant d'assimiler les observations faites dans les années 1990 à l'interférence. Cependant, la notion de compétition entre hotspots a été remise en avant récemment par Mohibullah et Keeney qui ont reproduit l'expérience de Wu et Lichten en absence de Tel1 (Mohibullah and Keeney, 2017). Le hotspot artificiel *arg4-URA3* a été inséré à proximité de deux hotspots naturels : *HIS4* sur le chromosome III et *POR2* sur le chromosome IX. Dans cette étude le niveau de cassure est évalué par détection et séquençage des Spo11-oligos, permettant d'augmenter considérablement la précision avec laquelle les DSBs sont détectées et quantifiées. Sur le chromosome III, l'insertion du hotspot artificiel induit une répression de la formation de cassure (densité en Spo11-oligo réduit par quatre) sur 60kb d'un côté de l'insertion et 130kb de l'autre côté en contexte WT (Figure 29A, Figure 29B panneau du haut). En absence de Tel1, cette inhibition est maintenue sur 60kb de part et d'autre du hotspot artificiel. Ce phénomène d'inhibition est donc indépendant de Tel1. Sur le chromosome IX, le hotspot artificiel affecte négativement la formation de DSBs aux hotspots naturels sur 15kb de part et d'autre du site d'insertion. L'effet du hotspot artificiel ne s'étend plus que sur ~5kb en absence de Tel1 (Figure 29C, Figure 29B panneau du bas). Dans les deux cas, l'inhibition est maintenue autour du site artificiel en absence de Tel1. Cette inhibition (ou « compétition ») entre hotspots est indépendante de Tel1 et varie en fonction des régions chromosomiques (Mohibullah and Keeney, 2017). De plus, au-delà d'une certaine distance propre à chaque locus, la régulation de la formation de DSBs, en *cis* et en *trans* du site de coupure, devient dépendante du mécanisme d'interférence médié par Tel1.

Il apparait donc qu'il existe une compétition entre hotspots indépendante de la protéine Tel1 et du mécanisme d'interférence. Cependant, la compétition entre hotspots n'a pour l'instant été observée qu'après insertion d'un hotspot artificiel, et celle-ci n'a pas été mesurée entre hotspots naturels. De plus, la perte d'interférence induit une perte d'inhibition de formation de DSBs entre hotspots naturels proches, et la compétition entre hotspots seule ne semble pas suffisante pour maintenir cette inhibition. Néanmoins, le fonctionnement du mécanisme de compétition entre hotspots reste méconnu, et il est possible que celui-ci participe à la distribution et au

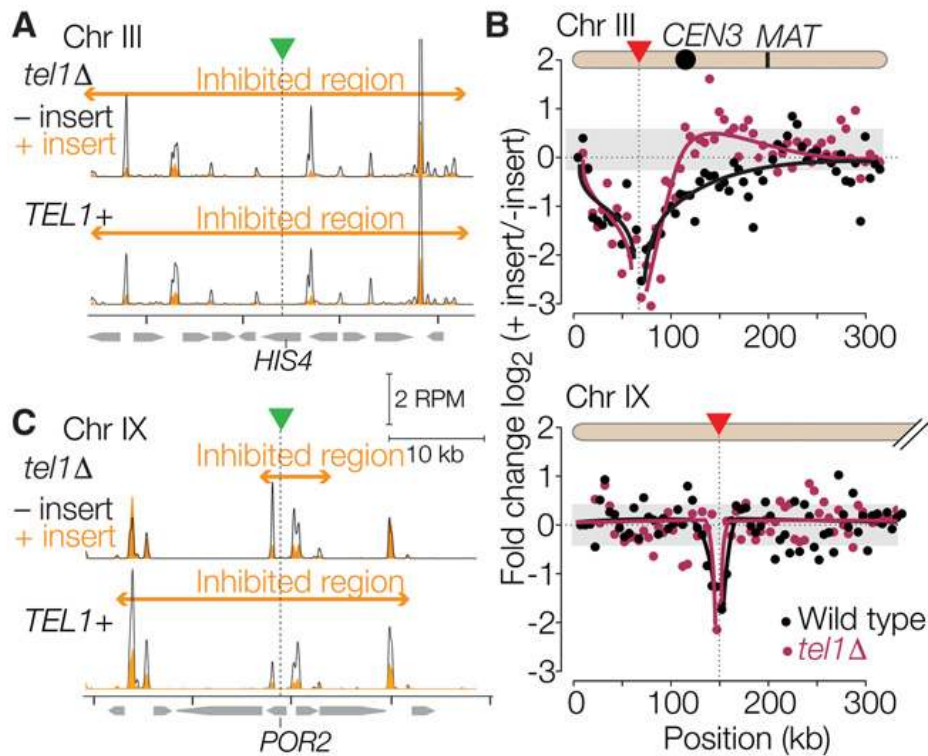


Figure 29 : Communication entre hotspots en cis le long des chromosomes

Effet de l'insertion d'un hotspot artificiel sur les chromosomes III et XI en contexte WT et *tel1Δ* (Mohibullah and Keeney, 2017).

(A, C) Carte des Spo11-oligos (lissé sur fenêtre glissante de 201pb) avec ou sans insert (ligne orange vs ligne grise) en présence ou en absence de Tel1 dans la région d'insertion (~40kb autour du point d'insertion désigné par le triangle vert).

(B) Carte représentant l'effet inhibiteur sur la formation des DSBs à partir du point d'insertion (triangle rouge) sur le chromosome III (panneau haut) et le chromosome IX (panneau bas). Chaque point représente le ratio +insert/-insert en Spo11-oligo à une position. Sur le chromosome III, on observe que l'effet inhibiteur est présent jusqu'à ~130kb du point d'insertion en WT (point/trait noir) et jusqu'à ~60kb en absence de Tel1 (point/trait bordeaux). Sur le chromosome IX, l'effet est moins visible dû à l'échelle utilisée, mais l'effet inhibiteur est également conservé en absence de Tel1 à proximité de l'insert.

contrôle de la formation des DSBs en plus de l'interférence. Les auteurs proposent qu'il puisse être dû à la titration de certains éléments de la machinerie de formation des DSBs, notamment le complexe RMM, et l'utilisation de mutants affectant la compétition entre hotspots permettrait d'observer son effet en contexte physiologique et de voir comment celle-ci s'articule avec l'interférence.

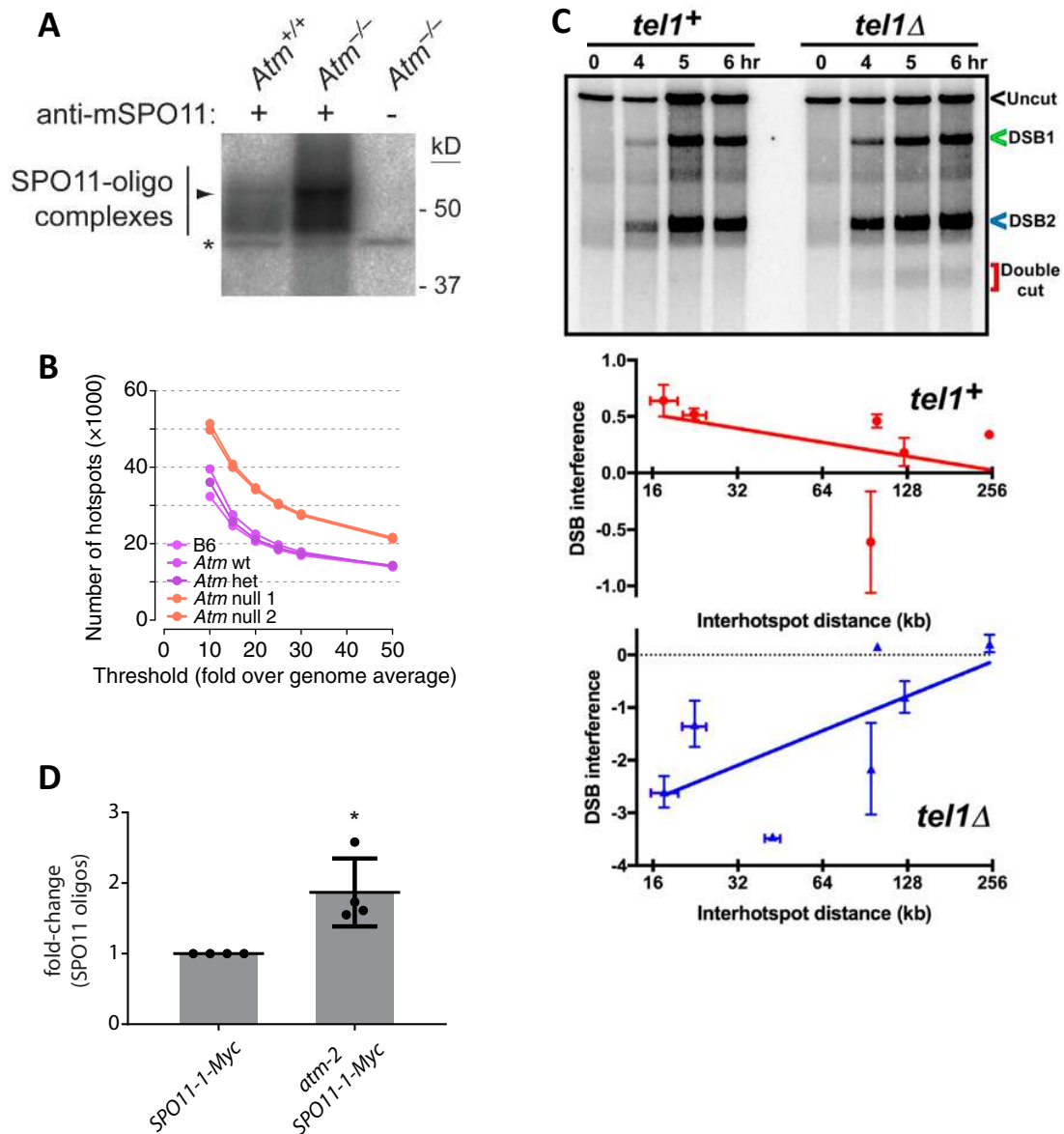


Figure 30 : Conservation du rôle d'ATM dans le contrôle de la formation des DSBs méiotiques

(A) Détection de Spo11-oligos en présence ou en absence d'ATM dans des cellules progénitrices mâles de souris. Spo11 est immunoprécipité avant radiomarquage des oligos attachés à Spo11. La détection se fait après migration en gel SDS-PAGE et transfert sur une membrane. (Lange et al., 2011)

(B) Nombre de hotspots détectés après détection et séquençage des Spo11-oligos en contexte sauvage, *Atm^{+/+}* et *Atm^{-/-}* chez la souris. (Lange et al., 2016)

(C) Mesure de l'interférence entre deux hotspots séparés par ~15kb sur le chromosome 2 chez *S. pombe* en présence et en absence de Tel1. (Fowler et al., 2018)

(D) Détection et quantification des Spo11-oligos chez *A. thaliana* en présence et en absence de AtATM. (Kurzbauer et al., 2021)

4. Conservation du mécanisme d'interférence

La régulation de la distribution des DSBs sur le génome par la protéine Tel1 ou son orthologue ATM est conservée dans d'autres organismes modèles : les mammifères, la levure fissipare, les plantes, ou encore la drosophile.

Chez les mammifères, le rôle d'ATM dans le contrôle du niveau de DSBs méiotiques est démontré dès 2011 par Lange *et al.* (Lange et al., 2011). En mesurant le niveau de SPO11-oligos dans des cellules méiotiques de souris mâles, les auteurs observent une multiplication par 10 du niveau de SPO11-oligos en contexte *Atm*^{-/-} par rapport au WT (Figure 30A). Cette augmentation est bien plus importante que chez *S. cerevisiae* où l'absence de Tel1 multiplie par 2 le niveau de DSBs global (Mohibullah and Keeney, 2017). En examinant la distribution des DSBs sur le génome en absence d'ATM, Lange *et al.* observent une augmentation de fréquence de cassures dans les domaines déjà riches en DSBs et une augmentation massive dans des régions normalement pauvres en DSBs, amenant à l'apparition de « nouveaux hotspots » (Figure 30B) (Lange et al., 2016). De plus, les auteurs observent une inhibition d'ATM sur la formation des DSBs sur d'importantes régions du génome, allant jusqu'à 40Mb. De plus, de récents travaux ont montré que des DCs sont également formées en méiose en absence d'ATM et que deux DSBs trop proches l'une de l'autre peuvent être réparées par NHEJ, entraînant l'apparition de mutations (Lukaszewicz et al., 2020). Comme son orthologue Tel1 chez la levure bourgeonnante, ATM joue donc un rôle important dans le paysage de cassures en méiose chez les mammifères.

Chez *S. pombe*, le rôle de Tel1 dans le contrôle de la formation des DSBs a également été bien étudié. En 2018, il a été démontré que le mécanisme d'interférence médié par la protéine Tel1 était conservé chez cette espèce (Fowler et al., 2018). En absence Tel1, les auteurs de l'étude observent l'apparition de DCs (Figure 30C), et mesurent une interférence négative entre les hotspots testés (Figure 30C). De plus, par des approches de capture de la conformation de la chromatine et par microscopie à fluorescence, les auteurs mettent en évidence l'existence de regroupement (ou « cluster ») de hotspots sur 200kb chez *S. pombe*. Les auteurs proposent ainsi que le regroupement de hotspots pourrait constituer une base physique à la mise en place de l'interférence et/ou de la compétition entre hotspots, une hypothèse déjà émise chez *S. cerevisiae* par Cooper *et al.* (Cooper et al., 2016; Fowler et al., 2018).

Le rôle d'ATM en méiose a été peu étudié chez d'autres espèces. Chez la drosophile, peu de DSBs sont formées en méiose (~14 par ovocytes). À une température non permissive pour la version thermosensible de *tefu*, l'homologue d'ATM, le nombre de foyers γ -H2AV augmente par rapport à la condition WT indiquant

qu'ATM contrôle la formation des DSBs méiotiques également chez la drosophile (Joyce et al., 2011). Enfin, cette fonction est également retrouvée chez *A. thaliana* où en absence d'AtATM une augmentation du niveau de Spo11-oligo est observée (Figure 30D) (Kurzbaueur et al., 2021).

Le contrôle de la formation et de la distribution des DSBs sur le génome par ATM semble donc largement conservé à travers le vivant. Bien que l'interférence n'ait pas été mesurée chez tous les organismes modèles, l'implication d'ATM dans le contrôle de la formation des DSBs suggère une conservation du mécanisme.

Contrairement à la perte de Tel1 chez *S. cerevisiae* où des spores viables sont toujours formées, la perte d'ATM est particulièrement délétère puisqu'elle est essentielle à de nombreux processus méiotiques, chez les mammifères notamment, comme en témoigne la stérilité des individus *Atm*^{-/-} chez la souris ou chez les patients souffrant d'Ataxie Téléangiectasie (*cf.* Chapitre III : Tel1/ATM). Ainsi, le contrôle de la formation et de la distribution des DSBs par ATM contribue au déroulé correct du programme méiotique chez les espèces multicellulaires.

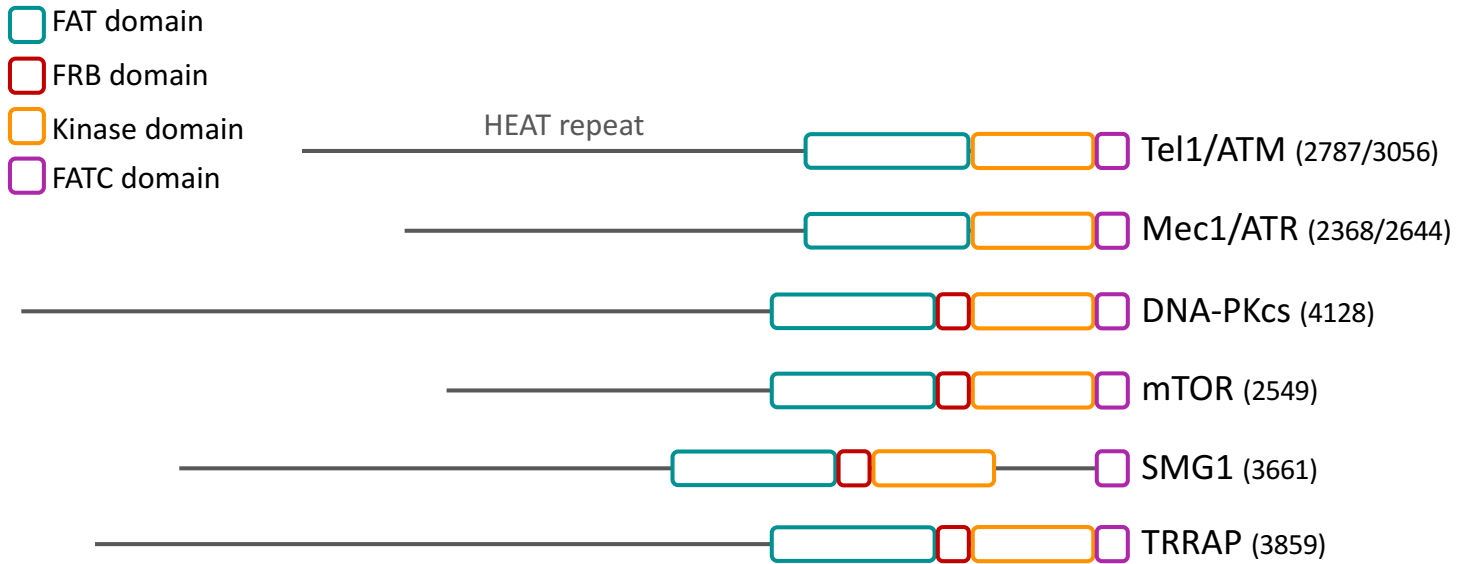


Figure 31 : Familles des PIKKs

Schématisme des protéines membres de la famille des kinases apparentées aux phosphoinositide 3-kinases : Tel1/ATM, Mec1/ATR, DNA-PKcs, mTOR, SMG1 et TRRAP. Pour chaque protéine sont représentés les domaines homologues identifiés. D' amino-terminal vers carboxy-terminal : des motifs HEAT répétés, un domaine FAT, un domaine kinase et un domaine FATC. Le domaine FRB (« FKBP12/Rapamycin-binding ») est également retrouvé dans les protéines DNA-PKcs, mTOR, SMG1 et TRRAP.

Adapté de Paull (Paull, 2015)

Chapitre III : Tel1/ATM

Le mécanisme d'interférence auquel mon sujet de thèse s'est intéressé repose sur la protéine Tel1/ATM. Celle-ci participe à différents processus méiotiques, mais joue également un rôle important dans la réponse aux dommages à l'ADN au cours du cycle végétatif, de la levure jusqu'à l'humain. L'absence héréditaire d'ATM est responsable du syndrome d'Ataxie Téléangiectasie, tandis que des mutations somatiques de celle-ci participent à l'émergence de pathologies cancéreuses. Ce dernier chapitre d'introduction a pour objectif de présenter la protéine Tel1/ATM, ses rôles principaux connus ainsi que les maladies qui y sont associées.

Partie I : La protéine Tel1/ATM

1. La famille des PIKKs

La protéine Tel1/ATM appartient à la famille des kinases apparentées aux phosphoinositide 3-kinases (PI3K), appelées « PI3K-related kinases » (« PIKKs »). Cette famille regroupe des protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires : mTor, impliquée dans la détection de nutriments et le contrôle du métabolisme ; SMG-1, un suppresseur de morphogénèse ; TRRAP, impliquée dans la régulation de la transcription ; et enfin, Tel1/ATM, Mec1/ATR et DNA-PKcs impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN (Paull, 2015). Les protéines de la famille PIKKs sont toutes des Sérines/Thréonines protéines kinases, hormis la protéine TRRAP dont le domaine kinase est inactif (Xiao et al., 2021). De plus, contrairement aux PI3Ks, la famille des PIKKs ne phosphorylent pas les lipides, mais des protéines. Celles-ci partagent des domaines homologues caractéristiques de cette famille qui se présentent de N- en C-terminal comme suit (Figure 31) :

- Des motifs HEAT répétés (« Huntingtin, elongation factor EF3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and the yeast kinase TOR1 ») constitués de deux hélices alpha reliées par une courte séquence ;
- Un domaine FAT (« Focal Adhesion Targeting »), un domaine partagé par de nombreuses familles de protéines kinases (Bosotti et al., 2000) mais dont la fonction est peu caractérisée ;
- Un domaine kinase, qui porte l'activité catalytique de ces protéines ;
- Un domaine FATC (FAT C-terminal) qui supporte des interactions protéines-protéines (Jiang et al., 2006; Ogi et al., 2015).

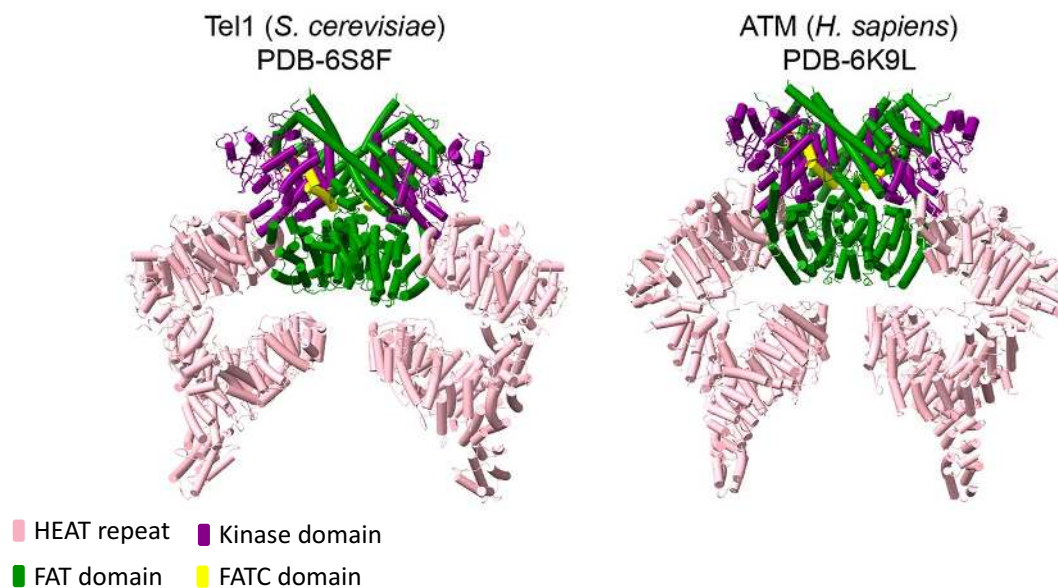


Figure 32 : Structure tridimensionnelle des protéines Tel1 et ATM

Structure 3-D des protéines Tel1 (*S. cerevisiae*) et ATM (*H. sapiens*) obtenues par cristallographie (Xin et al., 2019; Yates et al., 2020). La résolution des structures de protéines Tel1 et ATM a permis de mettre en évidence une structure dite « papillon ». La même structure a été retrouvée pour les protéines Mec1/ATR et DNA-PKcs (Xiao et al. 2021). Adapté de Xiao *et al.* (Xiao et al., 2021)

Dans les cellules, Tel1 et ATM existent principalement sous la forme d'un dimère qui est une forme inactive de la protéine. Lors de son activation, les protéines s'autophosphorylent entraînant alors leur monomérisation (Bakkenist and Kastan, 2003). Récemment, les structures de Tel1 et ATM sous forme de dimères et de monomères ont été résolues par cristallographie (Figure 32) (Baretic et al., 2017; Xin et al., 2019; Yates et al., 2020). Sous forme de dimère, les protéines présentent une structure dite en « papillon » (« butterfly structure ») avec un arrangement « head-to-head » des deux monomères (Figure 32). Les hélices α formées par les répétitions HEAT entraîne le repliement du domaine N-terminal et induisent une proximité physique entre les domaines N- et C-terminaux (Figure 32). L'activation de Tel1/ATM entraîne des changements de conformation de la protéine qui facilitent le recrutement des substrats au site actif (Xin et al., 2019).

2. Mise en évidence des protéines Tel1 et ATM

La première mention du terme Tel1 a été employée par Lustig et Petes en 1986 après avoir isolé des mutants affectant la longueur des télomères chez *S. cerevisiae* (Lustig and Petes, 1986) : *TEL1* pour « *telomere maintenance 1* ». Ce n'est cependant qu'en 1995 que les gènes codants pour *TEL1* chez *S. cerevisiae* et *ATM* chez les mammifères sont identifiés.

Dans un premier temps, le gène causant le syndrome d'Ataxie Téléangiectasie est identifié par le groupe de Savitsky *et al.* (Savitsky et al., 1995) après localisation de la région du génome portant le gène par Gatti *et al.* (Gatti et al., 1988). Cette équipe parvient par clonage positionnel à cloner et identifier le gène correspondant dans un chromosome artificiel de levure (« YAC ») et le nomme *ATM* pour « *Ataxia Telangiectasia Mutated* » (Savitsky et al., 1995). En examinant la séquence protéique d'*ATM*, les auteurs mettent en évidence une homologie avec les protéines Tor1, Tor2 et Mec1 chez *S. cerevisiae* ainsi que mTOR chez les mammifères (Savitsky et al., 1995). De plus, ils observent également une homologie entre la séquence *ATM* et celle de l'ORF *YBL088C* dont la fonction est encore inconnue chez *S. cerevisiae* (Savitsky et al., 1995).

La même année, les travaux de Morrow *et al.*, d'une part, et Greenwell *et al.*, d'autre part, mettent en évidence le gène codant pour la protéine Tel1 (Greenwell et al., 1995; Morrow et al., 1995). Ceux-ci démontrent que le mutant *TEL1* décrit par Lustig et Petes correspond à l'ORF *YBL088C*, séquencé quelques années plus tôt par Feldman *et al.* (Feldmann et al., 1994). Cet ORF présente une homologie importante avec d'autres membres des PIKKs identifiés quelques années plus tôt : Mec1, Tor1 et Tor2, et partagent notamment un domaine kinase putatif (Morrow et al., 1995). Enfin, les équipes montrent également une homologie entre *TEL1* et *ATM* (Greenwell et al., 1995; Morrow et al., 1995). Morrow *et al.* montrent qu'en plus des défauts télomériques connus du mutant *tel1Δ*, celui-ci présentent une forte sensibilité aux irradiations et à la présence d'agents génotoxiques tels que l'hydroxyurée (Morrow et al., 1995). Ils démontrent également que la présence de multiples copies du gène *TEL1* permet de limiter la sensibilité des mutants *mec1-1* à l'hydroxyurée (Morrow et al., 1995).

3. Activité kinase et cible de Tel1/ATM

L'une des caractéristiques principales de la famille des PIKK est la présence d'un domaine kinase en carboxy-terminal. Les protéines ATM, ATR, DNA-PKcs ainsi que leurs homologues fongiques Tel1 et Mec1 chez *S. cerevisiae* (Tel1 et Rad3 chez *S. pombe*), furent initialement décrits comme apparentés à la famille des PI3Ks de par l'homologie qu'il existe entre leurs domaines kinases (Greenwell et al., 1995; Morrow et al., 1995; Savitsky et al., 1995).

Dès 1996, Tel1 et Mec1 sont associés à la phosphorylation de facteurs impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN (Sanchez et al., 1996). L'activité kinase d'ATM et sa capacité à phosphoryler directement différents substrats protéiques sont rapidement démontrés par Banin *et al.* et Kim *et al.* (Banin, 1998; Kim et al., 1999). Kim *et al.* ont également déterminé le motif minimal essentiel phosphorylé par ATM : Sérine/Thréonine – Glutamine (S/TQ) (Kim et al., 1999). Par la suite, Mallory et Petes démontrent la capacité de Tel1 et Mec1 à phosphoryler directement un substrat protéique (Mallory and Petes, 2000), connu pour être phosphorylé par leurs homologues ATM, ATR et DNA-PKcs. Ceux-ci identifient également le motif SQ comme substrat de phosphorylation pour Tel1, à l'instar des autres membres de la famille des PIKKs (Mallory and Petes, 2000). Plusieurs cibles de Tel1/ATM sont rapidement identifiées, notamment des protéines impliquées dans la réponse au dommage à l'ADN : Rad53 chez *S. cerevisiae* (Sanchez et al., 1996) ou CHK2 chez les mammifères (Matsuoka et al., 2000), ou encore p53, MRE11, BRCA1, WRN chez les mammifères (Banin, 1998; Kim et al., 1999) etc. Des approches par spectrométrie de masse du protéome phosphorylé ont permis de mettre en évidence un grand nombre de cibles de Tel1/ATM et Mec1/ATR, sans pouvoir pour autant discriminer les cibles spécifiques de chaque protéine et sans que le rôle de cette phosphorylation soit toujours compris (Matsuoka et al., 2007; Smolka et al., 2007).

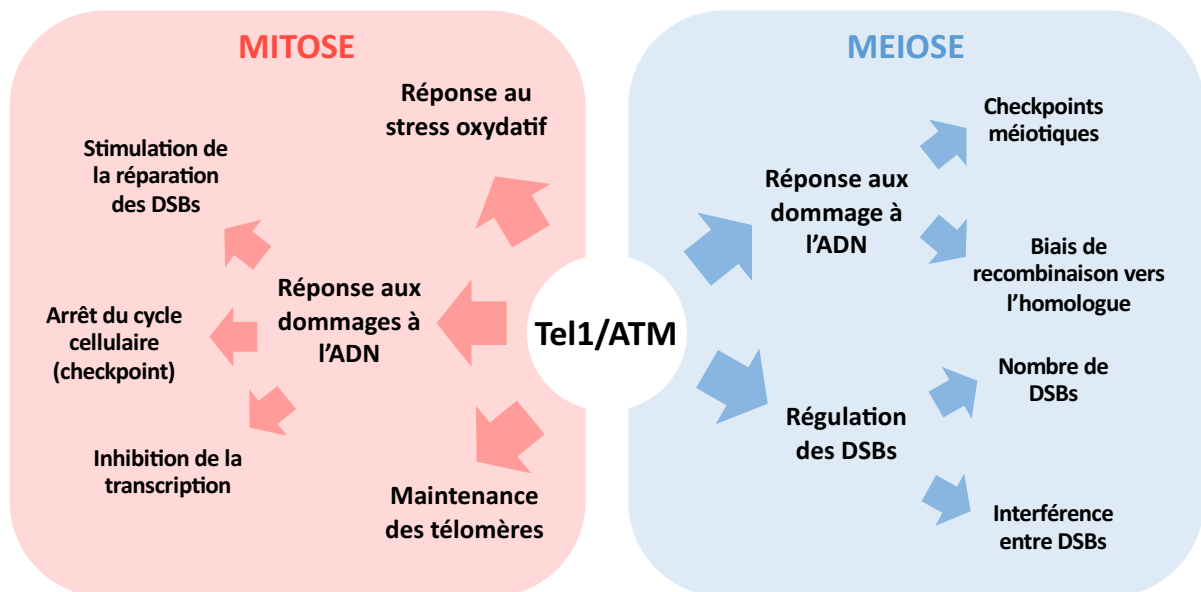


Figure 33 : Rôles canoniques de Tel1/ATM

Tel1/ATM participe à différents processus en cycle végétatif ainsi que des rôles plus spécifiques en contexte méiotique. En cycle végétatif, Tel1/ATM participe principalement au mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) *via* son rôle dans la réparation des DSBs, la mise en place de checkpoint cellulaire ou encore l'inhibition de la transcription à proximité d'une lésion. De plus, Tel1/ATM participe également à la maintenance des télomères ainsi qu'à la réponse au stress oxydatif. En méiose, le rôle de Tel1/ATM dans la réponse aux dommages à l'ADN permet l'activation de checkpoints méiotiques et la mise en place du biais vers l'homologue. En parallèle, Tel1/ATM participe à l'homéostasie des DSBs en régulant numériquement et spatialement la formation des DSBs. La régulation spatiale des DSBs passe notamment par la mise en place du mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques. Chez les mammifères, ATM participe également à d'autres processus, tel que la recombinaison V(D)J et semble également primordial au développement correct du système nerveux.

Partie II : Rôles de Tel1/ATM

La protéine Tel1/ATM est un élément clé de la réponse aux dommages à l'ADN (« DDR » pour « DNA Damage Response »), mais est également impliquée dans de nombreux processus.

Au cours du cycle végétatif, Tel1/ATM joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN en coordonnant la réparation des DSBs et l'activation de checkpoint induisant l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 33) (Waterman et al., 2020). Chez les mammifères, il a également été démontré que l'activation d'ATM dans le cadre du DDR participe à l'inhibition de la transcription en *cis* des DSBs (Shanbhag et al., 2010). Comme mentionné précédemment, Tel1/ATM est également impliquée dans la maintenance des télomères, en promouvant le recrutement de la télomérase (Tannous and Burgers, 2021). ATM joue également un rôle dans la réponse au stress oxydatif chez les mammifères, et ce indépendamment de son rôle dans le DDR : alors que dans le DDR, ATM est activée suite à son recrutement aux DSBs par le complexe MRN, la présence d'espèces réactive de l'oxygène ou d'H₂O₂ entraînent l'activation d'ATM et la phosphorylation de p53, indépendamment de MRN (Guo et al., 2010). Enfin, ATM est également impliquée dans le processus de recombinaison V(D)J qui s'opère dans les lymphocytes B et T (Chaumeil et al., 2013; Hewitt et al., 2009, 2017). Les voies dans lesquelles Tel1/ATM est impliquée étant nombreuses et les mécanismes complexes, tous les aspects de Tel1/ATM ne pourront être présentés dans cette partie. Je me concentrerai donc sur le rôle et le mode d'action de Tel1/ATM dans la réparation des DSBs et l'arrêt du cycle cellulaire. Je présenterai également brièvement le rôle de Tel1 dans la maintenance des télomères et celui d'ATM dans la recombinaison V(D)J.

Tel1/ATM joue également des rôles plus spécifiques en contexte méiotique. Tel1/ATM participe notamment à l'homéostasie des DSBs en régulant spatialement la formation des DSBs méiotiques *via* la mise en place de l'interférence et en contrôlant le niveau de DSBs méiotiques. Tel1/ATM joue également un rôle dans la mise en place d'un checkpoint méiotique en présence de DSBs non maturées, et est impliquée dans le biais vers l'homologue. Certains de ces rôles ont été présentés au cours des Chapitres I et II, et ne seront pas repris ici mais son rôle dans la mise en place du checkpoint méiotique sera présenté. De plus, ATM joue un rôle essentiel en méiose chez les mammifères, et cet aspect sera également abordé.

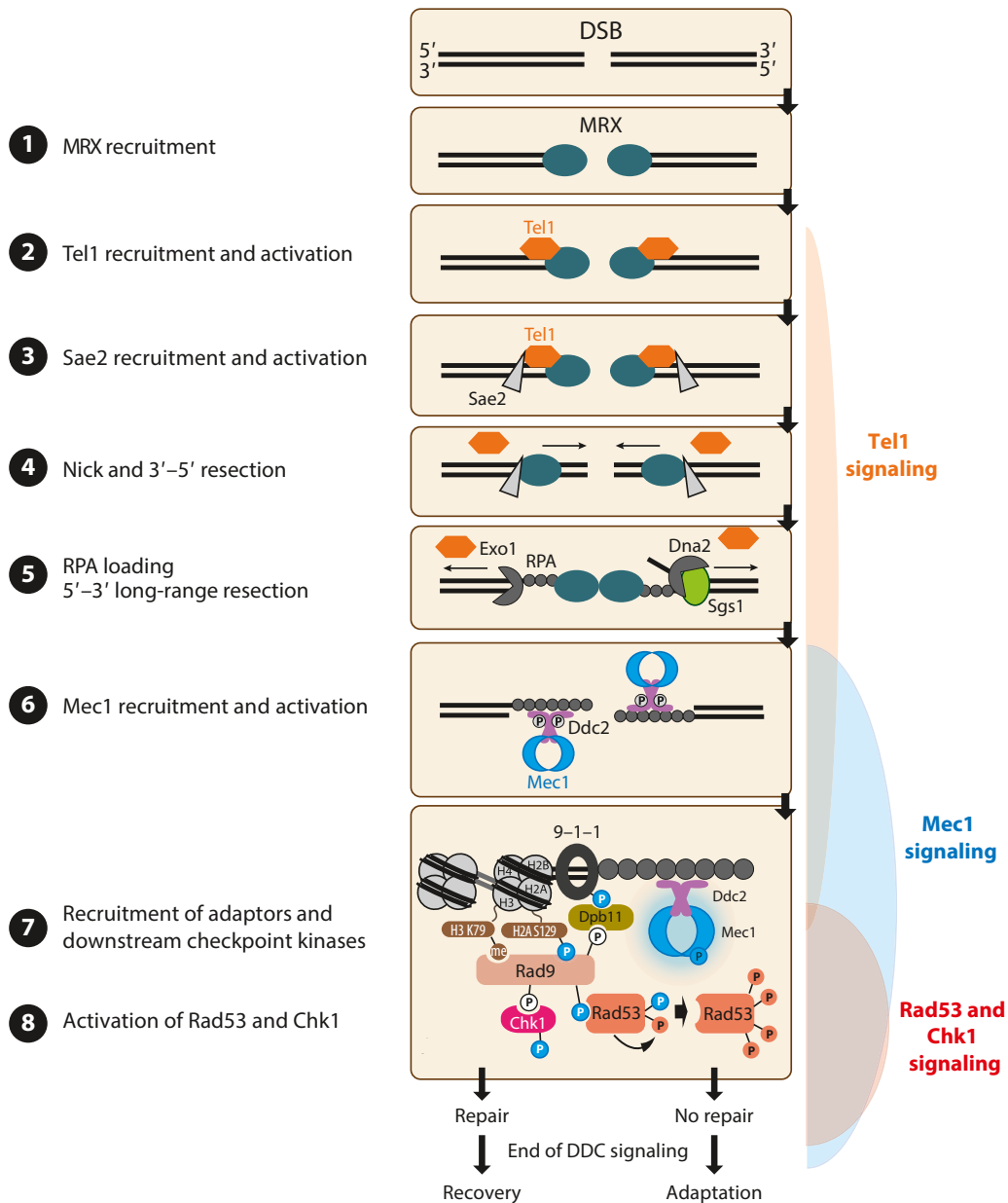


Figure 34 : Voie de réponse aux dommages à l'ADN en présence de DSBs

Détection des DSBs et voie de signalisation en réponse à la présence de DSBs chez *S. cerevisiae*. La prise en charge des DSBs dépend dans un premier temps de la protéine Tel1, puis de la protéine Mec1 dans un second temps. Les DSBs sont premièrement reconnus par le complexe MRX, qui induit le recrutement de la protéine Tel1 et de la protéine Sae2. MRX et Sae2 initient la résection des DSBs sur une courte distance, puis Exo1 et Dna2 - Sgs1 permettent une résection longue distance. Cette étape de maturation amène à la formation d'une extrémité 3' sortante simple brin, qui est rapidement recouvert par la protéine RPA. La présence d'ADN simple brin et de RPA induit le recrutement de Mec1 et son activation. La phosphorylation de H2a par Tel1 et Mec1 permet la stabilisation de Rad9 qui permet le recrutement de Rad53. L'activation de Rad53 permet d'une part de limiter la résection des DSBs et d'autre part une activation complète du checkpoint cellulaire. (Waterman et al., 2020)

1. Réponse aux dommages à l'ADN

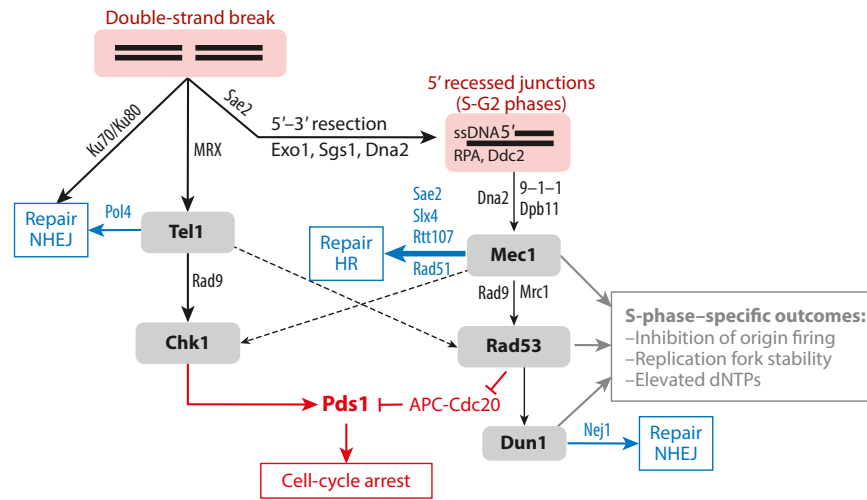
Plusieurs types de dommages peuvent altérer la molécule d'ADN au sein des cellules : adduits, dimères de thymidine, cassures simple brin ou double-brin... Tel1/ATM est notamment impliquée dans la gestion des DSBs. Celles-ci peuvent être réparées *via* deux mécanismes : la ligature des extrémités (NHEJ) et la recombinaison homologue. Dans cette partie, je présenterai le rôle de Tel1/ATM dans le mécanisme de réparation par recombinaison homologue.

Au sein du mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN, nous pouvons distinguer deux phases qui reposent sur les deux régulateurs clés de ce mécanisme : une première phase dépendante de Tel1/ATM et une seconde dépendante de Mec1/ATR (Figure 34). Chez *S. cerevisiae*, les rôles de Tel1 et Mec1 ont longtemps été considérés comme redondants et ce point sera abordé par la suite. Tel1/ATM est notamment impliquée dans l'étape de reconnaissance des DSBs et les premières étapes de maturation. Mec1/ATR est quant à elle recrutée en présence d'ADN simple brin et intervient dans un second temps pour activer complètement le DDR *via* la phosphorylation de Rad53/CHK1. Dans cette partie, je présenterai donc le rôle de Tel1 dans la reconnaissance des DSBs, *via* notamment son interaction avec le complexe MRX/N et ce qui est connu de l'activation de Tel1/ATM. Par la suite, je présenterai son rôle dans la stimulation de la réparation de l'ADN, et enfin, son rôle dans de checkpoint mitotique.

1.1 Distinction entre Tel1/ATM et Mec1/ATR

Chez *S. cerevisiae*, le rôle de Tel1 dans le DDR a peu été étudié, son absence n'entraînant que peu de sensibilité aux dommages de l'ADN contrairement à Mec1 qui est essentielle à la survie cellulaire. De nombreux substrats de phosphorylation sont communs à Tel1 et Mec1, et les deux protéines ont longtemps été considérées comme redondantes. Cependant, le double mutant *tel1Δ mec1Δ* (également *smf1Δ*, une mutation permettant de maintenir viable les souches *mec1Δ*) présente une sensibilité aux agents génotoxiques plus importante que les simples mutants *tel1Δ* et *mec1Δ*, montrant que les deux protéines participent indépendamment au DDR (Mantiero et al., 2007; Morrow et al., 1995; Sanchez et al., 1996; Vialard et al., 1998). De plus, en absence de Mec1, Tel1 est capable d'assurer certaines fonctions de Mec1 en phosphorylant certains de ses substrats comme Rad53 (Mantiero et al., 2007; Sanchez et al., 1996). Néanmoins, Tel1 n'est capable d'activer le DDR qu'en présence de plusieurs DSBs et en absence de Mec1, tandis que Mec1 est capable d'activer le DDR

a Budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)



b Mammals

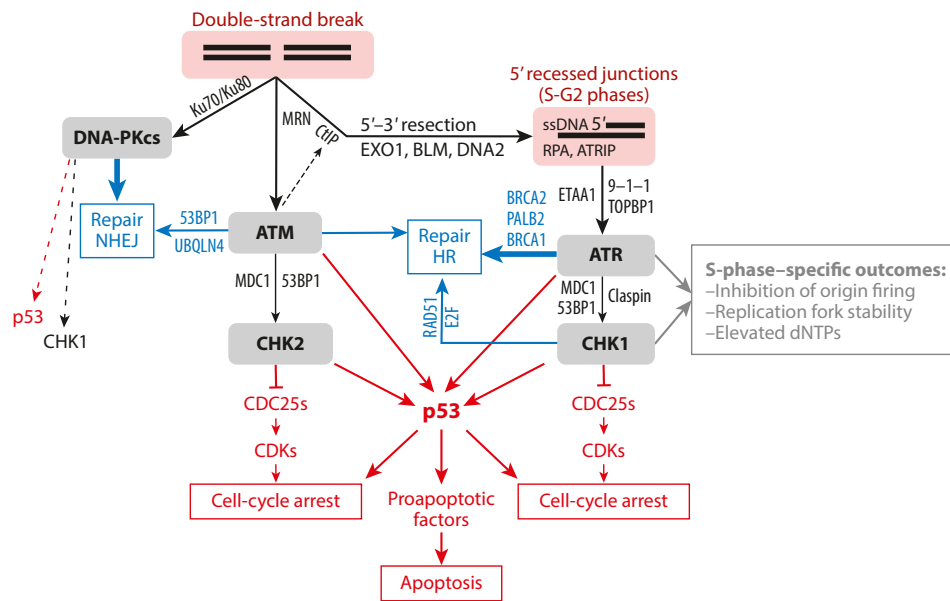


Figure 35 : Cascade de signalisation en réponse à la présence de DSBs chez *S. cerevisiae* et chez les mammifères

Schématisation des cascades de signalisation en réponse à la présence de DSBs sur le génome et du rôle des principales kinases régulatrices. Les protéines notées en bleues correspondent aux protéines effectrices régulant la réparation des DSBs. Les protéines notées en rouge correspondent aux facteurs induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. (Waterman et al., 2020)

dès l'apparition d'une DSB. En effet, en absence de Mec1, la génération de 7 cassures HO permet d'induire une phosphorylation de Rad53 par Tel1 ce qui marque l'activation du DDR, tandis que la génération d'une seule cassure n'aboutit pas à la phosphorylation de Rad53 (Mantiero et al., 2007). De manière intéressante, l'utilisation de version « dominante » de Tel1 (*TEL1-hy*) permet de contrebalancer l'hypersensibilité aux agents génotoxiques et les défauts de checkpoints observés en absence de Mec1, et de réactiver le mécanisme de DDR (Baldo et al., 2008). La version dominante de Tel1 permet également une meilleure détection des DSBs et une accumulation plus rapide d'ADN simple brin aux sites de cassure, augmentant ainsi l'activation de Mec1 (Baldo et al., 2008). Ainsi, il apparaît que Tel1 joue un rôle dans le mécanisme de DDR chez *S. cerevisiae* bien que celui-ci soit majoritairement dépendant de Mec1 (Mantiero et al., 2007; Usui et al., 2001).

Chez les mammifères, les voies de signalisation dépendantes d'ATM et ATR sont plus distinctes et les deux protéines jouent un rôle essentiel dans le DDR et l'activation des checkpoints cellulaires (Maréchal and Zou, 2013). En effet, les patients atteints d'ataxie télangiectasie, dont la protéine ATM est non-fonctionnelle (*cf.* Partie III : Maladies Associées à ATM), présentent une forte sensibilité aux rayons ionisants (Rothblum-Oviatt et al., 2016), là où l'absence de Tel1 est peu délétère chez *S. cerevisiae*. Cette différence peut s'expliquer par leur rôle dans l'activation des protéines kinases effectrices en aval d'ATM et d'ATR d'une part et de Tel1 et Mec1 d'autre part. Chez les mammifères, ATM est responsable de l'activation de la kinase CHK2 tandis qu'ATR responsable de l'activation de CHK1 (Figure 35B). Ensemble, CHK1 et CHK2 participent à l'activation de la protéine p53 et à l'arrêt du cycle cellulaire. Chez *S. cerevisiae*, en revanche, Rad53, l'orthologue de CHK2, est principalement activée par Mec1 (Figure 35). Mec1 participe également à l'activation de Chk1, la protéine effectrice en aval de Tel1 (Figure 35). La protéine Tel1 quant à elle, participe à l'activation de Chk1, et à celle de Rad53 en absence de Mec1 et en présence de DSBs non maturées (Usui et al., 2001). Les deux voies de signalisations dépendantes de Tel1/ATM d'un côté et Mec1/ATR de l'autre sont donc plus distinctes chez les mammifères que chez la levure (Figure 35).

1.2 Reconnaissance des DSBs via le complexe MRX/N et activation de Tel1

La détection des DSBs est un élément essentiel de l'activation du DDR et des checkpoints cellulaires. De nombreuses études suggèrent que la détection des DSBs repose sur le complexe MRX/N, et celui-ci est présenté comme un « senseur » de DSBs. En effet, chez *S. cerevisiae*, Lisby *et al.* ont observé la formation de foyers par

différentes protéines impliquées dans la réparation de l'ADN après irradiation des cellules par microscopie à fluorescence (Lisby et al., 2004). Au cours du temps, il apparait que le complexe MRX et la protéine Tel1 forment des foyers plus rapidement que RPA, Ddc1 et Ddc2 qui participent également au DDR (Lisby et al., 2004). De plus, en absence de Mre11, Rad50 ou Xrs2, les auteurs n'observent pas de foyer Tel1 ou d'autres protéines impliquées dans le DDR, et concluent ainsi que le complexe MRX est recruté en premier aux sites de DSBs (Lisby et al., 2004). En parallèle, des expériences de ChIP ont permis de démontrer le recrutement de la protéine Xrs2 aux sites de cassures, et ce même en contexte *tel1Δ* (Nakada, 2003), confirmant un recrutement du complexe MRX en amont de celui de Tel1.

La protéine Tel1/ATM est recrutée aux sites de cassures par le complexe MRX/N (Figure 34). En 2003, Nakada *et al.* démontrent notamment que le recrutement de Tel1 aux sites de cassures et aux télomères courts, reconnus alors comme des DSBs par MRX, dépend du domaine carboxy terminal de Xrs2 (Nakada, 2003). En effet, la génération du mutant *xrs2-11*, dont les 162 derniers acides aminés ont été tronqués, abolit l'interaction entre Tel1 et Xrs2 ainsi que le recrutement de la protéine Tel1 au site de coupure HO sans pour autant affecter le recrutement de la protéine mutée Xrs2-11 (Nakada, 2003). De plus, le mutant *xrs2-11* abolit également la phosphorylation de Rad53 dépendante de Tel1 dans un fond *sae2Δ mec1-81* (Nakada, 2003). Le domaine C-terminal de Xrs2 permettant son interaction avec Tel1 est conservé chez son orthologue NBS1 chez *S. pombe* et chez les mammifères où il médie également le recrutement et l'activation d'ATM (Falck et al., 2005; You et al., 2005). Au sein du domaine C-terminal de Xrs2, deux acides aminés ont été identifiés comme important pour l'interaction de Xrs2 et Tel1 (Ma and Greider, 2009). La substitution des acides aminés K846 et F847 par des alanines réduit l'interaction entre Tel1 et Xrs2 lorsque celle-ci est analysée par co-immunoprécipitation (Ma and Greider, 2009). De plus, le mutant *xrs2-K846A/F847* affecte partiellement les fonctions télomériques de Tel1 (Ma and Greider, 2009), suggérant un rôle de ces acides aminés dans l'interaction entre Tel1 et Xrs2 bien que celle-ci n'ait pas été testée dans ce mutant. Il a également été démontré que les 9 derniers acides aminés de Tel1 sont essentiels à son interaction avec Xrs2 (Ogi et al., 2015). En effet, la protéine mutante Tel1-ΔC n'est plus capable d'interagir avec la protéine Xrs2, n'est plus recrutée au site de cassure HO et la phosphorylation de Rad53 dépendante de Tel1 est abolie dans ce contexte (Ogi et al., 2015). Ces différentes études permettent de mettre en lumière l'importance de l'interaction entre Tel1 et Xrs2 pour le recrutement de Tel1 aux sites de cassures d'une part, mais également pour l'activité de Tel1. Néanmoins, le motif TAN localisé en amino terminal de la protéine Tel1, et conservé jusqu'à *A. thaliana*, semble également

essentiel au recrutement de Tel1 à l'ADN, et ce indépendamment de son interaction avec Xrs2 (Seidel et al., 2008). En absence de ce motif, l'interaction de Tel1 et Xrs2 n'est pas affectée mais la protéine Tel1 n'est plus détectée au site de cassure HO et n'est plus capable de phosphoryler Rad53 (Seidel et al., 2008). Le motif TAN semble donc participer au recrutement de Tel1 indépendamment de Xrs2, ou à la stabilisation de Tel1 aux sites de cassures (Seidel et al., 2008).

De plus, il apparaît que l'activation de Tel1/ATM dépend de son recrutement aux sites de cassures par MRX/N (Figure 34). L'activation de Tel1/ATM se traduit notamment par la phosphorylation rapide de H2A sur son résidu S129 chez *S. cerevisiae* (γ H2A) ou S139 chez les mammifères (γ H2AX), qui est également phosphorylée par Mec1/ATR (Blackford and Jackson, 2017; Downs et al., 2000; Shroff et al., 2004). H2A est phosphorylée très précocement en réponse à la formation des DSBs (Lisby et al., 2004) et cette marque est utilisée comme un outils de détection des DSBs dans les cellules. Plusieurs études *in vitro* ont permis de démontrer que l'activité de Tel1/ATM était plus importante en présence de MRX/N et de fragments d'ADN : cette activité se traduit par une phosphorylation plus importante de Rad53 par Tel1 et de CHK2 et p53 par ATM (Dupré et al., 2006; Fukunaga et al., 2011; Lee and Paull, 2005; Paull and Lee, 2005). L'ensemble de ces études suggèrent que le complexe MRX/N participe au contrôle de l'activité kinase de Tel1/ATM via son recrutement aux DSBs, et récemment une étude *in vitro* a démontré que la présence d'ADN et du complexe MRX stimule de manière synergique l'activité de Tel1 (Hailemariam et al., 2019a). De manière intéressante, il a également été démontré que l'activité de Tel1/ATM est augmentée en présence d'extrémités d'ADN « bloquées » (« blocked-end »). En effet, Fukunaga *et al.* ont montré une augmentation de l'activité catalytique de Tel1 en présence d'extrémités modifiées à l'aide de biotine liées de manière covalente à l'ADN (Fukunaga et al., 2011). Les auteurs démontrent *in vitro* que la présence d'une biotine aux extrémités 5' des fragments n'altère pas le recrutement de MRX mais diminue l'activité de dégradation de l'ADN du complexe (Fukunaga et al., 2011). Dans ce contexte, ils observent une augmentation de la phosphorylation de Rad53 par Tel1 (Fukunaga et al., 2011), suggérant que l'activité catalytique de Tel1 est stimulée en présence d'extrémités bloquées. Le même phénomène a été démontré pour ATM dans des cellules de mammifères en culture. Alvarez-Quilon *et al.* ont traité des cellules avec de l'étoposide, un anti-tumoral utilisé pour bloquer l'activité de religation de la topoisomérase II (TOP2), générant ainsi des DSBs dont les extrémités 5' sont bloquées par TOP2 (Álvarez-Quilón et al., 2014). De manière intéressante, ce protocole expérimental permet de mimer l'action de SPO11 qui reste lié de manière covalente aux extrémité 5' des DSBs lors de leur catalyse. La liaison covalente de TOP2 à l'ADN

induite peut ensuite être supprimée par la « Tyrosyl DNA phosphodiesterase 2 » (TDP2) afin d'obtenir des DSBs aux extrémités non bloquées (Álvarez-Quilón et al., 2014). En comparant la génération de foyers γ H2AX, témoignant de l'activité d'ATM, les auteurs ont observés une augmentation du nombre de foyers en présence de DSBs aux extrémités bloquées par TOP2, suggérant ainsi que l'activité d'ATM est augmentée en présence d'extrémités bloquées, à l'image de ce qui a été observé pour Tel1 (Álvarez-Quilón et al., 2014).

Récemment, une étude *in vitro* a montré que la présence de nucléosome inhibe l'activité de Tel1, suggérant que l'activité de Tel1 est stimulée dans les régions appauvries en nucléosomes (Hailemariam et al., 2019a). De manière intéressante, il a été montré qu'un remodelage de la chromatine s'opère au site de cassure HO lors de la formation d'une DSB, et ce remodelage est dépendant de la protéine MRX et du remodeleur de la chromatine INO80 (Tsukuda et al., 2005). Ce remodelage pourrait ainsi participer à l'activation de la protéine Tel1 aux sites de cassures.

1.3 Maturation des DSBs et implication de Mec1/ATR

Lorsqu'une DSB est détectée, celle-ci va pouvoir être réparée par NHEJ ou HR. Le choix entre ces deux voies de réparation va dépendre de la phase du cycle cellulaire et du statut de phosphorylation de la protéine Sae2/CtIP : en présence d'une chromatide sœur, en phase S/G2, l'action de Cdk1 (Cdc28 chez *S. cerevisiae*) va promouvoir la réparation par HR (Aylon et al., 2004; Ira et al., 2004). En phase S/G2, la protéine Sae2/CtIP est phosphorylée par Cdk1 permettant ainsi son association au complexe MRX/N (Huertas and Jackson, 2009; Huertas et al., 2008). Le recrutement de Sae2 permet d'éliminer le complexe Ku du site de cassure et d'initier la maturation des DSBs, limitant alors la réparation par NHEJ et favorisant la réparation par HR (Huertas and Jackson, 2009; Huertas et al., 2008). La protéine Tel1/ATM favorise également l'activité de MRX/N – Sae2/CtIP. En effet, en absence de Tel1, l'étape dite de « résection » est moins efficace (Mantiero et al., 2007). Tel1 promeut l'activité de résection du complexe MRX, et ce indépendamment de son activité kinase, probablement en stabilisant le complexe au site de cassure (Cassani et al., 2016). La protéine Sae2 est également phosphorylée par Tel1 – Mec1 ce qui participe à la voie du DDR (Baroni et al., 2004), mais il n'a à ce jour pas été démontré de lien entre cette phosphorylation et l'initiation de la résection.

Sae2/CtIP et MRX/N initient donc la maturation des DSBs *via* un clivage endonucléolytique de part et d'autre de la cassure (Mimitou and Symington, 2008). Cette activité est notamment importante en présence d'extrémités « bloquées », qui peuvent être générées par certains agents génotoxiques ou en méiose par la protéine

Spo11 (*cf.* Chapitre I : La méiose). Comme présenté dans le Chapitre I – 2.1 – Maturation des DSBs, ce clivage endonucléolytique est suivi d'une résection 3'→5' dépendante de l'activité exonucléase de Mre11 (Figure 34) (*cf.* Chapitre I : La méiose) (Garcia et al., 2011).

De manière concomitante à la résection 3'→5', une résection dite « longue distance » est initiée en 5'→3' permettant la formation d'une extrémité 3' sortante. En méiose, cette étape est réalisée par la protéine Exo1, tandis qu'au cours du cycle végétatif, le complexe Sgs1 – Dna2 participe également à la résection (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). Chez *S. cerevisiae*, l'inactivation de Exo1 ou de Sgs1-Dna2 ne confère que des défauts mineurs de résection, et c'est l'inactivation simultanée des deux voies de résections qui abolit la résection longue distance (Mimitou and Symington, 2008; Zhu et al., 2008). La génération d'extrémités 3' simple brin aboutit alors à l'activation de Mec1/ATR et la signalisation du DDR dépend alors de cette dernière (Figure 34). Mec1/ATR est recrutée aux sites de cassures par l'intermédiaire de l'adaptateur Ddc2 qui s'associe à RPA, une protéine qui reconnaît et recouvre l'ADN simple brin (Chen and Wold, 2014). La kinase Mec1/ATR va notamment permettre de limiter la résection des DSBs et activer les checkpoints cellulaires. En effet, l'activité de Sgs1 – Dna2 est contrôlée et limitée par la présence de la protéine Rad9/53BP1 (Bonetti et al., 2015; Ferrari et al., 2015). La protéine Rad9/53BP1 interagit avec la forme méthylée de H3K79, et cette interaction est renforcée par γ H2A (Figure 34) (Bonetti et al., 2018). Rad9/53BP1 est également phosphorylée par Mec1/ATR, permettant le recrutement, la phosphorylation *via* Mec1/ATR et l'activation de Rad53 (Figure 34) (Schwartz et al., 2002). L'activation de Rad53, une kinase effectrice du DDR, permet alors la phosphorylation et l'inhibition de Exo1, stoppant ainsi l'étape de résection des DSBs (Tisi et al., 2020). Cependant, l'action de Rad9 et Rad53 peut être contrecarrée par des remodeleurs de la chromatine telle que Fun30 : il a été montré que cette protéine favorise la résection et limite la fixation de Rad9 aux sites de cassures (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012).

1.4 Arrêt du cycle cellulaire

Le checkpoint mitotique G2/M permet de stopper le cycle cellulaire jusqu'à la réparation des DSBs et peut entraîner la mort de la cellule par apoptose dans le cas où une lésion ne peut être réparée chez les organismes multicellulaires. L'arrêt du cycle cellulaire est notamment médié par la phosphorylation et l'activation de Rad53 et Chk1 chez *S. cerevisiae*, et CHK1/2 et p53 chez les mammifères (Figure 35).

Chez *S. cerevisiae*, Rad53 est principalement activée par Mec1, mais Tel1 peut également participer à son activation. En effet, dans un contexte *mec1 Δ* , l'absence de

Sae2 conduit à une phosphorylation importante de Rad53 (Usui et al., 2001). Dans un contexte *sml1Δ mec1Δ sae2Δ tel1Δ*, la phosphorylation de Rad53 est abolie, démontrant que la phosphorylation de Rad53 en absence de Sae2 dépend de Tel1 (Usui et al., 2001). De plus, Usui *et al.* ont démontré que ce checkpoint repose également sur Mre11 et son interaction avec les autres membres du complexe MRX (Usui et al., 2001). Ce checkpoint est nommé le « TM checkpoint », pour « Tel1 – Mre11 checkpoint ». Par la suite, il a démontré que Tel1 et Mre11 sont fortement recrutées ou stabilisées au site de cassure HO en absence de Sae2 (Clerici et al., 2014; Yu et al., 2018). De manière intéressante, le mutant *mre11-nd*, qui présente également des défauts de résection des DSBs, ne montre pas d'hyperphosphorylation de Rad53 bien que Tel1 et Mre11 soient fortement recrutées aux DSBs, ce qui suggère que Sae2 participe à limiter le TM checkpoint (Yu et al., 2018).

Chez les mammifères, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose dépendent de l'activation de p53, qui contrôle de nombreux aspects de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, et de la phosphorylation de CDC25 qui participe à l'activation des CDK (Lukas et al., 2004). La protéine p53 est activée par ATM, ATR et leurs kinases effectrices CHK2 et CHK1 (Figure 35) et son activation amène à un arrêt du cycle cellulaire (Lukas et al., 2004). L'inactivation de CDC25 est quant à elle dépendante de CHK1 et CHK2 (Figure 35) et induit un arrêt transitoire du cycle cellulaire (Lukas et al., 2004).

2. Rôle de Tel1/ATM en méiose

La protéine Tel1/ATM participe à de nombreux processus méiotiques tels que la régulation de la formation des DSBs méiotiques, la mise en place du biais vers l'homologue ou encore la mise en place de checkpoint méiotique. Dans le Chapitre II – Régulation des DSBs et Interférence, le rôle de Tel1/ATM dans la régulation des DSBs méiotiques a déjà été présenté. Brièvement, Tel1/ATM participe à l'homéostasie entre DSBs en contrôlant numériquement et spatialement la formation des DSBs méiotiques. Tel1 permet notamment la mise en place du mécanisme d'interférence, décrit dans le Chapitre II. De plus, le rôle de Tel1/ATM dans le biais vers l'homologue a également été présenté dans le Chapitre I. Ces aspects ne seront donc pas abordés à nouveau ici. Enfin, ATM joue un rôle essentiel dans le processus méiotique et les rôles spécifiques connus de la protéine seront présentés ici.

2.1 Checkpoint méiotique

De la même manière qu'en cycle végétatif, Tel1 participe à la mise en place du TM checkpoint en méiose (Usui et al., 2001). En effet, dans un contexte *rad50S* où les DSBs ne sont pas maturées, la progression méiotique est ralentie et/ou stoppée et seules 50% des cellules d'une population en méiose passent la première division méiotiques (Usui et al., 2001). Cet arrêt du cycle méiotique est dépendant de Tel1, puisque le double mutant *rad50S tel1Δ* progresse rapidement en méiose et atteint 80% de cellules ayant passé la MI après 8h en milieu de sporulation (Usui et al., 2001). Ce checkpoint est spécifique de la présence de DSBs non maturées, puisqu'en contexte *dmc1Δ* où les DSBs sont « hyper-résectées » la progression méiotique est bloquée en prophase I par la protéine Mec1, et non Tel1 (Usui et al., 2001). En contexte *sae2Δ* ou *rad50S*, la protéine Spo11 reste liée de manière covalente à l'ADN, ce qui représente un cas de figure d'extrémités bloquées, et ce contexte est particulièrement propice à l'activation de Tel1 (Fukunaga et al., 2011). De manière intéressante, le checkpoint méiotique diffère de celui mis en place en cycle végétatif puisqu'il n'est pas dépendant de l'activation de Rad9 et Rad53 par Tel1 et Mec1 (Cartagena-Lirola et al., 2006; Lydall et al., 1996; Roeder and Bailis, 2000). Le ralentissement et/ou l'arrêt du cycle méiotique passe par la phosphorylation de Hop1, Red1 et Mek1 (Subramanian and Hochwagen, 2014). En effet, la perte de Hop1 ainsi qu'une forme non phosphorylable de Hop1 (*hop1^{SCD}*) abolissent le checkpoint méiotique mis en place en contexte *rad50S* ou *dmc1Δ* suggérant que Tel1 et Mec1 mettent en place le checkpoint méiotique *via* la phosphorylation de Hop1 (Carballo et al., 2008). En contexte *sae2Δ* ou *rad50S*, Hop1 est massivement phosphorylée par Tel1 et Mec1. En absence de Tel1 la

phosphorylation de Hop1 est complètement perdue en contexte *rad50S*, tandis qu'en absence de Mec1, elle n'est que réduite (Carballo et al., 2008). Hop1 subit donc deux vagues de phosphorylation, une première dépendante de Tel1 qui s'avère essentielle à la seconde vague de phosphorylation par Mec1 (Carballo et al., 2008). La phosphorylation de Hop1 permet le recrutement et l'activation de la protéine kinase effectrice méiotique Mek1, considéré comme un analogue fonctionnel de Rad53 (Carballo et al., 2008). Cette dernière permet notamment de bloquer la sortie du stade pachytène en phosphorylant la protéine Ndt80 (Chen et al., 2018). D'autres cibles de Mek1 pourraient potentiellement participer aux checkpoints méiotiques, mais celles-ci n'ont pas été identifiées jusqu'à présent. En parallèle, la phosphorylation de Hop1 par Tel1/Mec1 et l'activation de Mek1 permet la mise en place du biais vers l'homologue lors de la réparation des DSBs méiotiques (Chapitre I – Biais vers l'homologue). De manière intéressante, en contexte *dmc1Δ*, l'inactivation de *MEK1*, *HOP1* ou *RED1* permet la réparation efficace des DSBs avec la chromatide sœur, suggérant que l'arrêt de la progression méiotique induit par la présence de DSBs non réparés est liée au biais vers l'homologue (Carballo et al., 2008; Niu et al., 2005, 2007).

2.2 ATM est essentielle à la gamétogénèse chez les mammifères

Chez *S. cerevisiae*, l'absence de Tel1 n'impacte pas la capacité des cellules à sporuler et les gamètes formés sont majoritairement viables, tandis que chez les mammifères l'absence d'ATM conduit à la stérilité des individus. Cet aspect témoigne du rôle essentiel d'ATM en méiose. De la même manière que son orthologue fongique, ATM participe à la régulation de la formation des DSBs, notamment *via* la mise en place de l'interférence entre DSBs méiotiques (Lange et al., 2011; Lukaszewicz et al., 2020), néanmoins la dérégulation des DSBs ne suffit pas à expliquer la stérilité des individus.

En absence d'ATM, la gamétogénèse est fortement perturbée dès l'étape de leptotène aboutissant à l'apoptose des cellules chez les souris mâles et femelles (Barlow et al., 1998; Xu et al., 1996). L'analyse de la formation du SC par microscopie électronique montre des défauts de formation de l'axe et d'appariement des chromosomes homologues (Figure 36) et de nombreuses cellules présentent une fragmentation des chromosomes (Barlow et al., 1998; Xu et al., 1996). De plus, il a également été montré par immunofluorescence qu'en absence d'ATM, certaines protéines essentielles à la réparation des DSBs sont mal localisées sur le génome (Barlow et al., 1998) certainement dû à un défaut de signalisation de la présence de DSBs. Le défaut de progression méiotique des cellules *Atm*^{-/-} peut cependant être partiellement aboli dans un hétérozygote *Spo11*^{+/-} : dans ce contexte, l'augmentation du nombre de DSBs due à l'absence d'ATM est partiellement contrebalancée par la

perte d'une copie de *SPO11* (Lange et al., 2011) (cf. Chapitre II : Régulation des DSBs et Interférence) et les cellules sont capables de progresser jusqu'en métaphase I avant d'entrer en apoptose (Bellani et al., 2005). Ce phénotype a ainsi permis d'étudier plus en détail le rôle d'ATM en méiose. Barchi *et al.* ont notamment observé des défauts de synapse entre les chromosomes sexuels X et Y en absence d'ATM (Barchi et al., 2008). Les auteurs proposent que ce défaut de synapse résulte d'une absence de CO entre les chromosomes X et Y, amenant à l'apparition de chromosomes « retardataires » lors de la métaphase I et participant ainsi à l'entrée en apoptoses des cellules (Barchi et al., 2008). L'absence d'ATM induit également une augmentation du nombre de CO entre les autosomes, ce qui témoigne d'une perte d'interférence entre COs (Barchi et al., 2008). ATM apparaît ainsi important pour la régulation de la distribution des COs sur le génome, en promouvant, d'une part, la formation de CO entre les chromosomes sexuels et en limitant, d'autre part, la génération de CO sur les autosomes.

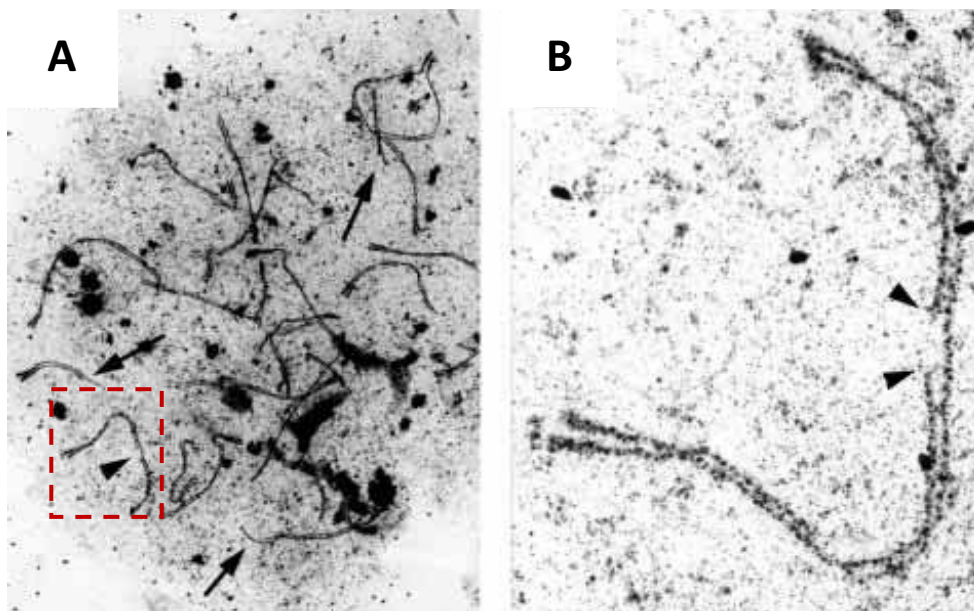


Figure 36 : Défauts de formation du complexe synaptonémal en absence d'ATM chez la souris

Observation de complexes synaptonémals par microscopie électronique sur des spermatocytes en prophase provenant de souris *Atm*^{-/-}. **B** est un agrandissement d'une zone de l'image **A** (encadré rouge). Les flèches indiquent des axes non appariés. Les têtes de flèches indiquent des structures axiales incomplètes. (Barlow et al., 1998)

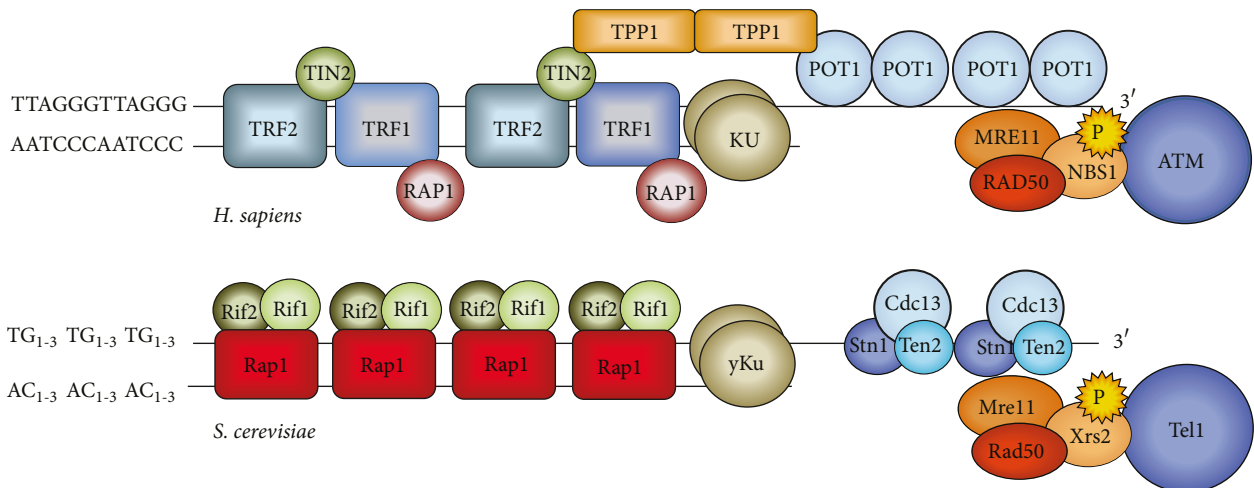


Figure 37 : Structure et mécanisme d'élongation des télomères dépendant de Tel1/ATM chez *S. cerevisiae* et *H. sapiens*

Schématisation de la structure des extrémités télomériques chez l'humain et chez *S. cerevisiae*. Les télomères sont constitués de séquences nucléotidiques répétées et se terminent par une extrémité 3' sortante. Le complexe shelterin recouvre les extrémités télomériques. Les protéines Rap1 – Rif2 – Rif1 recouvrent l'ADN double-brin, chez *S. cerevisiae*. Chez l'humain, l'ADN double-brin est reconnu par les protéines TRF1 – TRF2 auxquelles se lie RAP1 et TIN2. L'ADN simple brin est quant à lui recouvert par Cdc13 – Stn1 – Ten2 chez *S. cerevisiae*, remplacée par la protéine POT1 chez l'humain. Enfin, un pont protéique constitué de TPP1 relie POT1 à TIN2 chez l'humain, ce qui n'est pas retrouvé chez *S. cerevisiae*. Le raccourcissement des télomères peut être reconnu par le complexe MRX/N qui médie le recrutement de Tel1/ATM. Cette dernière stimule l'élongation des télomères. (Di Domenico et al., 2014)

3. Autres rôles de Tel1/ATM

3.1 Tel1/ATM aux télomères

Tel1 a été mise en évidence *via* les défauts de maintenance des télomères en contexte *tel1Δ*. Les télomères correspondent aux extrémités des chromosomes et sont composés d'une répétition de séquences : TG₁₋₃ chez *S. cerevisiae* et T₂AG₃ chez les vertébrés. A chaque cycle réplicatif, les télomères sont érodés en raison de la machinerie de réplication semi-conservative incapable de répliquer complètement l'extrémité 3' des chromosomes (Bonnell et al., 2021). L'addition de répétitions télomériques est alors réalisée par la télomérase qui est constituée chez *S. cerevisiae* d'une sous unité catalytique (Est2), d'un ARN qui sert de séquence modèle, et de deux protéines participant à l'activité du complexe (Est1 et Est3) (Bonnell et al., 2021). Le recrutement de la télomérase aux télomères est régulé par un ensemble de protéines, nommé « shelterin » qui recouvrent les extrémités télomériques (Bonnell et al., 2021). Le complexe shelterin limite notamment la reconnaissance des télomères comme des DSBs par le complexe MRX et Tel1/ATM (Cassani et al., 2016; Hirano et al., 2009). L'absence de Tel1 ou de son activité kinase entraîne un raccourcissement important des télomères chez *S. cerevisiae* (Lustig and Petes, 1986). Tel1 promeut ainsi l'action de la télomérase et le rallongement des télomères, et il a été démontré que la protéine est recrutée aux télomères courts (Figure 37) (Hector et al., 2007). Le recrutement de Tel1 aux télomères dépend du complexe MRX et notamment du domaine C-terminal de Xrs2, de la même manière qu'aux DSBs (Ma and Greider, 2009; Nakada, 2003). En absence du domaine C-terminal de Xrs2, les télomères sont raccourcis de la même manière qu'en absence de Tel1 (Nakada, 2003). De plus, il a été montré que des protéines du complexe shelterin (Rap1, Rif1 et Rif2) participent à limiter le recrutement de MRX et Tel1 aux télomères (Cassani et al., 2016; Hirano et al., 2009). Ainsi, il a été proposé que le raccourcissement des télomères induise une perte progressive de Rap1 – Rif1 – Rif2 et donc de l'inhibition de recrutement de MRX et Tel1 (Cassani et al., 2016; Hirano et al., 2009). Il a également été observé que la protéine Tel1 phosphoryle directement Cdc13 permettant le recrutement de la télomérase et l'allongement des télomères (Di Domenico et al., 2014). Chez les mammifères, l'absence d'ATM entraîne également un raccourcissement des télomères ainsi que des fusions de télomères, et de nombreuses études suggèrent qu'ATM participe à la maintenance des télomères *via* un mécanisme similaire à Tel1 chez la levure (Figure 37) (Di Domenico et al., 2014; Wu et al., 2007).

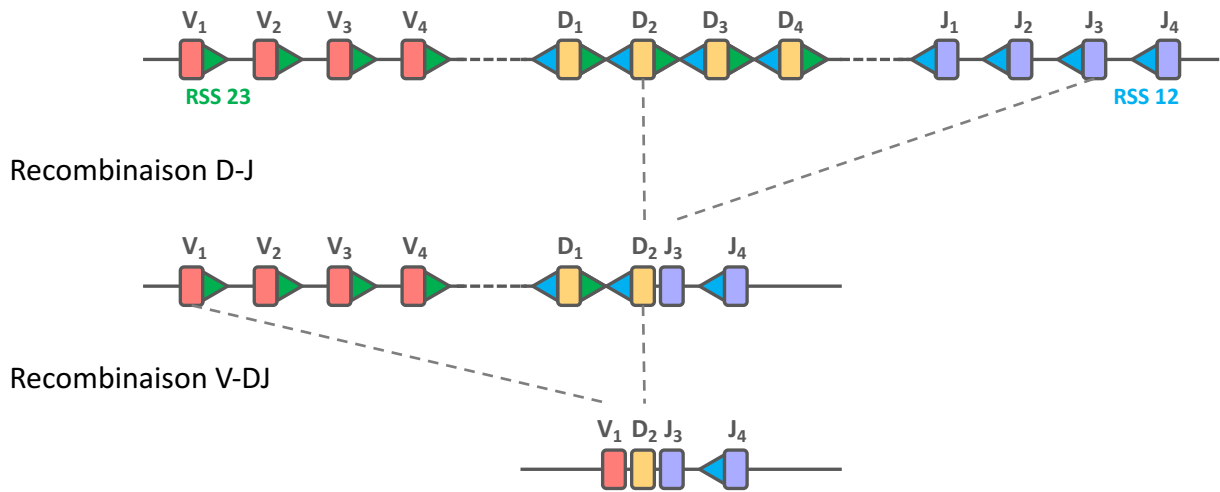


Figure 38 : Recombinaison V(D)J

Schématisation du mécanisme de recombinaison V(D)J. Les segments V, D et J codent pour les régions variables des immunoglobulines. Ces segments sont bordés de séquences RSS 12 ou 23, qui permettent les réarrangements des segments V, D et J. La génération d'une unité codante pour une région variable débute avec une recombinaison des segments D et J, suivi d'une recombinaison d'un segment V avec le segment D – J préalablement formé.

3.2 ATM et la recombinaison V(D)J

La génération programmée de DSBs ne se limite pas au processus méiotique et participe également au fonctionnement du système immunitaire adaptatif. Ce dernier repose sur la production d'une part d'anticorps par les lymphocytes B et d'autre part de récepteurs T sur les lymphocytes T qui sont spécifiques d'antigènes. Ceux-ci sont générés par le processus de recombinaison V(D)J qui permet l'assemblage de segments V, D et J codant chacun pour une région de l'anticorps ou le récepteur T. Sur le génome humain, 44 segments V (« variable »), 27 segments D (« diversity ») et 6 segments J (« joining ») ont été identifiés ce qui permet la génération de 3×10^{11} combinaisons différentes (Volpe and Kepler, 2008). Les réarrangements entre les différents segments ont lieu à des sites spécifiques nommées « Recombination Signal Sequences » (RSS). Deux sites RSS existent, RSS 12 et 23, et un réarrangement ne peut avoir lieu qu'entre un RSS 12 et un RSS 23. Les segments V, D et J présentent donc chacun un site RSS en amont, en aval, ou les deux, de leur région codante (Figure 38). Au cours des différents stades de maturation, les lymphocytes B et T vont donc réarranger les segments D-J puis V-DJ des chaînes lourdes de leurs anticorps et récepteurs, puis les segments V-J de leurs chaînes légères pour aboutir à la génération d'anticorps et de récepteurs T uniques.

Cette recombinaison repose sur l'action des protéines RAG1 et RAG2 (pour « Recombination Activating Genes ») qui reconnaissent et clivent les sites RSS (Schatz and Swanson, 2011) et le contrôle de l'activité de ces protéines est un enjeu crucial pour la stabilité du génome. En effet, des sites RSS cryptiques ont été identifiés sur le génome humain, et il a été estimé qu'un site cryptique était présent tous les 1kb sur le génome (Merelli et al., 2010). De plus, de nombreuses leucémies lymphoblastiques aiguës B et T ont été associées à la présence de translocations chromosomiques dues à une activité des protéines RAG à des sites cryptiques (Hewitt et al., 2017). L'activité des protéines RAG est soumise à une boucle de contrôle rétroactif dépendante d'ATM (Chaumeil et al., 2013; Hewitt et al., 2009, 2017). En effet, dès 1999, il a été mis en évidence que l'inactivation de RAG1 dans une souris *Atm*^{-/-} permet de réduire le développement de lymphomes thymiques (Liao and Van Dyke, 1999), un phénomène qui fait écho à la suppression partielle des défauts méiotiques des souris *Atm*^{-/-} par l'utilisation d'un hétérozygote *Spo11*^{+/-} (Lange et al., 2011). En outre, la manière dont les sites de recombinaison sont choisis par RAG1 et RAG2 reste inconnue à ce jour. Cependant, la protéine RAG2 possède un domaine PHD et est capable de reconnaître la forme H3K4me3 (Schatz and Swanson, 2011). Il a également été démontré que RAG2 se localise aux sites H3K4me3 aux locus *Ig* et sur d'autres régions du génome (Schatz and Swanson, 2011). De plus, des mutations du domaine PHD de RAG2 réduisent la

recombinaison V(D)J, et il a ainsi été proposé que le domaine PHD de RAG2 puisse contribuer au ciblage des sites RSS et à l'activité des protéines RAG (Schatz and Swanson, 2011).

La protéine ATM joue un rôle important dans le processus de recombinaison V(D)J en participant notamment au phénomène d'exclusion allélique : lorsque la recombinaison V(D)J est initiée à un locus, le processus d'exclusion allélique inhibe la recombinaison des autres locus V, D et J en *cis* et également en *trans* (Chaumeil et al., 2013; Hewitt et al., 2009, 2017). Ce processus permet également de ne pas procéder à la recombinaison des chaînes lourdes et légères en même temps, puisque celles-ci sont sélectionnées au cours de deux étapes distinctes (Schatz and Swanson, 2011). L'inhibition de la recombinaison en *trans*, sur la chromatide sœur et le chromosome homologue, assure quant à elle la préservation de locus *Ig* intacte en cas d'échec de la première recombinaison. En 2009, il a été démontré que le phénomène d'exclusion allélique repose sur la relocalisation des locus de recombinaison du second allèle au niveau des zones péri-centromériques (Hewitt et al., 2009). La relocalisation du second allèle est dépendant d'ATM et de RAG1, et en absence d'ATM une recombinaison des locus D et J est observée sur les deux allèles (Hewitt et al., 2009). Plus récemment, il a également été démontré qu'ATM phosphoryle RAG2 en réponse à la formation d'une première DSB et que cette phosphorylation est essentielle à l'inhibition de son activité et à la mise en place du mécanisme d'exclusion allélique (Hewitt et al., 2017). L'absence de phosphorylation de RAG2 par ATM amène ainsi à des phénomènes de translocations chromosomiques (Hewitt et al., 2017).

Le mécanisme d'action d'ATM dans la mise en place de l'exclusion allélique n'est à ce jour pas complètement expliqué. Celui-ci est cependant essentiel à la stabilité du génome comme en témoigne les translocations observées en absence d'exclusion allélique et le développement de pathologie cancéreuse en absence d'ATM. Bien qu'aucun lien n'ait été établi, il est intéressant de souligner que ce mécanisme fait écho au mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques médié par Tel1/ATM.

3.3 ATM et le système nerveux

La protéine ATM joue également un rôle important dans le développement neuronal, et les individus *Atm*^{-/-} présentent des défauts neurologiques importants (*cf.* Partie III : Maladies Associées à ATM). Le rôle d'ATM dans le fonctionnement neuronal et le développement du système nerveux est encore mal compris bien que certaines pistes soient explorées. Premièrement au cours du développement du système nerveux, l'apoptose joue un rôle essentiel dans la maturation du système nerveux (Kristiansen and Ham, 2014). La protéine ATM joue un rôle important dans l'induction

de l'apoptose *via* l'activation de p53 (Lee and McKinnon, 2000). De plus, au cours du développement du système nerveux, ATM et p53 participent également à l'élimination de neurones dont l'ADN est endommagé, et en leur absence des neurones non fonctionnels ou dysfonctionnels s'accumulent dans le système nerveux (Lee and McKinnon, 2000). D'autre part, ATM joue un rôle important dans la réponse au stress oxydatif, et ce indépendamment de son rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN (Waterman et al., 2020). Or, le système nerveux, et notamment le cerveau, est soumis à un stress oxydatif important dû à sa forte consommation d'O₂ amenant à la génération de radicaux libres (Salim, 2017). La protéine ATM pourrait donc également jouer un rôle important dans la réponse au stress oxydatif dans le système nerveux. Il a également été proposé qu'ATM puisse jouer un rôle dans le trafic vésiculaire au sein des neurones, puisque la protéine est retrouvée aux terminaisons synaptiques et interagit avec des protéines de vésicules synaptiques (Herrup et al., 2013).

Partie III : Maladies Associées à ATM

1. L'Ataxie Télangiectasie ou Syndrome de Louis-Bar

L'Ataxie Télangiectasie (AT), ou syndrome de Louis-Bar, est une maladie génétique autosomale récessive. La maladie est décrite pour la première fois en 1926 (Syllaba and Henner, 1926), puis à nouveau en 1941 par Denise Louis-Bar qui donna son nom à la maladie (Louis-Bar, 1941). Le gène responsable de la maladie est identifié en 1995 (*cf.* Partie I – Mise en évidence des protéines Tel1 et ATM) et nommé ATM pour « Ataxia Telangiectasia Mutated ». Ce syndrome se caractérise principalement par de l'ataxie, qui correspond à des troubles de la coordination des mouvements d'origines neurologiques. Des symptômes de télangiectasies oculaires sont également souvent observés chez les patients AT, ce qui correspond à une dilatation importante des capillaires sanguins. Ce syndrome regroupe également divers symptômes tels que de la neurodégénérescence, une immunodéficiences, un vieillissement prématuré, une stérilité, des prédispositions aux pathologies cancéreuses, une sensibilité accrue aux rayons ionisants, etc. (Rothblum-Oviatt et al., 2016). L'espérance de vie des patients AT est également fortement impactée et l'étude de deux cohortes de patients montre une espérance de vie de 19 à 25ans (Crawford et al., 2006). La prévalence moyenne de cette maladie est de 1 pour 40 000 à 1 pour 300 000 naissances, avec une fréquence d'hétérozygotie au locus *ATM* de 1,4 à 2% dans la population générale (Amirifar et al., 2020; Swift et al., 1986). Enfin, une revue qui s'est voulue la plus exhaustive possible en 2020, a reporté 2 514 patients atteints d'AT dans le monde (Amirifar et al., 2020).

L'AT est causée par diverses mutations sur le gène *ATM* localisé sur le chromosome 11 humain (11q22.3) et composé de 69 exons, codant un transcrit de ~13kb (Gatti et al., 1988). Les mutations mises en évidence chez les patients AT sont réparties de manière homogène sur l'ORF *ATM*, bien que certaines mutations soient retrouvées plus fréquemment au sein de certaines populations (Rothblum-Oviatt et al., 2016; Telatar et al., 1998). Celles-ci sont principalement des mutations non-sens ou des mutations induisant des décalages du cadre de lecture, dues à des insertions ou des délétions de nucléotides, et certaines mutations touchent des sites d'épissage (Rothblum-Oviatt et al., 2016). Ainsi, 70% des mutations aboutissent à la formation d'une protéine ATM tronquée non fonctionnelle, indétectable par Western Blot et sans activité kinase (Rothblum-Oviatt et al., 2016).

Les cellules dérivées de patients AT montrent une hypersensibilité aux radiations, des défauts d'activation du DDR et des checkpoints associés, une hypersensibilité au ROS induisant du stress oxydatif et des télomères raccourcis (Amirifar et al., 2020; McKinnon, 2012). Les cellules immunitaires dérivées de patients AT montrent également un défaut d'activation de l'inflammasome dans le cadre de l'immunité innée (Amirifar et al., 2020). Des modèles murins *Atm*^{-/-} ont également été générés pour étudier le rôle d'ATM et tenter de mieux comprendre les différents défauts liés à la maladie. Ce modèle murin présente des effets similaires à ce qui est observé chez les patients AT. Les souris *Atm*^{-/-} sont également stériles, présentent des défauts d'induction de l'apoptose, notamment dans certaines régions neuronales, une immunodéficiência, etc. (Amirifar et al., 2020; McKinnon, 2012). Cependant, le modèle murin ne reproduit pas le phénotype de neurodégénérescence observé chez les patients AT qui se caractérise par une atrophie cérébelleuse (Lavin, 2013). De manière intéressante, la génération de modèles murins dont seule l'activité kinase d'ATM est mutée conduit à la mort embryonnaire précoce des individus (Daniel et al., 2012; Yamamoto et al., 2012), tandis que quelques individus AT dont des mutations touchent l'activité kinase d'ATM ont été identifiés (Putti et al., 2021). La génération d'hétérozygotes murins *Atm*^{KD/-} amène quant à elle à une augmentation de l'instabilité génomique par rapport aux individus *Atm*^{-/-} mais les causes mécanistiques restent inconnues à ce jour (Yamamoto et al., 2012).

Aucun traitement n'est pour l'instant disponible pour ralentir ou stopper la neurodégénérescence des individus AT, cependant de nombreux progrès ont été réalisés sur la prise en charge des symptômes d'immunodéficiences, des infections pulmonaires, ou encore de la prédisposition au diabète (Rothblum-Oviatt et al., 2016). Les progrès récents dans la compréhension du rôle d'ATM, de l'Ataxie Téléangiectasie

et de la prise en charge de certains aspects de la maladie ont considérablement augmenté la qualité et l'espérance de vie des patients AT.

2. ATM et Cancer

L'absence d'ATM, les défauts d'activation du DDR et des checkpoints cellulaires conduisent à une augmentation de l'instabilité génomique et promeuvent l'apparition de maladies cancéreuses.

Les mutations germinales homozygotes, causant l'AT, confèrent ainsi une susceptibilité accrue au développement de cancers : sur deux cohortes de 279 et 296 patients AT, ~25% ont développé un cancer, dont la majorité des leucémies ou des lymphomes, bien que d'autres types de cancers tels que des carcinomes soient également retrouvés (Choi et al., 2016). Les individus hétérozygotes pour les mutations d'ATM, qui représentent 1,4 à 2% de la population d'après les dernières estimations (Amirifar et al., 2020), présentent une susceptibilité 2 à 3 fois plus élevée de développement de maladies cancéreuses par rapport à la population générale (Choi et al., 2016; Cremona and Behrens, 2014). En particulier, le risque de développer un cancer du sein est de 5 à 9 fois plus important chez ces individus (Choi et al., 2016).

Des mutations somatiques du gène *ATM* ont également été retrouvées dans différents types de cancers : lymphomes des cellules du manteau (MCL), leucémie lymphoïde chronique à cellules B (B-CLL), leucémie prolymphocytaire à cellules T (T-PLL), cancer du sein, cancer colorectal, du poumon ou encore de la prostate (Putti et al., 2021). Ces mutations, bien que présentes à l'état hétérozygote, peuvent avoir un effet « dominant-négatif » et se révéler plus délétères pour la stabilité du génome que l'absence complète de la protéine (Lim et al., 2000; Putti et al., 2021). Des mutations, touchant notamment l'activité kinase d'ATM, montrent cet effet dominant négatif lorsqu'elles sont reproduites *in vitro* : les cellules hétérozygotes *Atm^{+ / KD}* montrent augmentation de la fragmentation des chromosomes et une sensibilité accrue aux radiations ionisantes (Scott et al., 2002; Yamamoto et al., 2012). De plus, *ATM* est fréquemment retrouvé muté dans des cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies et radiothérapies (Putti et al., 2021).

3. « Ataxia Telangiectasia Like Disorder » et Syndrome de Nimègue

Certaines maladies génétiques ne touchant pas le gène *ATM* ressemblent fortement à l'Ataxie Télangiectasie sans pour autant récapituler tous les symptômes

de celle-ci : l'ATLD, pour « Ataxia-telangiectasia like disorder », et le Syndrome de Nimègue, ou « Nijmegen breakage syndrom » (NBS). Ces deux maladies génétiques sont respectivement causées par des mutations des gènes *MRE11* et *NBS1* qui font partie du complexe MRN. *MRE11*, *RAD50* et *NBS1* sont toutes les trois des protéines essentielles au développement embryonnaire, et la génération de modèles murins dépourvus d'une de ces protéines conduit à une mort embryonnaire précoce (Rupnik et al., 2010). L'ATLD et le NBS sont donc principalement causées par des mutations hypomorphes des gènes *MRE11* et *NBS1* (Taylor et al., 2004).

L'ATLD est une maladie génétique très rare, et en 2004, seuls 6 cas avaient été signalés et les patients présentent des symptômes très proches des patients AT (Taylor et al., 2004). Les patients ATLD ne présentent pas de télangiectasie, la production des différents types d'anticorps apparaît normale et la progression de la maladie semble plus lente que pour les patients AT (Taylor et al., 2004). Les patients ATLD ont également une ataxie cérébelleuse progressive, une hypersensibilité aux rayons ionisants et une instabilité génomique importante.

Le syndrome de Nimègue est une maladie génétique rare autosomale récessive, distinct de l'AT bien que certains aspects soient similaires. Le NBS se caractérise par une microcéphalie, une petite taille des individus, une immunodéficiences, une prédisposition au cancer et une sensibilité aux radiations. Ce syndrome est notamment retrouvé dans des pays d'Europe de l'Est et la grande majorité des patients présente une mutation commune : une délétion de 5 paires de bases menant à un décalage du cadre de lecture et la formation de deux fragments de la protéine *NBS1*, correspondant au domaines N- et C-terminal de la protéine (Rupnik et al., 2010; Taylor et al., 2019).

Enfin, il existe également un « NBS-like disorder » causé par des mutations de la protéine *RAD50*. Cette maladie est extrêmement rare puisque seule une dizaine de patients ont jusqu'alors été identifiés, notamment lors de génotypage au sein d'une famille présentant une prédisposition au cancer du sein (Rupnik et al., 2010; Taylor et al., 2019).

L'altération des mécanismes du DDR, *via* l'inactivation d'ATM ou du complexe MRN, amène donc à l'apparition de syndromes touchant diverses fonctions de l'organisme et augmente considérablement le risque de développer des pathologies cancéreuses. De plus, la ressemblance des symptômes entre l'ATLD, le NBS et l'AT appuie le rôle important que joue l'interaction de MRN et ATM. Cependant, les différences observées témoignent de rôles distincts de ces protéines dans différents processus. Ces différences questionnent également sur l'émergence de différents symptômes à partir de la dérégulation du même mécanisme de réparation de l'ADN.

Chapitre IV : Projet de thèse

Mon projet de thèse a eu pour objectif d'étudier le rôle de la protéine Tel1 dans la régulation spatiale de la formation des cassures double-brin méiotiques chez *Saccharomyces cerevisiae*. Deux projets ont découlé de cette thématique : l'étude de Tel1 et de son recrutement à l'ADN dans le contexte de la mise en place de l'interférence entre cassures double-brin méiotiques, et le rôle de l'activité kinase de Tel1 dans la régulation spatiale des événements de doubles cassures intrahotspots ; correspondant aux Chapitres V et VI respectivement.

Pour mon premier projet, je me suis notamment intéressée au recrutement de Tel1 aux sites de cassures double-brin et aux sites de l'axe par une approche d'immunoprécipitation de la chromatine à l'échelle du génome. J'ai également cherché à déterminer si ce recrutement était nécessaire à la mise en place de l'interférence entre cassures double-brin méiotiques. Enfin, afin de mieux appréhender le mécanisme d'interférence, j'ai cherché à mettre en évidence des facteurs impliqués dans ce processus *via* une approche par gènes candidats. Ces travaux, présentés dans le Chapitre V, font l'objet d'une publication en premier auteur en cours d'écriture.

Mon second projet s'est focalisé sur l'étude des doubles cassures intrahotspots et sur leur régulation spatiale (Chapitre VI). Des travaux antérieurs à mon arrivée au laboratoire ont montré une dérégulation spatiale de celles-ci en absence de l'activité kinase de Tel1. Au cours de ce projet, j'ai notamment cherché à déterminer si la protéine mutée Tel1kd (« *tel1 kinase-dead* ») était recrutée aux sites de cassures et l'impact de ce recrutement sur la régulation spatiale des doubles cassures. Afin de caractériser cette régulation, Valérie Garcia (directrice de thèse), Rakesh Aithal (postdoctorant) et moi avons exploré plusieurs pistes. J'ai notamment étudié partiellement le rôle potentiel des protéines Mre11 et Fun30 dans ce processus. Une partie des résultats obtenus sera incluse dans une publication en cours de préparation.

Chapitre V : Le mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques repose sur l'interaction Tel1 – Xrs2

Chez *S. cerevisiae*, ~150 à 200 DSBs sont générées sur le génome à chaque méiose, par l'intermédiaire d'une machinerie de formation de cassures dont Spo11, qui porte l'activité catalytique, et le complexe MRX font partie (cf. Chapitre I – Partie III). Lors de la génération d'une DSB, la protéine Spo11 reste attachée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ADN clivé (Keeney et al., 1997), jusqu'au clivage endonucléolytique de l'extrémité bloquée par l'action du complexe MRX et de la protéine Sae2 (Neale et al., 2005) (cf. Chapitre I – Partie III : Les cassures double-brin méiotiques).

Au cours du cycle mitotique, la protéine Tel1 est recrutée aux DSBs formées accidentellement ainsi qu'aux télomères courts, reconnus comme des DSBs, par le domaine carboxy-terminal de Xrs2, membre du complexe MRX (Ma and Greider, 2009; Nakada, 2003). Ce recrutement fait partie intégrante du mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN, auquel la protéine Tel1 participe en signalant la présence de DSBs par la phosphorylation de H2A (Downs et al., 2000), par l'activation de checkpoint cellulaire (Usui et al., 2001) ou bien la phosphorylation de Rad53 qui dépend du recrutement de Tel1 aux DSBs (Fukunaga et al., 2011).

Dans le programme méiotique, la protéine Tel1 joue un rôle important dans la régulation de la formation des DSBs méiotiques (cf. Chapitre II : Régulation des DSBs et Interférence). Notamment, Tel1 est essentielle à la mise en place de l'interférence entre DSBs méiotiques, ce qui homogénéise la distribution des DSBs sur le génome. Ce mécanisme inhibe la formation de plusieurs DSBs à proximité les unes des autres, sur une distance allant jusqu'à ~100kb (Garcia et al., 2015). La perte d'interférence en contexte *tel1Δ* aboutit à l'émergence d'évènements de doubles cassures (DCs), résultant de la formation de deux DSBs à proximité sur la même molécule d'ADN (Garcia et al., 2015). Cependant, le mécanisme d'action de Tel1 dans ce processus reste méconnu à ce jour et nous nous proposons d'étudier la dynamique de Tel1 en méiose,

inexplorée jusqu'alors. En mitose, de nombreuses fonctions de Tel1 dans la réponse aux dommages à l'ADN dépendent du recrutement de la protéine aux sites de cassures accidentelles (*cf.* Chapitre III : Tel1/ATM) et nous avons voulu déterminer si la fonction méiotique de Tel1 dans la mise en place de l'interférence était également dépendante de sa présence à l'ADN. Tel1 est également connue pour être activée plus efficacement aux DSBs en présence de « blocked-end », des extrémités bloquées par la présence d'un élément lié de manière covalente à l'ADN (telle qu'une protéine ou une molécule de biotine), qu'aux extrémités d'ADN libre (Fukunaga et al., 2011). Ainsi, la liaison covalente de Spo11 à l'ADN comme intermédiaire dans la formation des DSBs méiotiques pourrait constituer un substrat potentiel pour l'activation de Tel1 en méiose.

Pour appréhender le mécanisme d'action de Tel1, nous avons cherché à répondre à différentes questions : la protéine Tel1 est-elle recrutée aux hotspots de cassures méiotiques ? Si oui, son recrutement est-il également dépendant du domaine C-terminal de Xrs2, à l'image de son mode de recrutement en mitose ? Enfin, est-ce que la mise en place de l'interférence est dépendante de ce recrutement ? De plus, la protéine Mre11 est recrutée de manière indépendante de la formation de DSBs (Borde et al., 2004), et étant essentielle à la génération des DSBs, il est communément admis que le complexe MRX se localise aux hotspots de cassures en amont de leur formation (Borde et al., 2004). Il a également été proposé que le complexe MRX puisse promouvoir la formation de DSBs en remodelant la chromatine aux sites de cassures (Ohta et al., 1998). Ces éléments nous ont donc poussés à déterminer si Tel1 était également recrutée aux sites de cassures en amont de leur formation, et si l'interférence pouvait être mise en place avant la formation de DSBs et ainsi « pré-établir » le paysage de cassures au sein de la cellule.

I. Recrutement de la protéine Tel1 sur le génome

Dans un premier temps, j'ai cherché à déterminer si la protéine Tel1 est recrutée aux hotspots de DSBs méiotiques par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Brièvement, le ChIP repose sur la formation de liaisons covalentes induites par traitement chimique entre l'ADN et les protéines qui interagissent avec lui. Une étape de sonication permet de fragmenter de manière aléatoire l'ADN. Cette étape est suivie d'une immunoprécipitation de la protéine d'intérêt et des fragments d'ADN associés. L'ADN ainsi immunoprécipité peut ensuite être purifié et analysé par qPCR (ChIP-qPCR) ou séquençage (ChIP-seq). L'analyse par qPCR permet de mesurer l'enrichissement de la protéine d'intérêt à un locus spécifique. L'analyse par séquençage permet de mettre en évidence tous les sites d'enrichissement de la protéine à l'échelle du génome. Pour étudier le recrutement de la protéine Tel1, j'ai combiné ces deux approches. Le ChIP-qPCR m'a permis d'étudier le recrutement de plusieurs protéines (Tel1, Spo11, Mre11) dans différentes conditions. Le ChIP-seq m'a permis d'étudier le recrutement global des protéines Tel1 et Spo11 sur l'ensemble du génome.

Stratégie expérimentale : utilisation d'un fond génétique sae2Δ

Les ChIP ont été réalisés dans deux fonds génétiques différents : SAE2 WT et *sae2Δ*. En contexte *sae2Δ*, les DSBs générées par Spo11 ne sont pas maturées et la protéine Spo11 reste liée de manière covalente à l'ADN sans réparation possible de celles-ci (Keeney et al., 1997) (cf. Chapitre I – Partie III : Les cassures double-brin méiotiques). Pour simplifier la lecture, j'utiliserai l'anglicisme « résectées » ou « non résectées » pour désigner le stade de maturation des DSBs. Tel1 étant activée en présence d'extrémités bloquées, la persistance de Spo11 aux extrémités 5' des cassures en contexte *sae2Δ* représente donc un substrat adapté à l'étude de Tel1 en méiose. L'absence de réparation des DSBs en contexte *sae2Δ*, conduit notamment à une activation du TM checkpoint (cf. Chapitre III – Partie II : Rôles de Tel1/ATM). Le contexte *sae2Δ* nous a donc semblé être un outil adéquat pour étudier le recrutement de Tel1 aux DSBs méiotiques et optimiser sa détection par ChIP.

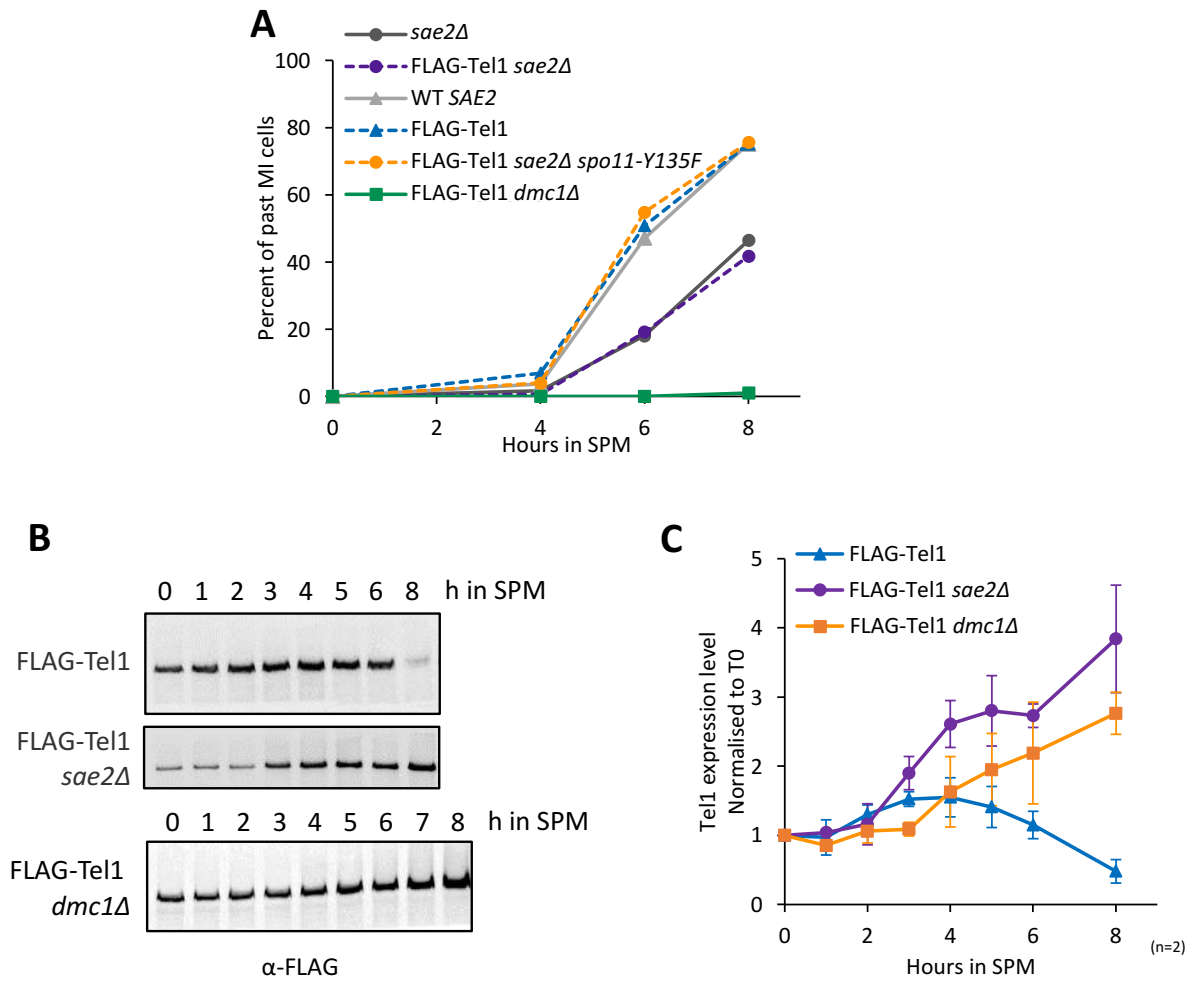


Figure 39 : Expression de FLAG-Tel1 en méiose

(A) Progression méiotique des souches étiquetées FLAG-Tel1 ou non étiquetées en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ*. L'avancement dans le cycle méiotique est suivi par marquage de l'ADN au DAPI et décompte des cellules à 1, 2 ou 4 noyaux.

(B) Détection de la protéine FLAG-Tel1 par Western blot en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ* au cours de la méiose.

(C) Quantification du niveau d'expression de FLAG-Tel1 en méiose. Les signaux détectés par Western blot sont quantifiés et normalisés au temps 0 (n=2).

1. Construction de la souche FLAG-Tel1 en méiose

Afin d'étudier l'expression de la protéine Tel1 en méiose et son recrutement potentiel à l'ADN, nous avons construit une version étiquetée de la protéine. Un 3xFLAG-tag a été inséré en région amino-terminale (N-terminal) de la protéine pour ne pas altérer l'activité kinase de la protéine qui se trouve en région carboxy-terminale (C-terminal). L'étiquette FLAG a été insérée par recombinaison homologue d'un fragment FLAG-Tel1 dans une souche *tel1::URA3*, sans altérer le promoteur naturel de *TEL1* (cf. Matériel et Méthode). Nous avons dans un premier temps vérifié que l'insertion de l'étiquette n'affectait pas la fonctionnalité de Tel1.

Tout d'abord, j'ai vérifié l'impact de la construction FLAG-Tel1 sur la progression méiotique en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ* (Figure 39A). En contexte de référence, les souches étiquetées FLAG-Tel1 et non-étiquetées se comportent de manière similaire avec ~80% des cellules qui ont passé la première division méiotique (MI) à 8h (Figure 30A). En contexte *sae2Δ*, il est attendu que la présence de DSBs non résectées induit l'activation d'un checkpoint dépendant de Tel1 et l'arrêt du cycle cellulaire méiotique (Usui et al., 2001). En effet, seuls ~50% des cellules *sae2Δ* ont passé la MI après 8h, et la souche FLAG-Tel1 *sae2Δ* se comporte de la même manière (Figure 39A). Ce délai est bien dépendant de la présence de cassures non résectées puisqu'en contexte *spo11-Y135F* où les DSBs ne sont pas générées, le checkpoint n'est pas activé et les cellules progressent plus rapidement en méiose (Figure 39A). Ces résultats permettent de conclure que la présence du FLAG-tag n'altère pas la fonction de checkpoint de la protéine Tel1 en fond *sae2Δ*.

En parallèle, Rakesh Aithal, postdoctorant de l'équipe, a vérifié l'expression de la protéine étiquetée en méiose par Western blot (Figure 39B). Nous avons ainsi observé que la protéine est exprimée en méiose, avec un maximum d'accumulation à 4h après induction méiotique et une diminution du niveau protéique à 8h post-induction dans un contexte *SAE2* (Figure 39C). En contexte *sae2Δ*, la protéine est également exprimée et le niveau protéique augmente au cours de la méiose, et ce jusqu'à 8h après induction de la méiose (Figure 30B). Cette augmentation du niveau protéique peut résulter de plusieurs facteurs : (i) la présence de DSBs non résectées en contexte *sae2Δ* induit une forte activation de Tel1 et cette activation peut constituer une boucle de rétrocontrôle positif sur l'expression ou la stabilisation de la protéine ; (ii) dans le cas d'une expression dépendante de la progression du cycle cellulaire de la protéine Tel1, l'arrêt du cycle cellulaire méiotique en contexte *sae2Δ* peut également contribuer à l'augmentation du niveau protéique ; (iii) enfin, une combinaison de ces

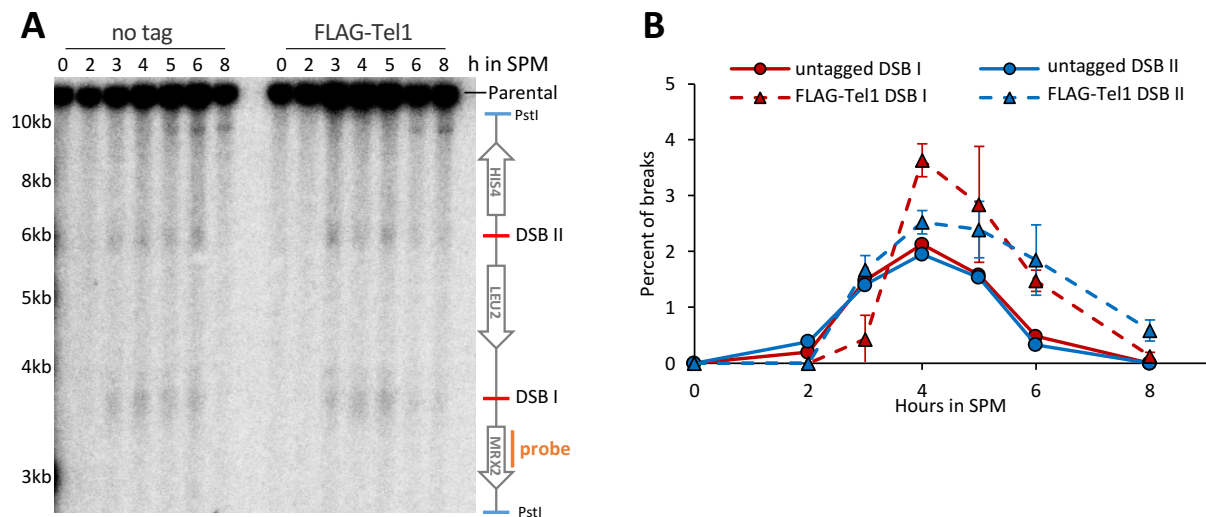


Figure 40 : Effet de la protéine FLAG-Tel1 sur la formation des DSBs au locus *HIS4::LEU2*

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* en contexte *SAE2* WT en absence ou en présence de l'étiquette 3xFLAG (no tag vs FLAG Tel1). Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot.

(B) Quantification des DSBs au locus *HIS4::LEU2*. Les DSBs mesurées au site I sont représentées en rouge et celles mesurées au site II sont représentées en bleues. Les traits pleins sont utilisés pour tracer les souches non taguées et les traits pointillés sont utilisés pour les souches taguées FLAG-Tel1.

deux facteurs peut également expliquer le phénotype observé. Afin de déterminer l'origine de cette augmentation du niveau protéique, nous avons étudié l'expression de Tel1 dans un contexte *dmc1Δ*. Dans ce fond génétique, les DSBs sont « hyper-résectées » et l'activation de Tel1 est transitoire. Cependant, la présence de longs brins d'ADN simple brin induit l'activation de la protéine Mec1 et la progression méiotique est bloquée par l'activation du checkpoint dépendant de Mec1 (Figure 30A) (Gobbini et al., 2013; Lydall et al., 1996). Ce fond génétique nous permet donc de tester si l'augmentation du niveau protéique de Tel1 est due à l'arrêt du cycle cellulaire ou à la présence de DSBs non résectées. En contexte *dmc1Δ*, le niveau protéique de Tel1 augmente également au cours du temps (Figure 39B, Figure 39C), cependant celui-ci n'atteint pas le même niveau qu'en contexte *sae2Δ* (Figure 39C). L'augmentation du niveau protéique de Tel1 semble donc résulter en partie de l'arrêt du cycle cellulaire et en partie de la présence de DSBs non résectées. En conclusion, la construction FLAG-Tel1 est bien exprimée en méiose. De plus, en contexte *sae2Δ*, l'arrêt du cycle cellulaire et la présence de DSBs non-résectées contribuent à une augmentation significative de son niveau protéique.

Souhaitant étudier le recrutement de la protéine aux sites de cassures méiotiques, j'ai également contrôlé la formation des DSBs en présence de la protéine étiquetée au locus *HIS4::LEU2*. Par Southern blot, les DSBs sont détectées aux deux sites de cassures dans la souche *SAE2* WT non-étiquetée (Figure 40A). Les DSBs sont détectées dès 3h jusqu'à 6h post-induction méiotique, avec un pic de formation de cassures à 4h (Figure 40B). Dans la souche FLAG-Tel1, les DSBs sont également détectées dès 3h et montrent également un pic de formation à 4h (Figure 40B). La quantification suggère cependant un signal de formation de DSBs plus importante en présence de l'étiquette FLAG, et potentiellement une persistance de DSBs à 8h (Figure 40B). La perte de fonctionnalité de Tel1 a été associée à un défaut précoce de résection des DSBs (Mimitou et al., 2017), un défaut que nous n'avons pas observé suggérant que la détection de DSBs à 8h est probablement due à une différence de synchronie des cultures, et une répétition des expérimentations permettrait de vérifier ce paramètre. Ces résultats indiquent que les DSBs méiotiques sont formées et réparées en présence de FLAG-Tel1.

Il apparaît donc que la protéine FLAG-Tel1 est bien exprimée en méiose et que l'insertion de l'étiquette FLAG n'affecte ni la progression méiotique, ni de façon significative la formation et la réparation des DSBs.

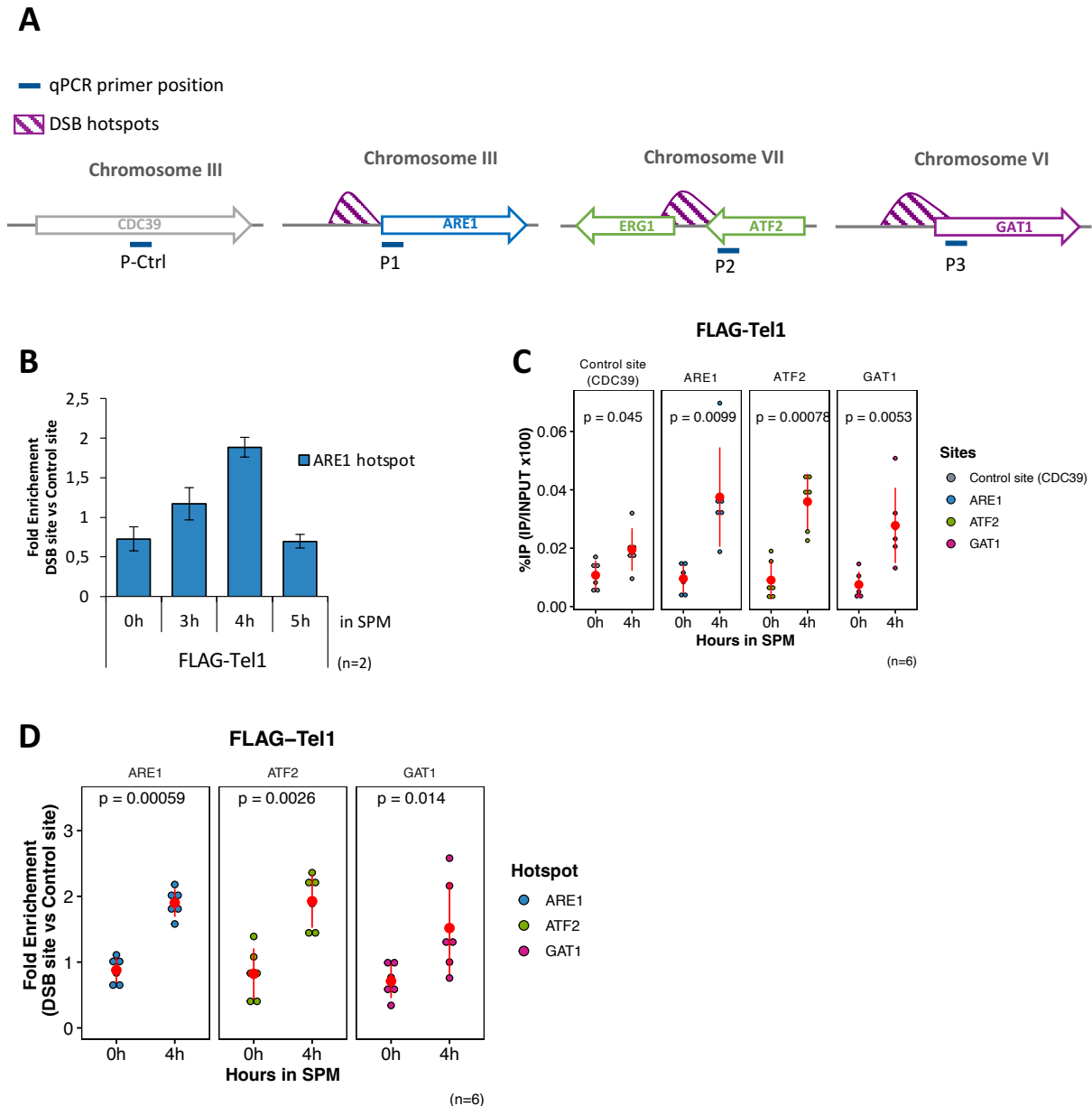


Figure 41 : Recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures en contexte SAE2

(A) Localisation des amorces utilisées lors des analyses en ChIP-qPCR. P-Ctrl correspond au couple d'amorces utilisé pour les qPCR au site contrôle *CDC39*. P1, P2 et P3 correspondent aux couples d'amorces aux locus *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* respectivement.

(B) Enrichissement en FLAG-Tel1 au hotspot de cassures *ARE1* normalisé au site contrôle au cours de la méiose (n=2).

(C) %IP de FLAG-Tel1 par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1*. En rouge sont représentée la moyenne des valeurs et l'écart type associé. Les p-valeurs ont été calculées par test de Student (cf. Matériel et Méthode).

(D) Enrichissement en FLAG-Tel1 aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* normalisé au site contrôle.

2. Recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* en réponse à la formation de cassures

Afin de déterminer si la protéine Tel1 est recrutée aux hotspots de cassures, j'ai mesuré l'enrichissement en FLAG-Tel1 par ChIP suivi d'une qPCR à trois des hotspots les plus fréquemment coupés chez *S. cerevisiae* : *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* (Pan et al., 2011) avec des amorces correspondant à chaque hotspot (P1, P2 et P3 respectivement ; Figure 41A). L'enrichissement à ces hotspots est comparé à celui du site contrôle *CDC39* où le couple d'amorces P-Ctrl amplifie une région centrale du gène : aucune DSB n'est attendue à ce locus (Figure 41A).

L'enrichissement de Tel1 aux sites de cassures a été mesuré dans deux contextes différents : *SAE2* et *sae2Δ*. En contexte de référence, les DSBs sont rapidement maturées et réparées (Figure 40A), et si Tel1 se lie aux sites de cassures méiotiques, un enrichissement local transitoire de la protéine est attendu. Les DSBs sont détectées de 3 à 5h post-induction méiotique (Figure 40A) et nous avons observé une augmentation du niveau protéique de Tel1 dans cette plage horaire, avec un pic d'accumulation à 4h (Figure 39C). Afin d'optimiser la détection de l'interaction de la protéine avec l'ADN dans ce contexte, j'ai tout d'abord réalisé un ChIP de Tel1 en duplicat aux temps 0, 3, 4 et 5h post-induction méiotique : un maximum d'enrichissement de la protéine est détecté à 4h post induction méiotique (Figure 41B), correspondant au niveau de Tel1 le plus élevé (Figure 39C), ainsi qu'au pic de DSBs détectées (Figure 40B). Pour ces raisons, j'ai poursuivi l'étude du recrutement de Tel1 à 4h post-induction méiotique en condition *SAE2* WT. Les résultats obtenus par qPCR m'ont permis de calculer premièrement le pourcentage d'ADN immunoprécipité par rapport à l'ADN total de mes échantillons, le « %IP » (Figure 41C). À 4h post-induction méiotique, le site contrôle montre une augmentation faible mais significative du %IP par rapport au temps 0 ($p\text{-valeur} = 0.045$ Figure 41C). Cependant cette augmentation n'est pas retrouvée dans d'autres ChIPs, et la significativité statistiques provient probablement de la faible dispersion des données. Ces éléments m'ont amené à ne pas considérer cette augmentation. Aux sites de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1*, le %IP mesuré augmente à 4h post-induction méiotique (~0,04 de %IP à 4h contre ~0,01% à 0h ; Figure 41B). A partir de ces données, il est possible de calculer l'enrichissement de Tel1 à chaque hotspot par rapport au site contrôle, le « fold enrichment » (« FE »). Les FE ne sont présentés que lorsque les %IP ont montré une augmentation significative.

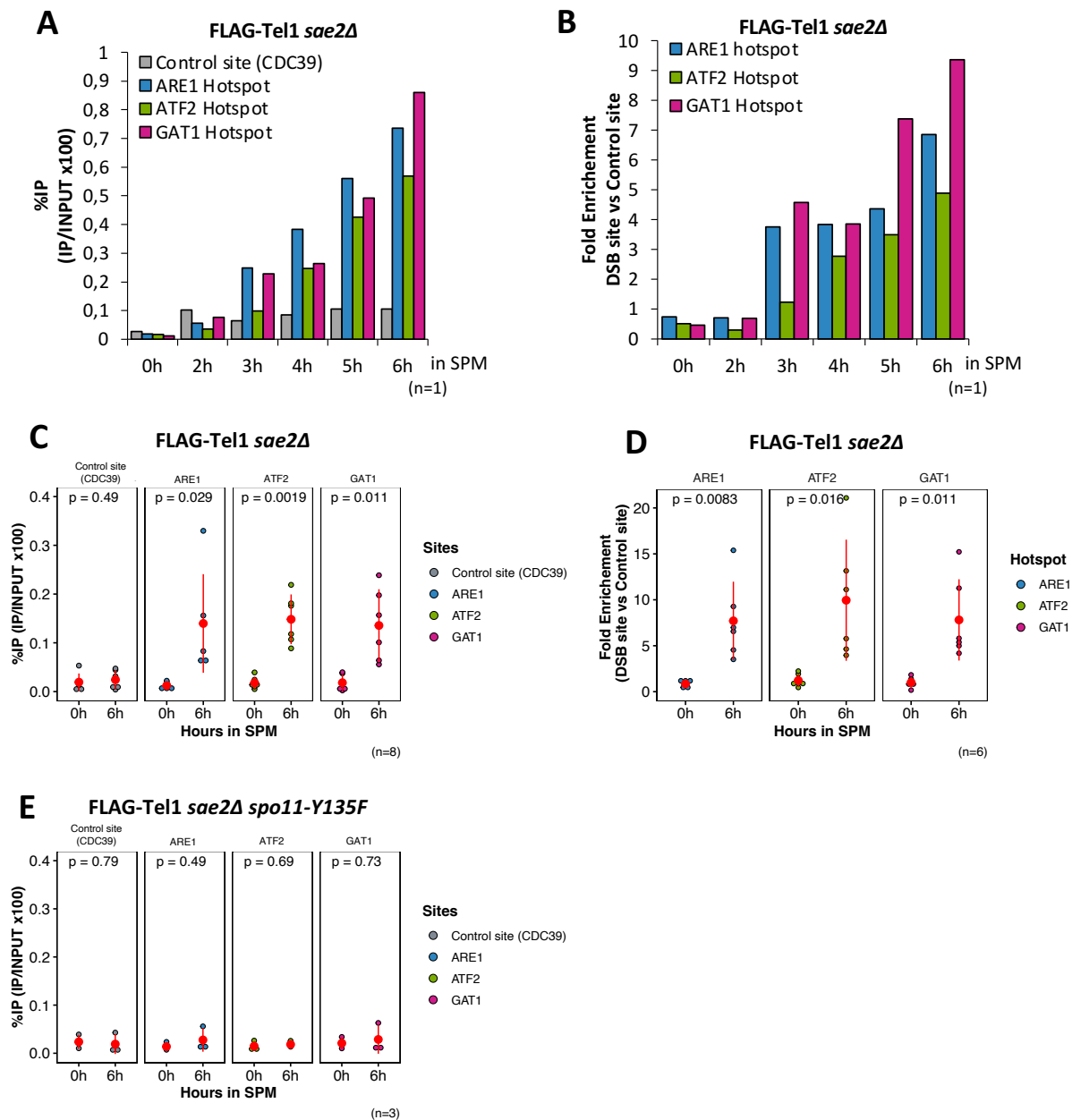


Figure 42 : Recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures en contexte *sae2Δ*

(A) %IP de FLAG-Tel1 par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* au cours de la méiose (n=1).

(B) Enrichissement de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ* aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* au cours de la méiose (n=1).

(C) %IP de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ* aux sites Contrôle (*CDC39*), *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose

(D) Enrichissement de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ* aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose.

(E) %IP de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ spo11-Y135F* aux sites Contrôle (*CDC39*), *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose

L'ensemble des %IP et FE sont présentés en Annexe 1 et Annexe 2

Ainsi en contexte *SAE2* WT, Tel1 est enrichie de manière significative aux sites de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* : en moyenne, Tel1 est enrichie de 2 fois aux sites de cassures par rapport au site contrôle (Figure 41D, p -valeur $<0,05$). Par ailleurs, il est important de noter que les résultats de ChIP-qPCR présentés montrent des écarts-types importants. Ceux-ci sont dus à différents paramètres dont la variabilité intrinsèque est difficile à contrôler. Ce point sera présenté et discuté en VI – Discussion.

Par la suite, j'ai également mesuré l'enrichissement de la protéine Tel1 aux hotspots en contexte *sae2Δ*. En effet, l'accumulation de DSBs aux extrémités bloquées par la présence de Spo11 représente un substrat privilégié pour l'activation de Tel1 (Fukunaga et al., 2011), ce qui permettrait d'augmenter potentiellement son recrutement et sa détection aux sites d'intérêts. De plus, nous avons montré que le niveau protéique de Tel1 augmente fortement dans ce contexte (Figure 39C). Dans ce fond génétique, j'ai premièrement analysé le recrutement de Tel1 aux sites de cassures au cours des six premières heures du programme méiotique : Tel1 est enrichie aux hotspots de cassures en contexte *sae2Δ* et semble s'accumuler aux sites de cassures au cours du temps (Figure 42A, Figure 42B). À la suite de ce résultat, j'ai décidé d'étudier spécifiquement l'enrichissement de Tel1 à 6h post-induction méiotique en contexte *sae2Δ*, puisque c'est à ce temps que j'ai enregistré la plus forte accumulation de la protéine aux sites de cassures. Les %IP obtenus montre un enrichissement significatif de Tel1 aux sites de cassures (Figure 42C), ~6-7 fois plus important qu'au site contrôle (Figure 42D). De plus, en analysant le recrutement de Tel1 à des temps plus précoces en contexte *sae2Δ*, il apparaît que la protéine est ~4 fois plus enrichie aux hotspots de cassures qu'au site contrôle à 4h post-induction méiotique (Figure 42B), contre ~2 fois en fond *SAE2* WT (Figure 41D). L'accumulation de DSBs non résectées en contexte *sae2Δ* semble donc accentuer le recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures. La protéine Tel1 est donc recrutée aux sites de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* en contexte *SAE2*, et ce recrutement est amplifié en contexte *sae2Δ*.

Une partie de mes travaux, qui sera présentée en II. Interaction Tel1 – Xrs2, a eu pour but de déterminer si l'interférence médiée par Tel1 était dépendante du recrutement de la protéine aux sites de cassures ou si l'interférence pouvait être mise en place en amont de la formation des DSBs et ainsi « préétablir » la distribution de DSBs. J'ai donc cherché à déterminer si le recrutement de Tel1 s'effectuait indépendamment de la formation des DSBs. Pour répondre à cette question, j'ai réalisé le ChIP de FLAG-Tel1 dans le mutant *spo11-Y135F*. Dans ce mutant, l'enrichissement en FLAG-Tel1 aux sites de cassures est aboli (Figure 42E, Annexe 2). Ensemble, ces résultats indiquent que Tel1 est recrutée aux hotspots en réponse à la formation de cassures par Spo11.

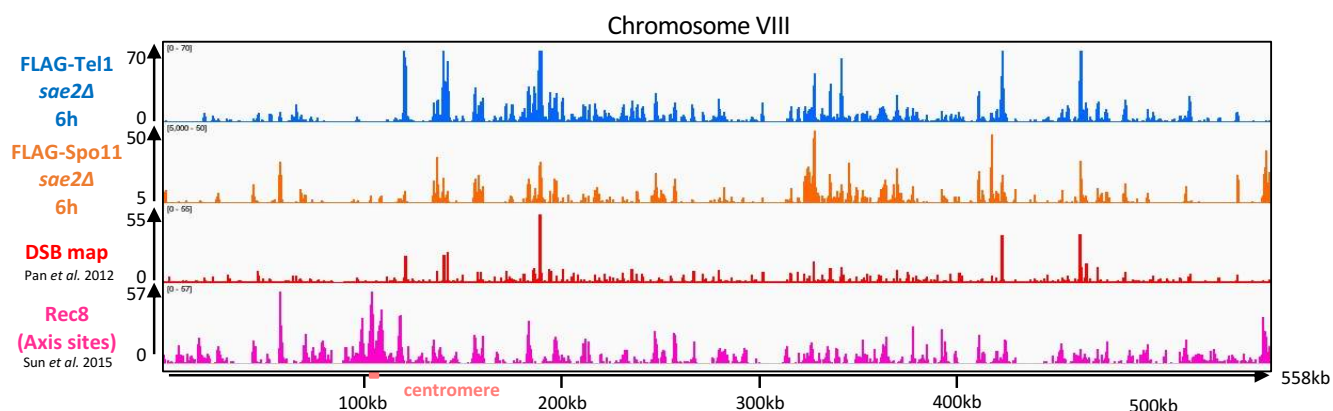


Figure 43 : Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur le chromosome VIII

L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan et al., 2011) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun et al., 2015). L'ensemble des chromosomes est présenté en Annexe 4.

3. Recrutement de Tel1 à l'échelle du génome

Dans le but d'étudier le recrutement de Tel1 à l'échelle du génome, j'ai réalisé un ChIP suivi d'un séquençage d'ADN à haut débit (ChIP-seq). Ce ChIP-seq a été réalisé en duplicat et ceux-ci affichent un coefficient de détermination (R^2) de 0,9 (Annexe 3). En contrôle, un ChIP-seq de Spo11 a également été réalisé en duplicata ($R^2 = 1$, Annexe 3), puisqu'il a été montré que Spo11 se localise aux sites de cassures et co-localise avec Rec8, une protéine de l'axe (Kugou et al., 2009; Prieler, 2005). Les ChIP-seq ont été réalisés en fond génétique *sae2Δ* afin d'optimiser l'enrichissement de la protéine Tel1, puisque celle-ci montre un enrichissement plus important par ChIP-qPCR dans ce fond génétique qu'en contexte *SAE2* sauvage (Figure 41, Figure 42). L'enrichissement des deux protéines a ensuite été comparé à la carte des DSBs établie par séquençage des Spo11-oligos (Pan et al., 2011) ou par CC-seq (Gittens et al., 2019) et aux ChIP-seq des protéines de l'axe Rec8, Hop1 et Red1 (Sun et al., 2015). Je présenterai dans un premier temps les analyses de l'enrichissement de Tel1 et Spo11 réalisées à l'échelle chromosomique avant de m'intéresser à leur enrichissement aux hotspots de cassures et aux sites de l'axe.

Les analyses bio-informatiques du ChIP-seq ont été réalisées en collaboration avec Julien Vernerey, plateforme Cibi, CRCM.

Analyse à l'échelle chromosomique

La visualisation des données de ChIP-seq sur le logiciel IGV permet d'observer un enrichissement de Tel1 et Spo11 sur tous les chromosomes (Figure 43, Annexe 4). L'enrichissement des protéines n'est pas uniforme sur le génome, mais apparaît sous la forme de pics de différentes intensités : les protéines Tel1 et Spo11 sont donc enrichies de localement à différentes positions sur le génome.

- centromere

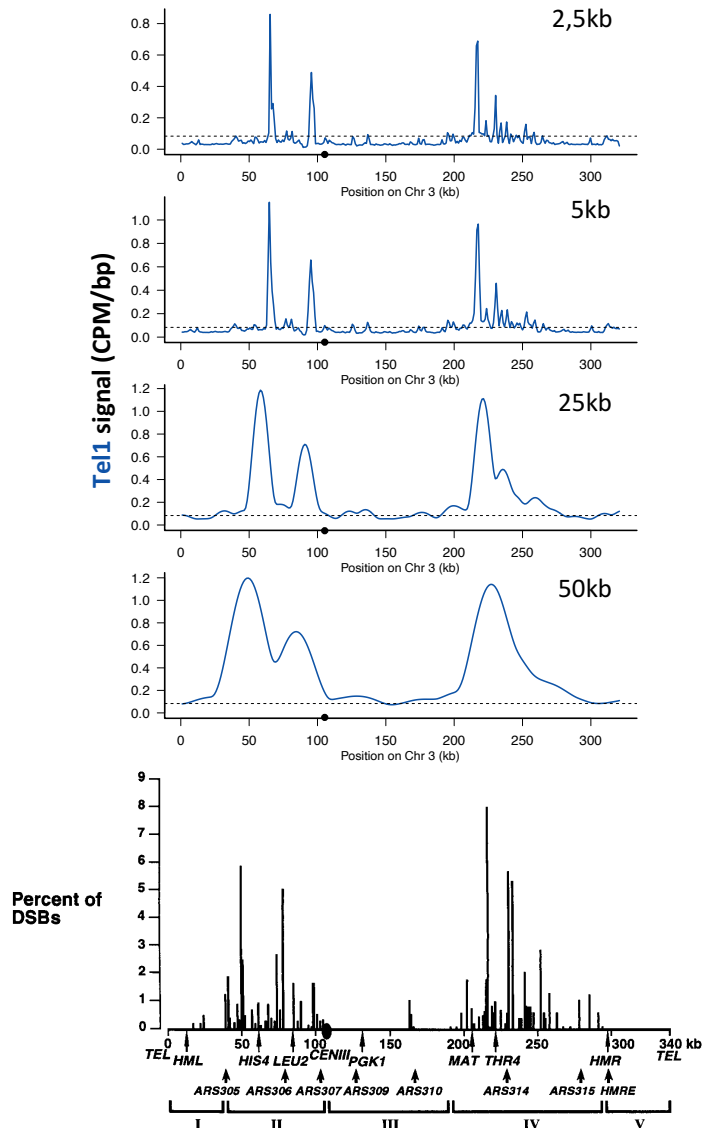


Figure 44 : Enrichissement chromosomique de Tel1 à différentes échelles sur le chromosome III

Les données brutes de ChIP-seq ont été lissées à l'aide de la fonction de Hann sur différentes tailles de fenêtre (2,5kb, 5kb, 25kb et 50kb). Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage. L'ensemble des chromosomes est présenté en Annexe 5. Le panneau du bas est une carte résumant la localisation et la fréquence des DSBs formés sur le chromosome III, et a été réalisée par mesure systématique du niveau de DSBs par électrophorèse à champs pulsés. Cette figure est tirée et adaptée de Baudat et Nicolas, 1997.

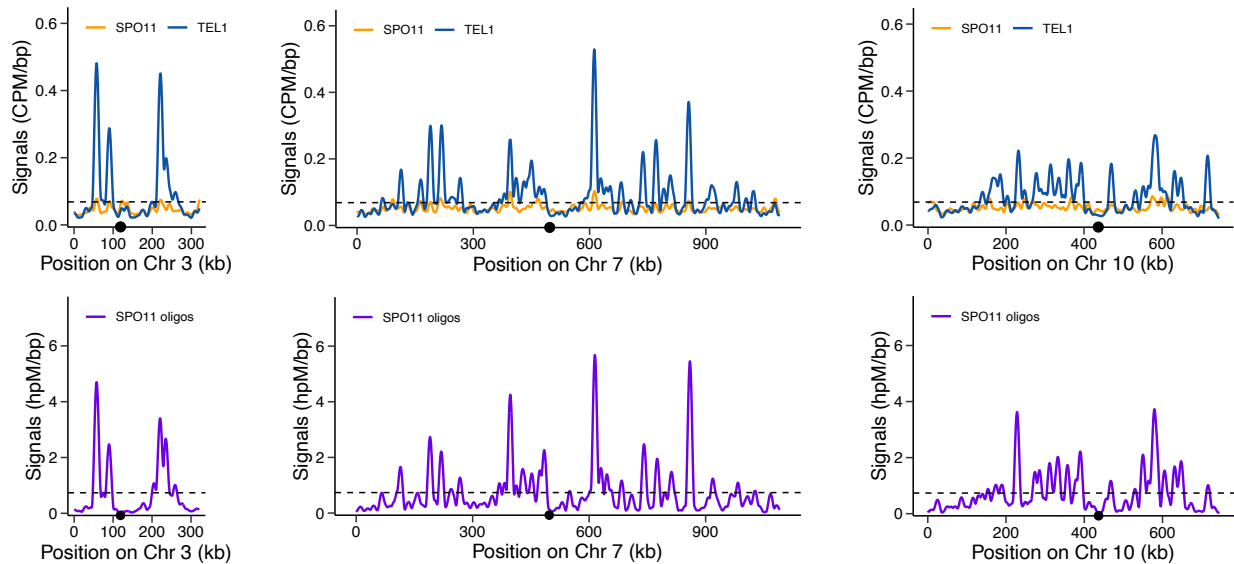


Figure 45 : Comparaison des signaux d'enrichissement de Tel1 et Spo11 aux signaux de DSBs après lissage du signal à 25kb

Les données brutes de ChIP-seq et de CC-seq (Gittens et al., 2019) ont été lissées sur fenêtre glissante de 25kb, et tous les chromosomes sont représentés à la même échelle. L'enrichissement en Tel1 correspond à la courbe bleue, et Spo11 à la courbe orange. L'enrichissement en Spo11-oligos obtenus par CC-seq correspond à la courbe violette. Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage. L'ensemble des chromosomes est en Annexe 6.

Des analyses par fenêtres glissantes à 2,5kb, 5kb, 25kb et 50kb nous ont permis de lisser les signaux Tel1 et Spo11 et d'observer l'enrichissement global des protéines Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome (Figure 44, Annexe 5). Cette analyse a mis en évidence la présence de domaine d'enrichissement : sur le chromosome III par exemple (Figure 44) où l'on peut observer de nombreux pics Tel1 de différentes intensités après lissage à 2,5kb, dont trois de très forte intensité. Ces pics de forte intensité correspondent à des hotspots connus, tels que *ARE1* sur le bras droit du chromosome III (Pan et al., 2011). En augmentant la fenêtre de lissage, les pics d'enrichissement de forte intensité englobent progressivement les signaux adjacents, et deux domaines principaux d'enrichissement de Tel1 apparaissent après lissage à 25kb (Figure 44). Ces domaines d'enrichissement de Tel1 correspondent aux domaines chauds de formation de DSBs mis en évidence par Baudat *et al.* (Baudat and Nicolas, 1997), suggérant globalement un enrichissement de Tel1 proportionnel à la force des hotspots. Afin de comparer le recrutement de Tel1 et Spo11 entre les différents chromosomes, nous avons fixé la fenêtre de lissage à 25kb et appliqué la même échelle à tous les chromosomes (Figure 45, Annexe 6). Nous avons appliqué le même procédé aux données de « Spo11-oligos » (Gittens et al., 2019), afin de comparer la distribution de Tel1 et Spo11 à celle des DSBs (Figure 45, Annexe 6). Dans l'ensemble, des pics d'enrichissement en Tel1 de forte intensité sont présents sur tous les chromosomes, quelle que soit leur taille, et les domaines d'enrichissements de Tel1 observés sur le chromosome III (Figure 44, Figure 45, Annexe 6) sont retrouvés sur les différents chromosomes (Figure 45, Annexe 6). De plus, pour l'ensemble des chromosomes, le signal Tel1 corrèle fortement au signal de Spo11-oligos (Figure 45, Annexe 6), suggérant que l'enrichissement en Tel1 est proportionnel à la force des hotspots. L'enrichissement de Spo11 apparaît beaucoup plus faible que celui de Tel1 sur l'ensemble des chromosomes (Figure 45). Cependant, des limites expérimentales qui seront explicitées par la suite peuvent expliquer le faible enrichissement de Spo11.

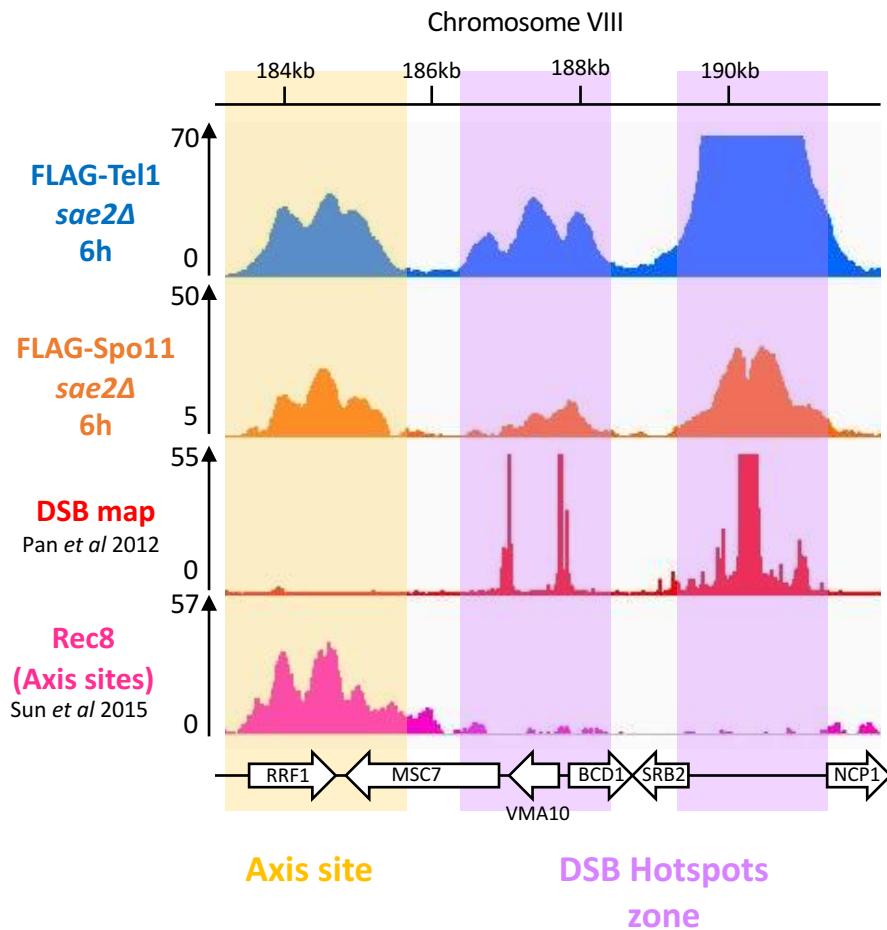


Figure 46 : Enrichissement de Tel1 et Spo11 sur une région du chromosome VIII

Zoom sur une région du chromosome VIII. Sur cette portion de génome, trois pics de Tel1 sont présents et colocalisent avec des pics Spo11. Deux de ces pics apparaissent associés aux sites de cassures (surlignés en rose) tandis que le troisième pic montre une colocalisation avec la protéine Rec8 et donc un site de l'axe, sans présence de cassures (surligné en jaune).

Enrichissement de Tel1 aux sites de cassures et aux sites de l'axe

En analysant en détail une zone du chromosome VIII, on peut observer trois pics de Tel1 et ces pics apparaissent systématiquement associés à un enrichissement en Spo11, indiquant une co-localisation des deux protéines (Figure 46). En comparant l'enrichissement en Tel1 avec la carte des Spo11-oligos (Pan et al., 2011) et le ChIP-seq de Rec8 (Sun et al., 2015), on distingue deux cas de figures. D'une part, certains pics Tel1 co-localisent avec Spo11 et les Spo11-oligos, et Rec8 n'est pas retrouvée à ces sites (Figure 46). Tel1 est donc détectée aux sites de cassures, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment par ChIP-qPCR (Figure 42). D'autre part, certains pics montrent une co-localisation de Tel1, Spo11 et Rec8, tandis qu'aucune DSB n'est détectée à ces sites (Figure 46). Tel1 semble donc également enrichie aux sites de l'axe.

À la suite de ces observations, nous avons mené différentes analyses bio-informatiques sur les données de ChIP-seq afin de répondre à différentes questions : Tel1 est-elle recrutée à tous les hotspots de cassures ? Son recrutement est-il proportionnel à la force des hotspots ? De plus, la co-localisation de Tel1 et Rec8 nous a poussé à également étudier le recrutement de Tel1 à l'axe.

Afin de confirmer l'enrichissement de Tel1 aux hotspots de cassures et à l'axe, les pics d'enrichissement de Tel1 et Spo11 ont été détectés et quantifiés *via* l'algorithme MACS2 (*cf.* Matériel et Méthode), puis triés selon leur localisation aux sites de l'axe ou aux hotspots de DSBs. Dans notre analyse, les sites de l'axe correspondent aux sites où les signaux de ChIP-seq Rec8, Red1 et Hop1 co-localisent (Figure 47C). Les sites de cassures ont été définis à partir de la carte des DSBs réalisée par CC-seq (Gittens et al., 2019). Les signaux d'enrichissement de Tel1 et Spo11 aux hotspots de cassures ou à l'axe ont ensuite été combinés (« piled-up »), et centrés respectivement sur les hotspots de cassures ou les sites de l'axe (Figure 47). À T0 aucun enrichissement de Tel1 ou Spo11 n'est observé (Figure 47A, Figure 47B). À 6h post-induction méiotique, Tel1 est fortement enrichie aux sites de cassures (Figure 47A) et aux sites de l'axe (Figure 47B).

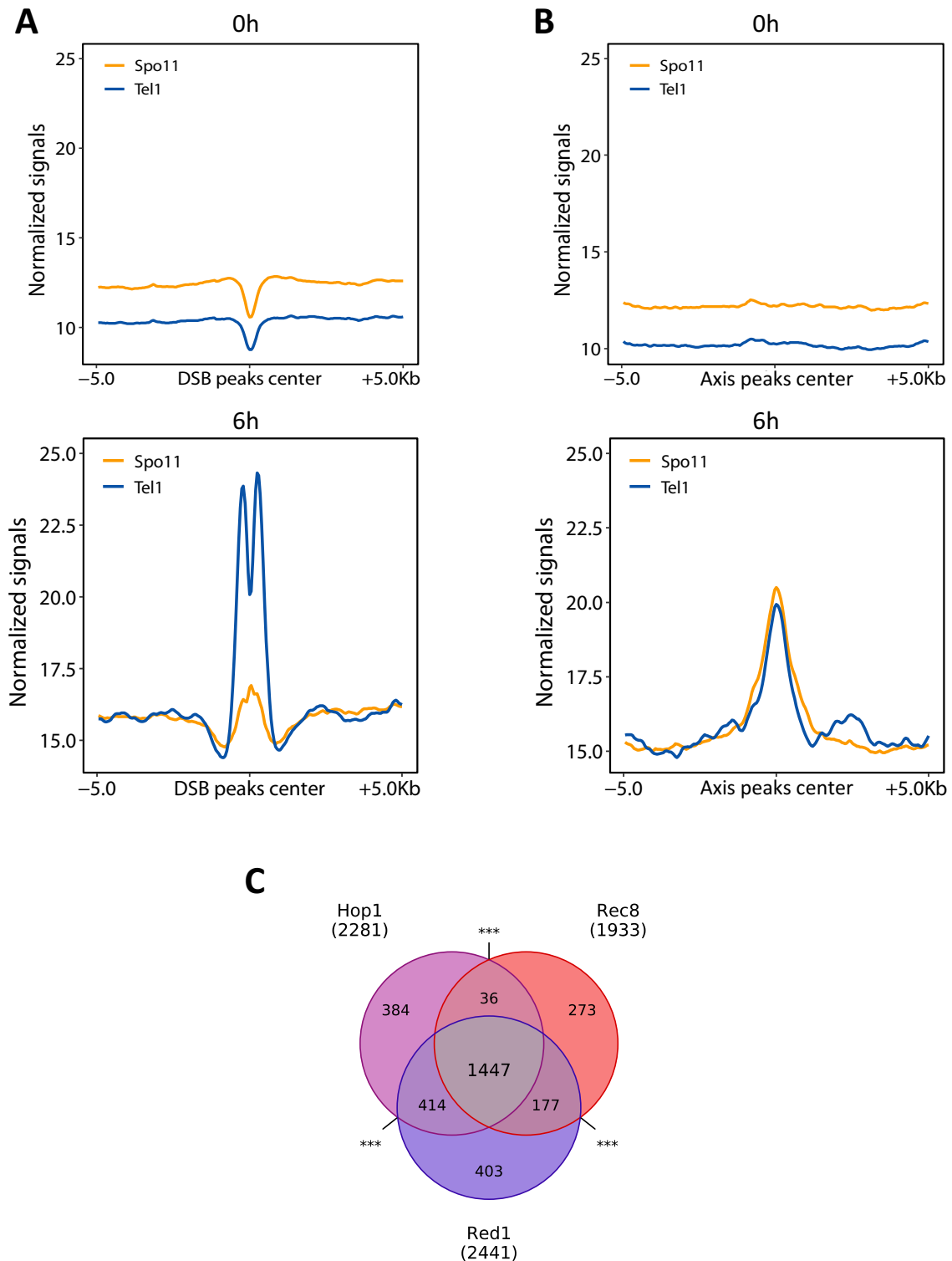


Figure 47 : Recrutement de Tel1 et Spo11 aux sites de cassures et aux sites de l'axe

(A) Empilement des signaux d'enrichissements en FLAG-Tel1 (bleu) et FLAG-Spo11 (orange) centré sur les hotspots de cassures à 0h et 6h après induction méiotique.

(B) Empilement des signaux d'enrichissements en FLAG-Tel1 (bleu) et FLAG-Spo11 (orange) centré sur les sites de l'axe à 0h et 6h après induction méiotique.

(C) Diagramme de Venn qui représente la co-localisation des sites d'enrichissements de Hop1, Red1 et Rec8. Dans les analyses de ChIP-seq, les sites de l'axe sont définis par la co-localisation des trois protéines de l'axe.

Chez *S. cerevisiae*, ~3600 hotspots de cassures ont été définis par Pan *et al.*, or sur les 1971 sites d'enrichissement de Tel1 totaux, seuls 1505 sites correspondent à un site de cassures (Figure 48A). De plus, nous avons défini 1447 sites de l'axe, et nous avons enregistré 965 sites d'enrichissement de Tel1 correspondant à l'axe (Figure 48A). Ce résultat suggère que Tel1 n'est pas recrutée à tous les hotspots de cassures et à tous les sites de l'axe, cependant cette différence peut s'expliquer par le fait que certains pics Tel1 englobent plusieurs hotspots ou encore des hotspots et des sites de l'axe (Annexe 13, cf. IV – Discussion). Afin de d'évaluer si Tel1 est présente à tous les hotspots de cassures, nous avons cherché à déterminer si un pic Tel1 était associé ou non à chaque hotspot de cassures. Ainsi, sur les 3601 sites de cassures déterminés par nos analyses, 2068 d'entre eux sont associés à un pic Tel1 (Figure 48C). En analysant la force des hotspots enrichis ou non en Tel1, il est apparu que les hotspots non enrichis en Tel1 présentent un niveau de Spo11-oligos faible (0,3 hphM/bp) par rapport aux hotspots enrichis en Tel1 (0,85 hphM/bp, *p-valeur* = 7,04e-183) (Figure 48D). Ainsi, si Tel1 est enrichie sur ~2/3 des hotspots les plus forts, elle ne semble pas être recrutée aux hotspots les plus faibles, bien que ce résultat puisse également provenir d'un défaut dans notre analyse (cf. VI – Discussion). L'analyse des signaux Spo11 montre un enrichissement moins important que celui de Tel1 aux hotspots de cassures (Figure 47A), et celle-ci est retrouvée sur 1213 hotspots (Figure 40B). À l'axe cependant, Spo11 est enrichie dans les mêmes proportions que Tel1 (Figure 47B, Figure 48B). Le faible enrichissement de Spo11 aux sites de cassures semble principalement dû au mode d'action de la protéine Spo11 elle-même : la liaison covalente générée lors de la catalyse d'une DSB interfère avec le processus de séquençage de l'ADN. Ainsi, seule une fraction des protéines Spo11 sont détectées aux sites de cassures (cf. VI – Discussion). Nous avons également noté que l'enrichissement de Tel1 aux sites de cassures n'apparaît pas comme un seul pic d'enrichissement, mais sous la forme d'un double pic, contrairement à l'enrichissement de Tel1 à l'axe. Cette forme « en volcan » est également visible lors de la visualisation des données sur IGV et peut être expliquée par plusieurs facteurs : premièrement, la présence de DSBs elle-même induit une perte de signal ; deuxièmement, la présence de Spo11 liée de manière covalente aux extrémités de la cassure en contexte *sae2Δ* qui interfère avec le séquençage; et enfin, la formation de doubles cassures intra-hotspots (Johnson et al., 2021) qui ne peuvent pas être séquencées, induisant ainsi une perte de signal. Ces différents points seront abordés en VI – Discussion.

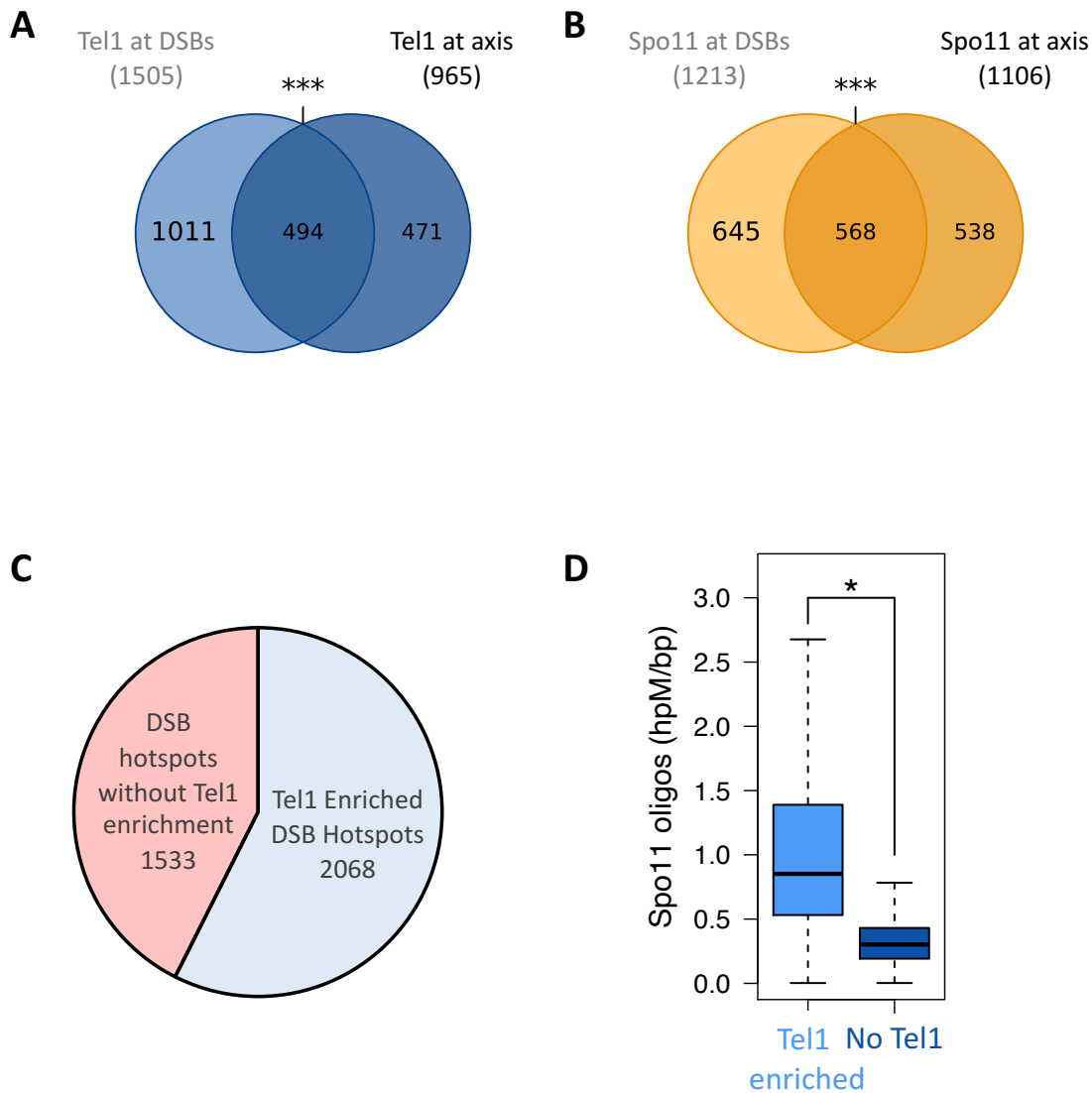


Figure 48 : Distribution des pics d'enrichissements en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11

Les pics de Tel1 et Spo11 sont détectés et quantifiés par l'algorithme MACS2. Les coordonnées de chaque pic sont ensuite comparées aux coordonnées des hotspots de DSBs (Gittens et al., 2019) et des sites de l'axe (sites d'enrichissement en Rec8, Hop1 et Red1 (Sun et al., 2015). Ainsi, chaque pic Tel1 ou Spo11 est associé aux sites de DSBs ou de l'axe. En raison d'une limite de l'algorithme MACS2, certains pics sont associés à la fois aux sites de DSBs et aux sites de l'axe (cf. Annexe 13).

(A) Diagramme de Venn représentant la distribution des pics FLAG-Tel1 obtenus par ChIP-seq entre les sites de DSBs et les sites de l'axe à 6h post induction méiotique.

(B) Diagramme de Venn représentant la distribution des pics FLAG-Spo11 obtenus par ChIP-seq entre les sites de DSBs et les sites de l'axe à 6h post induction méiotique.

(C) Représentation graphique de la proportion de sites de cassures qui présentent un enrichissement ou non en protéine Tel1.

(D) Comparaison du niveau de Spo11-oligos entre hotspots enrichis en Tel1 et hotspots ne présentant pas d'enrichissement en Tel1.

Ces analyses ont notamment permis de montrer que les protéines Tel1 et Spo11 sont enrichies aux hotspots de cassures et à l'axe sur l'ensemble du génome. Toutefois, sur les diagrammes de Venn présentés en Figure 48, 494 pics de Tel1 et 568 pics de Spo11 semblent correspondre à la fois aux hotspots de cassures et aux sites de l'axe (Figure 48). Ce résultat provient d'un artefact causé par l'algorithme MACS2 et sera discuté en VI – Discussion. Brièvement, la discrimination de pics très proches les uns des autres, ou à proximité de forts sites d'enrichissement en Tel1 n'est pas optimale dans l'algorithme utilisé. Ce défaut de l'algorithme amène à une sous-estimation du nombre de pics Tel1 et Spo11, et à l'attribution d'une « double localisation » des protéines (*cf.* VI – Discussion).

Sur les 2236 pics de Tel1, 260 ne sont associés ni à l'axe ni aux hotspots d'après l'algorithme. J'ai vérifié manuellement la localisation d'une fraction de ces pics, et il est apparu que ceux-ci correspondent majoritairement à des sites d'enrichissement en Hop1, Red1 ou Rec8, et donc certainement à des sites de l'axe. Cependant, nous avons défini les sites de l'axe comme correspondant à la co-localisation stricte des trois protéines dans notre analyse, ce qui exclut les pics Tel1 co-localisant uniquement avec deux ou une seule des protéines de l'axe. Le nombre de pics Tel1 localisés à l'axe est donc certainement sous-estimé. Tel1 ne semble donc pas être recrutée à d'autres régions du génome que les sites de cassures ou de l'axe.

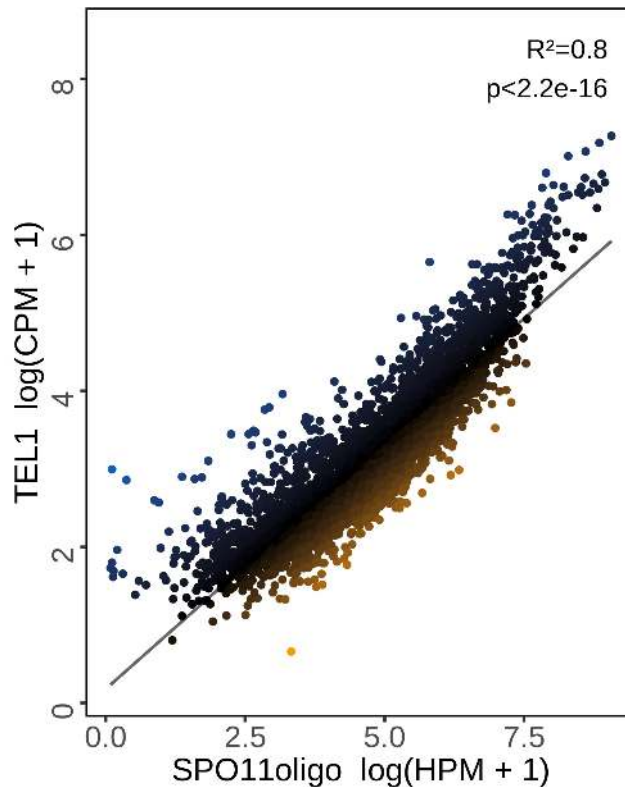


Figure 49 : Corrélation de l'enrichissement en Tel1 avec le nombre de Spo11-oligos à chaque hotspot de cassures

L'enrichissement de Tel1 à chaque hotspot de cassures (nombre de « hits ») a été comparé au nombre de Spo11-oligos enregistrés. La tendance d'enrichissement est représentée par la régression linéaire (trait noir) qui montre une proportionnalité entre l'enrichissement de Tel1 et le nombre de Spo11-oligos à chaque hotspot. Un dégradé du bleu vers l'orange représente l'enrichissement de Tel1 par rapport à la tendance générale : les points bleus correspondent à une sur-représentation de Tel1 aux hotspots, les points oranges à une sous-représentation de Tel1.

L'analyse par fenêtre glissante sur l'ensemble des chromosomes montre un enrichissement massif de la protéine Tel1 à certains hotspots forts, suggérant que le recrutement de Tel1 est proportionnel à la force des hotspots. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé la force du signal Tel1 au nombre de Spo11-oligos à chaque hotspot (Figure 49). La force du signal Tel1 apparaît proportionnelle aux nombres de Spo11-oligos de chaque hotspot (Figure 49). Le recrutement de Tel1 aux hotspots est donc proportionnel à la force des hotspots. De plus, en analysant l'enrichissement global de Tel1 par rapport à des éléments génomiques tels que les télomères ou les centromères, il apparaît que Tel1 est moins enrichie à proximité de ces éléments (Figure 50). Cette sous-représentation de Tel1 aux télomères et aux centromères s'explique par la faible présence de sites de cassures dans ces régions (Pan et al., 2011).

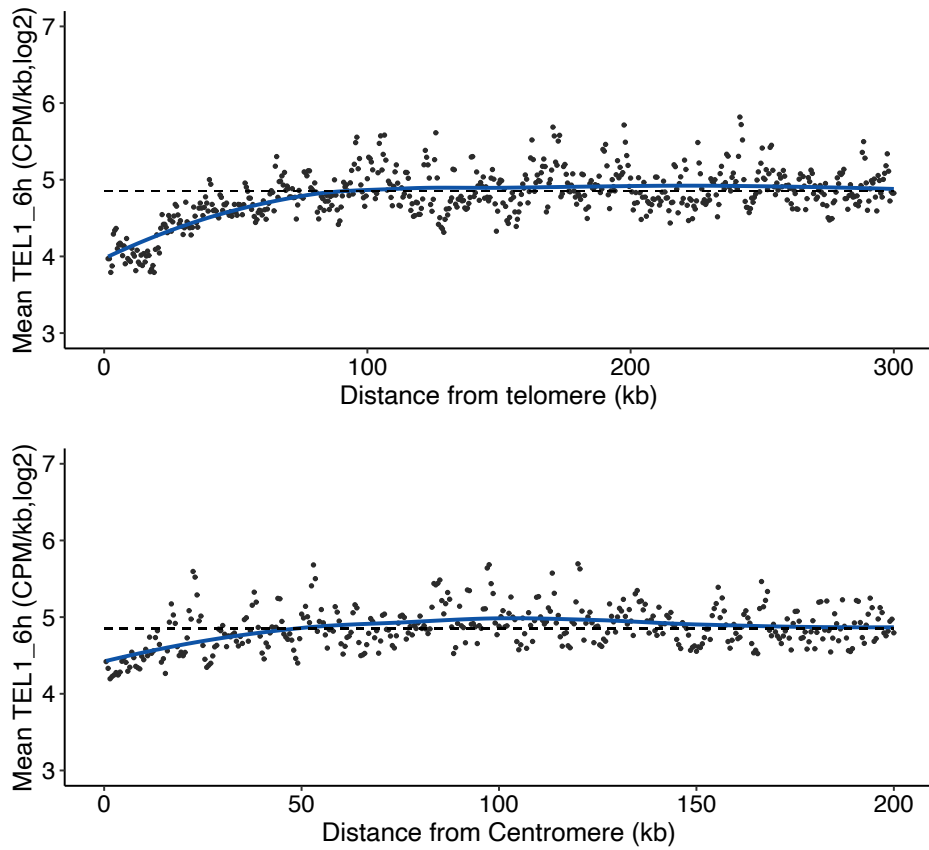


Figure 50 : Enrichissement de Tel1 autour d'éléments génomiques

L'enrichissement moyen de Tel1 sur le génome est représenté en fonction de sa distance aux télomères ou aux centromères. Une courbe de régression linéaire locale (trait bleu) permet de visualiser la tendance d'enrichissement en Tel1. A proximité des télomères et des centromères, l'enrichissement en Tel1 est réduit par rapport au reste du génome.

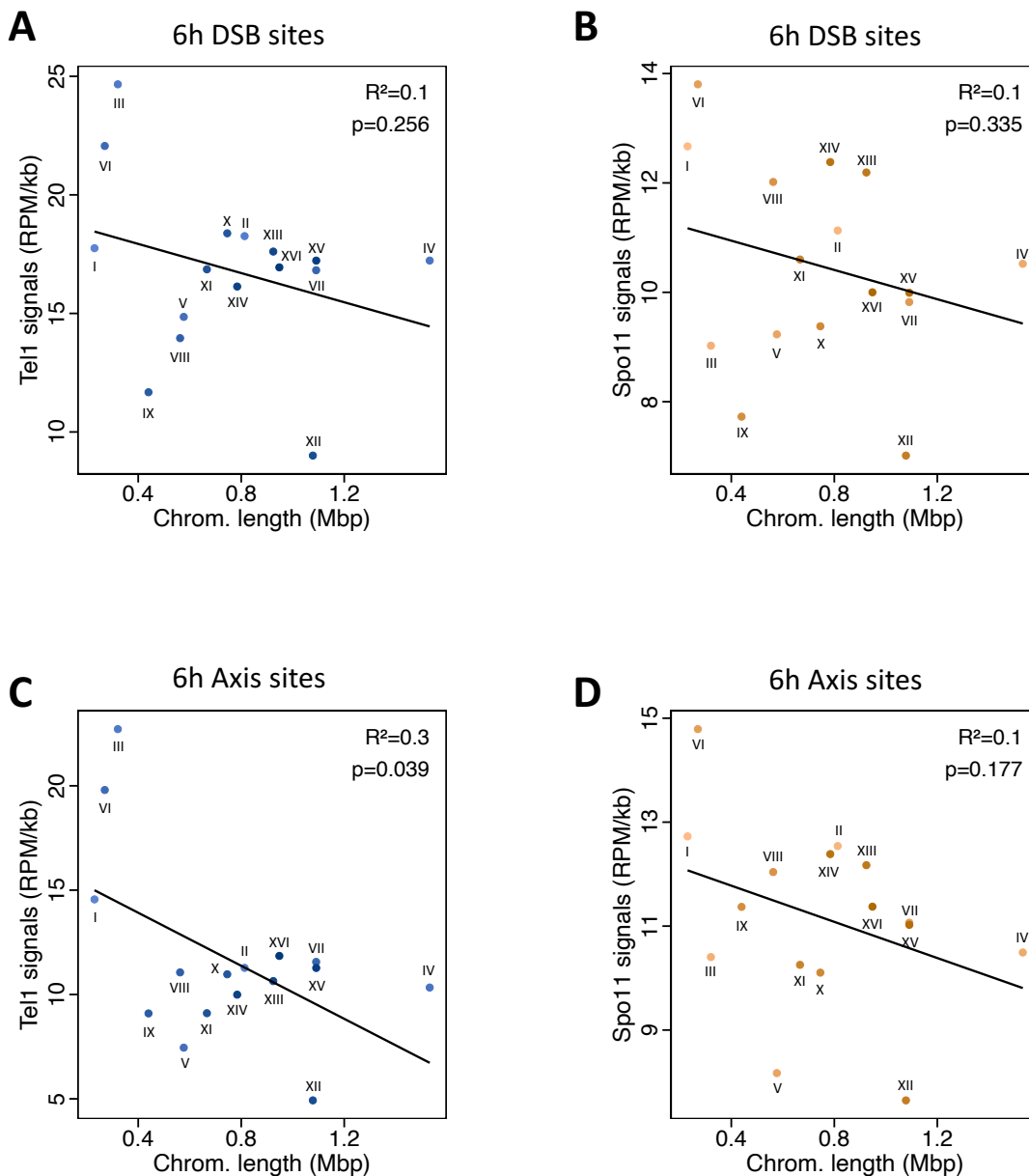


Figure 51 : Enrichissement en Tel1 et Spo11 aux hotspots de cassures ou aux sites de l'axe en fonction de la taille des chromosomes

Graphique représentant le nombre de hits de Tel1 ou Spo11 pour chaque chromosome en fonction de la taille des chromosomes. Chaque point (bleu pour Tel1, orange pour Spo11) correspond à l'enrichissement de la protéine d'intérêt sur un chromosome. L'enrichissement aux sites de cassures et aux sites de l'axe ont été analysés séparément. Pour chaque graphique, une régression linéaire a été réalisée (trait noir) et permet de visualiser la tendance d'enrichissement.

(A – B) Signaux Tel1 (A) et Spo11 (B) aux sites de cassures en fonction de la taille des chromosomes à 6h post induction méiotique

(C – D) Signaux Tel1 (C) et Spo11 (D) aux sites de l'axe en fonction de la taille des chromosomes à 6h post induction méiotique.

Puisque l'enrichissement de Tel1 est proportionnel à la force des hotspots, nous avons cherché à déterminer si celui-ci était anti-corrélé à la taille des chromosomes. En effet, les petits chromosomes forment plus de crossovers par kilobase que les grands chromosomes (Kaback et al., 1999), et il a été mis en évidence par Pan *et al.* que la fréquence de formation de DSBs est anti-corrélée à la taille des chromosomes : les petits chromosomes forment plus de cassures que les grands proportionnellement à leur taille (Pan et al., 2011). Le signal Tel1 (RPM/kb) est plus important aux hotspots de DSBs sur les petits chromosomes (chromosomes I, VI et III), et cet enrichissement décroît globalement avec l'augmentation de la taille des chromosomes (Figure 51A). Cependant, cette tendance n'est pas significative ($R^2 = 0,1$, $p\text{-valeur} > 0,25$), en raison de valeurs aberrantes obtenues pour certains chromosomes (*cf.* VI – Discussion). À l'axe, une anti-corrélation significative est détectée entre l'enrichissement en Tel1 et la taille des chromosomes ($p\text{-valeur} = 0,039$, Figure 51C). Cependant la majorité des chromosomes affichent un signal d'enrichissement similaire, quelle que soit la taille des chromosomes, aboutissant à un coefficient de corrélation faible ($R^2 = 0,3$, Figure 51C). Il y a donc une tendance d'enrichissement de Tel1 sur les petits chromosomes, mais aucune anti-corrélation significative n'a été mise en évidence. L'anti-corrélation n'est pas non plus retrouvée pour la protéine Spo11 ni aux sites de cassures (Figure 51B), ni sur l'axe (Figure 51D).

Ces résultats m'ont permis de montrer que Tel1 est enrichie sur 1971 sites du génome, et que cet enrichissement a lieu aux sites de cassures ainsi qu'aux sites de l'axe (Figure 47, Figure 48). Néanmoins, Tel1 n'est retrouvée associée qu'à 1505 hotspots de cassures tandis que ~3600 hotspots de DSBs ont été décrits chez *S. cerevisiae* (Pan et al., 2011) et ce point sera abordé en IV – Discussion. Nos analyses ont également démontré que l'enrichissement de Tel1 aux hotspots est proportionnel à la fréquence de cassures (Figure 49). Toutefois, il a été démontré que le nombre de DSBs générées par chromosome est anti-corrélé à la taille des chromosomes (Pan et al., 2011). Or, bien que l'enrichissement de Tel1 soit proportionnel à la force des hotspots, nos analyses ne montrent pas d'anti-corrélation significative entre l'enrichissement de Tel1 et la taille des chromosomes (*cf.* IV – Discussion). J'ai également observé l'enrichissement de Spo11 aux sites de cassures et aux sites de l'axe comme attendu. Cependant, nos analyses ont montré que l'enrichissement en Spo11 sur le génome est plus faible que l'enrichissement en Tel1 ce qui est probablement dû à des limitations techniques (*cf.* IV – Discussion).

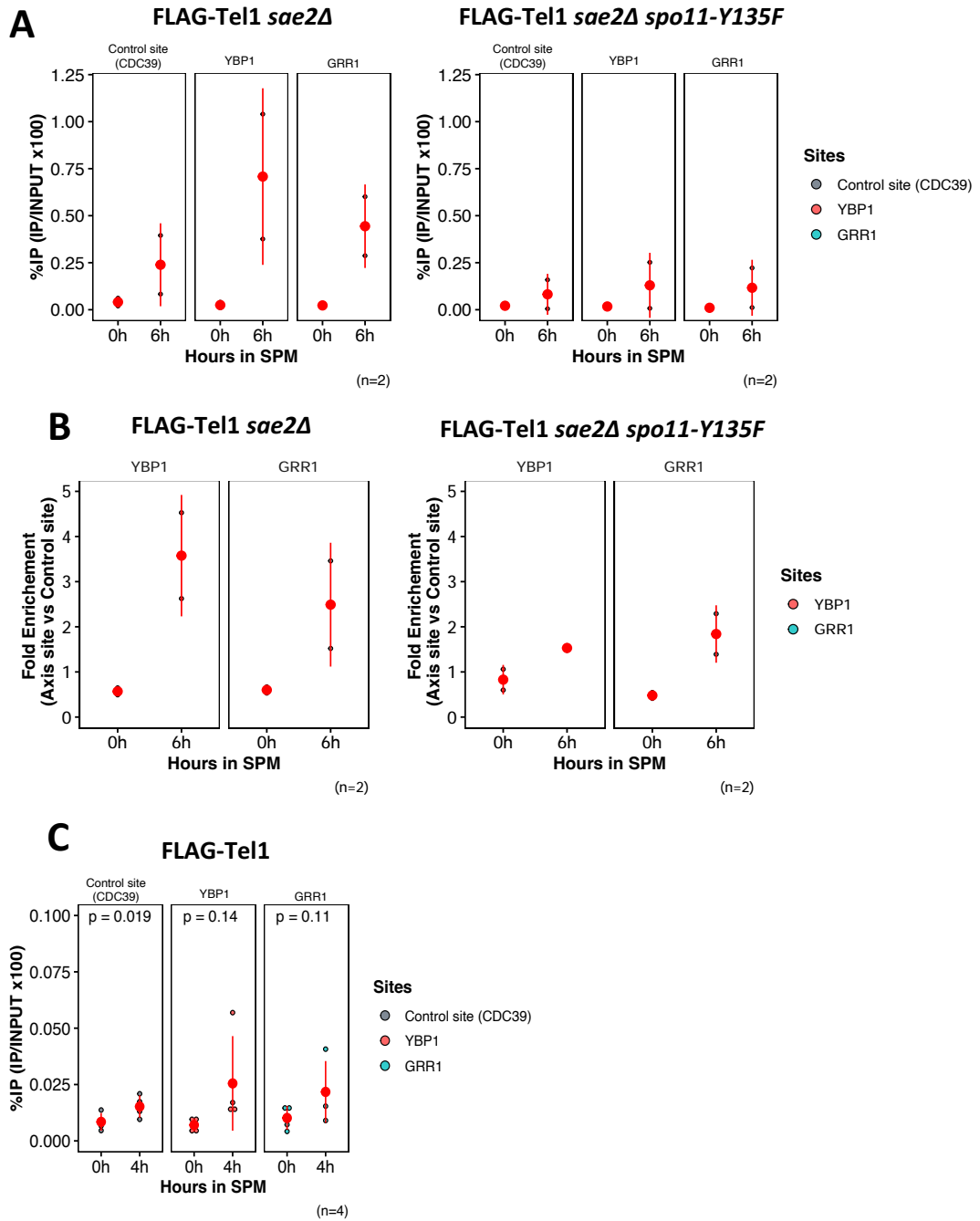


Figure 52 : Le recrutement de Tel1 à l'axe est dépendant de la formation des DSBs

(A) %IP de FLAG-Tel1 aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* et au site contrôle en contexte *sae2Δ* et *sae2Δ spo11-Y135F*.

(B) Enrichissement en FLAG-Tel1 aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* normalisé au site contrôle en contexte *sae2Δ* et *sae2Δ spo11-Y135F*.

(C) %IP de FLAG-Tel1 aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* et au site contrôle en contexte *SAE2* WT. L'ensemble des %IP et FE aux sites de l'axe sont en Annexe 7.

4. Recrutement de Tel1 à l'axe

De manière intéressante, le ChIP-seq de Tel1 a révélé un enrichissement de la protéine aux sites de l'axe. Cet enrichissement peut résulter d'un recrutement direct de la protéine Tel1 à l'axe ou être une conséquence de la formation des DSBs dans le modèle du TLAC (Acquaviva et al., 2013; Adam et al., 2018; Blat et al., 2002; Sommermeyer et al., 2013). En effet, les hotspots sont majoritairement localisés sur les boucles de chromatine, tandis que la machinerie de formation de DSBs est retrouvée sur l'axe (*cf.* Chapitre I – Partie III. Les cassures double-brin méiotiques). Lors de la génération d'une DSB, les hotspots sont amenés à proximité de l'axe *via* l'interaction H₃K₄me₃ – Spp1 – Mer2 (Acquaviva et al., 2013; Sommermeyer et al., 2013). La présence de Tel1 à l'axe pourrait ainsi être due à la proximité physique entre les sites de cassures, où Tel1 est recrutée, et les sites de l'axe.

Afin de déterminer si Tel1 est recrutée aux sites de l'axe indépendamment des coupures, j'ai étudié son recrutement en absence de cassures. Les %IP en FLAG-Tel1, mesurés par ChIP-qPCR, montre un enrichissement plus important en contexte *sae2Δ* qu'en contexte *sae2Δ spo11-Y135F* (Figure 52A). Par rapport au site contrôle, FLAG-Tel1 présente un enrichissement ~3 fois supérieur aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* par rapport au site contrôle dans un contexte *sae2Δ* (Figure 52B), ce qui est en accord avec les résultats obtenus par ChIP-seq. En contexte *spo11-Y135F sae2Δ*, Tel1 n'est pas enrichie au site de l'axe par rapport au site contrôle (Figure 52B), indiquant que la présence de Tel1 à l'axe est la conséquence de la formation des DSBs méiotiques qui s'effectue à la suite du rapprochement des hotspots à l'axe. En contexte *SAE2* WT, Tel1 n'est pas détectée aux sites de l'axe par ChIP-qPCR (Figure 52C), ce qui peut résulter d'un enrichissement trop faible ou transitoire de la protéine aux sites de l'axe dans le contexte *SAE2* sauvage.

Il apparait donc que Tel1 n'est pas directement recrutée aux sites de l'axe, mais que son recrutement nécessite la formation de cassures. Il est donc probable que la localisation de Tel1 à l'axe soit due à la liaison axe-boucle qui s'opère lors de la formation des DSBs. Il sera intéressant de déterminer si la localisation de Tel1 à l'axe est requise pour la phosphorylation de certaines de ses cibles localisées sur l'axe, telles que Hop1 (*cf.* IV – Discussion).

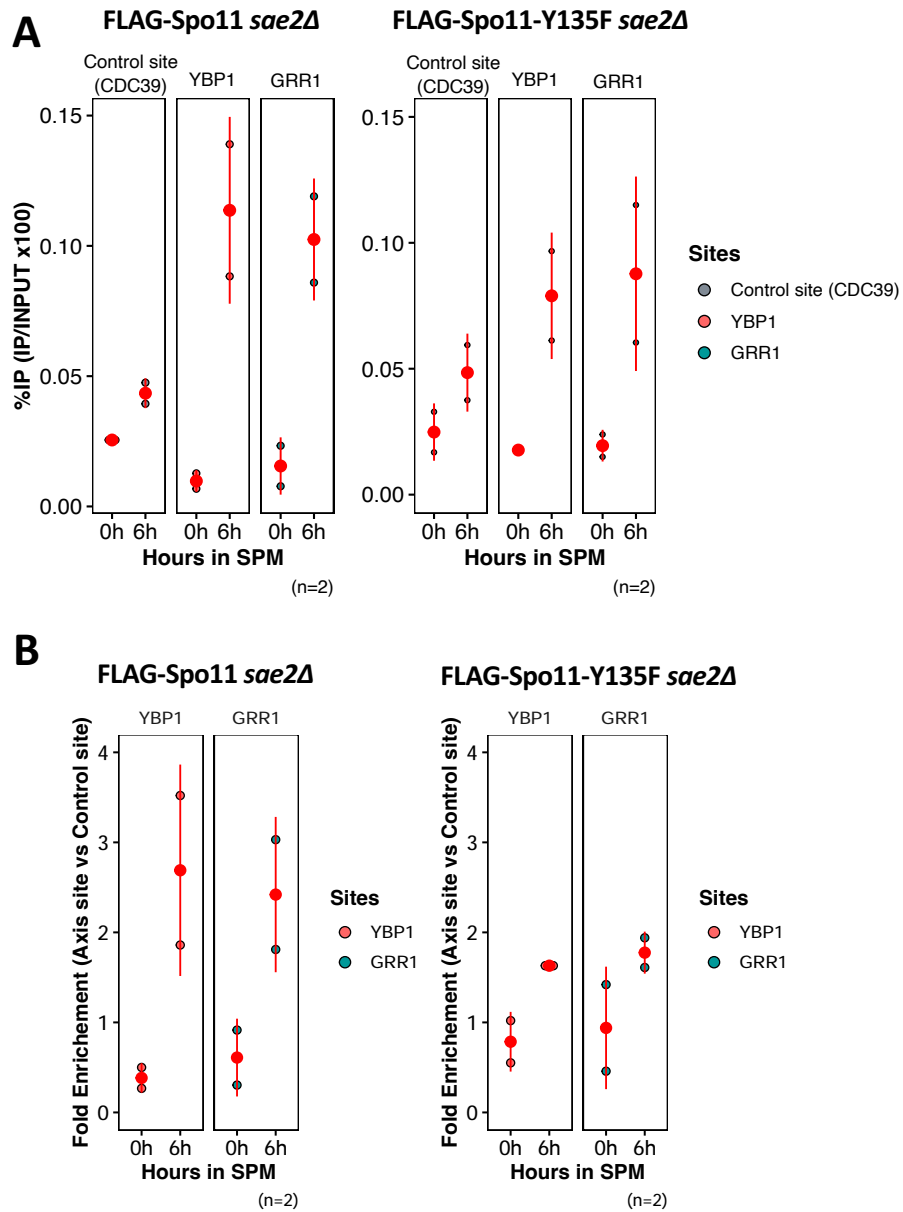


Figure 53 : Recrutement de Spo11 à l'axe

(A) %IP de FLAG-Spo11 et FLAG-Spo11-Y135F en contexte *sae2Δ* par ChIP-qPCR au site contrôlé *CDC39* et aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1*

(B) Enrichissement en FLAG-Spo11 et FLAG-Spo11-Y135F aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* normalisé au site contrôlé en contexte *sae2Δ*.

5. Localisation de Spo11 à l'axe

Nos analyses de ChIP-seq ont montré un enrichissement de la protéine Spo11 aux sites de l'axe, appuyant les données de ChIP-chip obtenues par Kugou *et al.* (Kugou *et al.*, 2009). Récemment, Johnson *et al.* ont proposé un modèle permettant d'expliquer la périodicité de 10,5pb des DCs intra-hotspots (Johnson *et al.*, 2021). Ce modèle propose la formation d'une « plateforme », certainement composée de l'axe et du complexe RMM, sur laquelle des dimères de Spo11 seraient localisés. Lorsqu'une boucle est amenée à proximité de l'axe, la présentation de petit sillon de l'ADN respectant le biais GC à un ou plusieurs dimères de Spo11 pourrait alors amener à la génération de simple ou de doubles cassures au sein d'une boucle (Johnson *et al.*, 2021). Ce modèle présuppose de la présence de Spo11 sur l'axe en amont de la formation des DSBs. Pour tester cette hypothèse, nous avons déterminé si Spo11 est présente sur l'axe en absence de son activité catalytique (Spo11-Y135F).

Sommermeyer *et al.* se sont intéressés au recrutement de Spo11-Y135F aux sites de l'axe en contexte *SAE2* WT (Sommermeyer *et al.*, 2013). Ceux-ci ont montré un enrichissement important de la protéine mutée aux hotspots de cassures, et un enrichissement faible aux sites de l'axe à ~4-5h post-induction méiotique (Sommermeyer *et al.*, 2013). Cependant l'enrichissement de la protéine Spo11-Y135F n'a pas été comparé à celui de la protéine non mutée Spo11 (Sommermeyer *et al.*, 2013). Il nous a donc semblé important de comparer l'enrichissement de Spo11 et Spo11-Y135F à l'axe, ce que j'ai réalisé en contexte *sae2Δ*.

Aux sites de l'axe, le %IP obtenu pour la protéine Spo11 augmente à 6h par rapport à T0 et au site contrôle (Figure 53A), et la normalisation au site contrôle montre un enrichissement ~2,5 fois (Figure 53B). L'enrichissement de Spo11 à l'axe est comparable à celui mesuré pour la protéine Tel1, ce qui corrèle avec les résultats obtenus par ChIP-seq où les deux protéines montrent un enrichissement similaire aux sites de l'axe (Figure 47B). Pour la protéine mutée Spo11-Y135F, les %IP obtenus sont similaires à ceux obtenus par Sommermeyer *et al.* en contexte *SAE2* WT (Figure 53A) (Sommermeyer *et al.*, 2013). L'enrichissement de Spo11-Y135F aux sites de l'axe par rapport au site contrôle est moins important que celui de la protéine sauvage (Figure 53B). Cette différence peut être due à un signal non spécifique au site contrôle plus important, ou à une stabilisation de la protéine sauvage à l'axe après formation d'une DSB. Bien que ces expériences nécessiteraient d'être reproduites, en s'appuyant sur les résultats obtenus par Sommermeyer *et al.*, il apparaît que Spo11 est présente aux sites de l'axe indépendamment de la formation des cassures, ce qui est en accord avec le modèle proposé par Johnson *et al.*

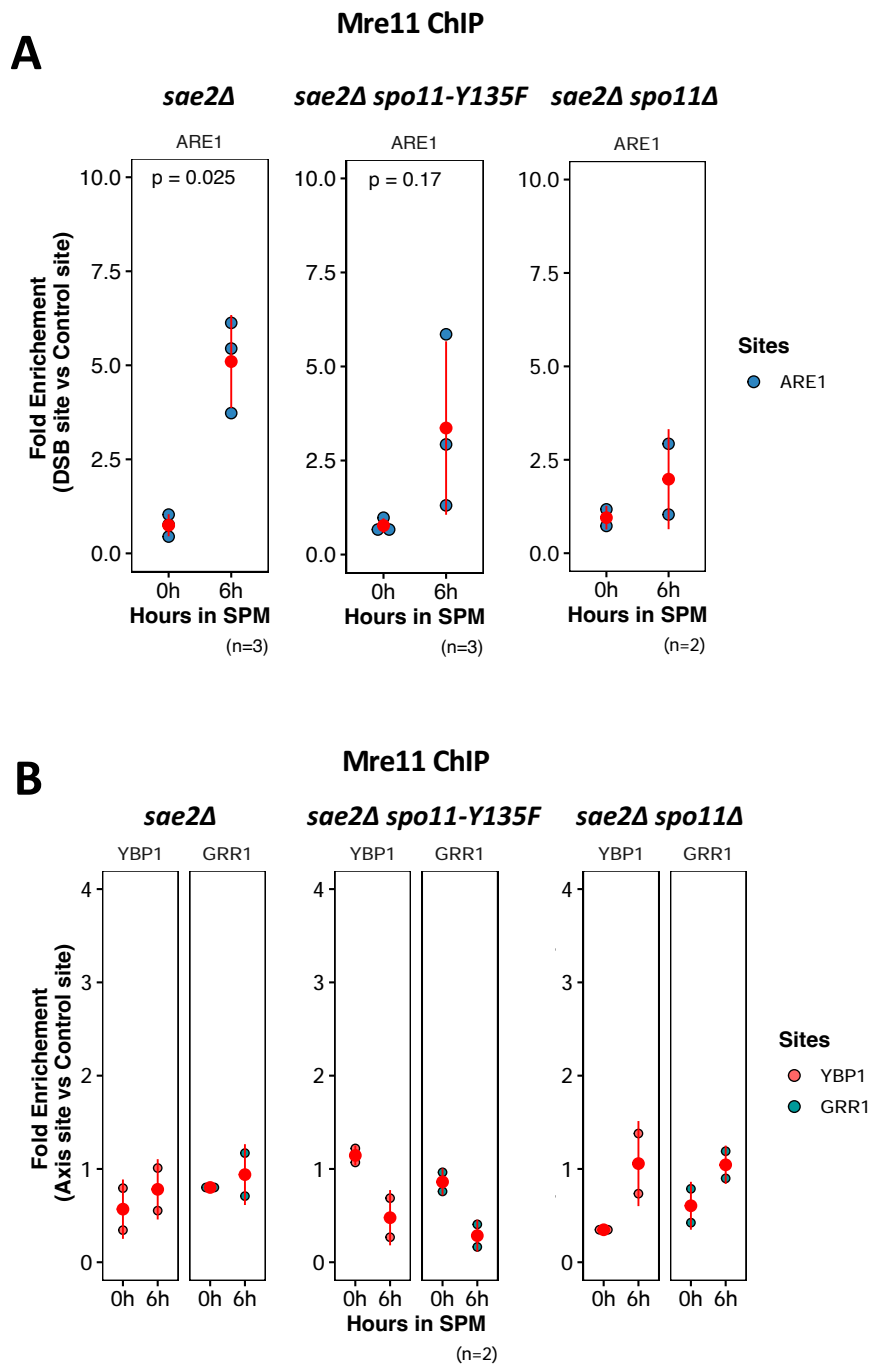


Figure 54 : Recrutement de Mre11 aux hotspots de cassures et aux sites de l'axe

(A) Enrichissement en Mre11 au site de cassures *ARE1* normalisé au site contrôle en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ spo11-Y135F* et *sae2Δ spo11Δ*. Les %IP correspondants sont présentés en Annexe 8.

(B) Enrichissement en Mre11 aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* normalisé au site contrôle en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ spo11-Y135F* et *sae2Δ spo11Δ*. Les %IP correspondants sont présentés en Annexe 8.

6. Recrutement de Mre11 aux hotspots de cassures et à l'axe

Mre11 est essentielle à la formation des DSBs (Johzuka and Ogawa, 1995) et son recrutement aux sites de cassures a été démontré en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ* (Borde et al., 2004). Mre11 est également enrichie aux sites de cassures dans un contexte *spo11-Y135F* (Borde et al., 2004) indiquant que celle-ci est recrutée aux hotspots de cassures en amont de la formation des DSBs. Cependant, Borde *et al.* ont étudié le recrutement de Mre11 par CHIP-PCR en contexte *SAE2* WT, et nous avons souhaité reproduire ces résultats par CHIP-qPCR en absence de résection. De plus, le recrutement de Mre11 à l'axe n'a pas été étudié, et il nous est apparu intéressant de vérifier son recrutement aux sites de l'axe. J'ai donc étudié le recrutement de Mre11 en contexte *sae2Δ*, d'une part, aux hotspots de cassures et d'autre part, aux sites de l'axe. J'ai également souhaité déterminer si le recrutement de Mre11 était dépendant de la formation des DSBs, et ai réalisé pour cela des CHIP-qPCR en contexte *sae2Δ spo11-Y135F* et *sae2Δ spo11Δ*. L'immunoprécipitation de Mre11 a été réalisée avec un anticorps commercial dirigé directement contre la protéine Mre11 : l'efficacité de l'anticorps a été vérifiée par immunoprécipitation suivie d'une révélation par Western blot (présenté en Chapitre VI – Partie III, Figure 74).

Dans un premier temps, j'ai mesuré un enrichissement significatif de Mre11 au locus *ARE1* en contexte *sae2Δ* où Mre11 est enrichie ~7 fois plus qu'au site contrôle (Figure 54A). Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par Borde *et al.* et confirme la présence de Mre11 aux sites de cassures méiotiques (Borde et al., 2004). Pour déterminer si ce recrutement est dépendant de la formation des DSBs, j'ai comparé l'enrichissement de Mre11 à *ARE1* en contexte *sae2Δ spo11Δ* et *sae2Δ spo11-Y135F*. En absence de la protéine Spo11, le recrutement de Mre11 est aboli aux sites de cassures (Figure 54A). En contexte *sae2Δ spo11-Y135F*, l'enrichissement moyen en Mre11 est inférieur à celui mesuré en contexte *sae2Δ* (Figure 54A) et cet enrichissement n'apparaît pas significatif (p -valeur = 0,17), ce qui peut être dû à la variabilité des données. Il serait donc nécessaire de reproduire cette expérience. Ce résultat semble entrer en contradiction avec les résultats obtenus par Borde *et al.*, cependant leurs résultats proviennent d'un fond génétique WT là où nous utilisons un fond *sae2Δ* (Borde et al., 2004). De plus, les auteurs montrent un enrichissement de Mre11 à *ARE1* en contexte *spo11-Y135F* à des temps précoces (3h post induction méiotique) là où nous nous plaçons à 6h post induction méiotique, ce qui pourrait expliquer les résultats différents obtenus. L'analyse de ces résultats et des différences avec l'étude de Borde *et al.* sera étayée en VI – Discussion.

Dans un second temps, j'ai cherché à déterminer si Mre11 était recrutée à l'axe, et si ce recrutement était dépendant de la formation des DSBs. De manière surprenante, Mre11 n'est pas enrichie à l'axe en contexte *sae2Δ* (Figure 54B). Or, la protéine est essentielle à la génération des DSBs et la machinerie de formation de DSBs est principalement retrouvée à l'axe (Kugou et al., 2009; Panizza et al., 2011), ce qui rend ce résultat inattendu. Aucun enrichissement n'est obtenu également en *spo11-Y135F* et *spo11Δ* aux sites de l'axe. L'absence de Mre11 à l'axe peut être due à une limitation technique du ChIP qui sera discuté dans la partie IV – Discussion, et ce résultat mériterait d'être approfondi par la suite.

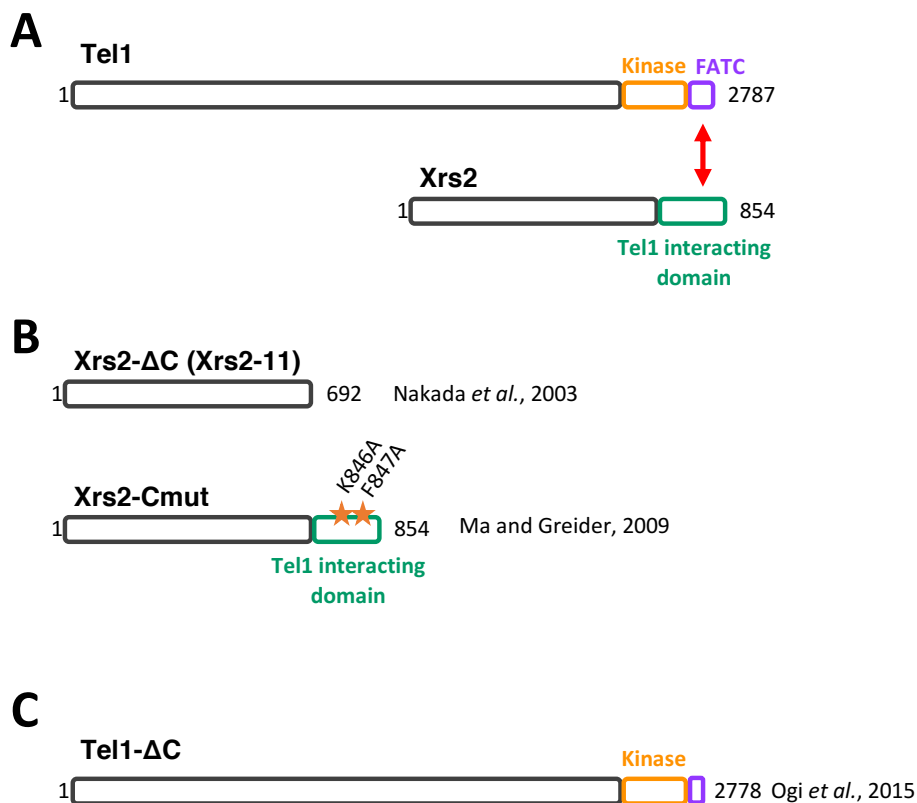


Figure 55 : Interaction Tel1 – Xrs2

(A) Schématisation de l'interaction des protéines Tel1 et Xrs2. Xrs2 possède un domaine d'interaction avec Tel1 en carboxy – terminal essentiel (Nakada, 2003). Tel1 interagit avec Xrs2 *via* ses 9 derniers acides aminés localisés dans son domaine FATC en carboxy – terminal.

(B) Schématisation des mutants *xrs2-ΔC* et *xrs2C-mut*. Le mutant *xrs2-ΔC* ou *xrs2-11* a été généré et caractérisé par Nakada *et al.* : ce mutant comporte une délétion du domaine d'interaction avec Tel1. Le mutant *xrs2-Cmut* a été généré et caractérisé par Ma et Greider : ce mutant comporte deux substitutions des acides aminés K846 et F847 en alanine (Ma and Greider, 2009).

(C) Schématisation du mutant *tel1-ΔC*. Ce mutant a été généré et caractérisé par Ogi *et al.* Il comporte une délétion des 9 derniers acides aminés de la protéine, qui sont essentiels à son interaction avec Xrs2 (Ogi et al., 2015).

II. L'interaction Tel1 – Xrs2 en méiose

Au cours du cycle mitotique, Tel1 est recrutée aux sites de DSBs et aux télomères courts *via* la protéine Xrs2, membre du complexe MRX (*cf.* Chapitre III). Ce recrutement repose sur l'interaction entre le domaine C-terminal de Xrs2 et le domaine FATC de Tel1 (Figure 55A) (Nakada, 2003; Ogi et al., 2015). En effet, l'utilisation du mutant *xrs2-ΔC* (ou *xrs2-11*) dont le domaine d'interaction avec Tel1 a été retiré (Figure 55B), abolit le recrutement de Tel1 aux DSBs générées au site HO ainsi que la phosphorylation de Rad53 dépendante de Tel1 (Nakada, 2003). Au sein de ce domaine, deux acides aminés K846 et F847 apparaissent important pour les fonctions télomériques de Tel1 (Ma and Greider, 2009). Le mutant *xrs2C-mut*, dont K846 et F847 ont été substitués par deux alanines (Figure 55B), montre des défauts d'élongation des télomères partiels en comparaison à une souche *tel1Δ* et les auteurs proposent que ces mutations réduisent le recrutement télomérique de Tel1 (Ma and Greider, 2009). Cependant, le recrutement de Tel1 aux télomères n'a pas été mesuré directement dans ce mutant, et l'effet de ce dernier aux DSBs (accidentelles ou site de cassures HO) n'a pas été étudié (Ma and Greider, 2009). De plus, il a été montré qu'en supprimant les 9 derniers acides aminés de la protéine Tel1 (*tel1-ΔC*, Figure 55C), correspondant au domaine FATC de Tel1, l'interaction de Tel1 avec Xrs2 est abolie ainsi que son recrutement aux cassures HO (Ogi et al., 2015). De manière intéressante, cette interaction est conservée chez les mammifères puisqu'ATM est recrutée aux sites de cassures *via* le domaine C-terminal de NBS1 (Falck et al., 2005; You et al., 2005). Il existe donc une interaction entre Tel1 et Xrs2 en cycle mitotique, qui supporte les activités télomériques et de réponses aux dommages à l'ADN de Tel1. Cependant, l'interaction entre Tel1 et Xrs2 n'a pas été étudiée en méiose jusqu'alors. Mes travaux de thèse se sont donc intéressés au rôle de Xrs2 dans le recrutement de Tel1 aux sites de cassures méiotiques et dans la mise en place du mécanisme d'interférence entre DSBs méiotiques. Pour étudier l'implication de Xrs2 et de son interaction avec Tel1, j'ai étudié le recrutement de Tel1 et la mise en place de l'interférence dans les mutants *xrs2-ΔC*, *xrs2C-mut* et *tel1-ΔC* (Figure 55B, Figure 55C).

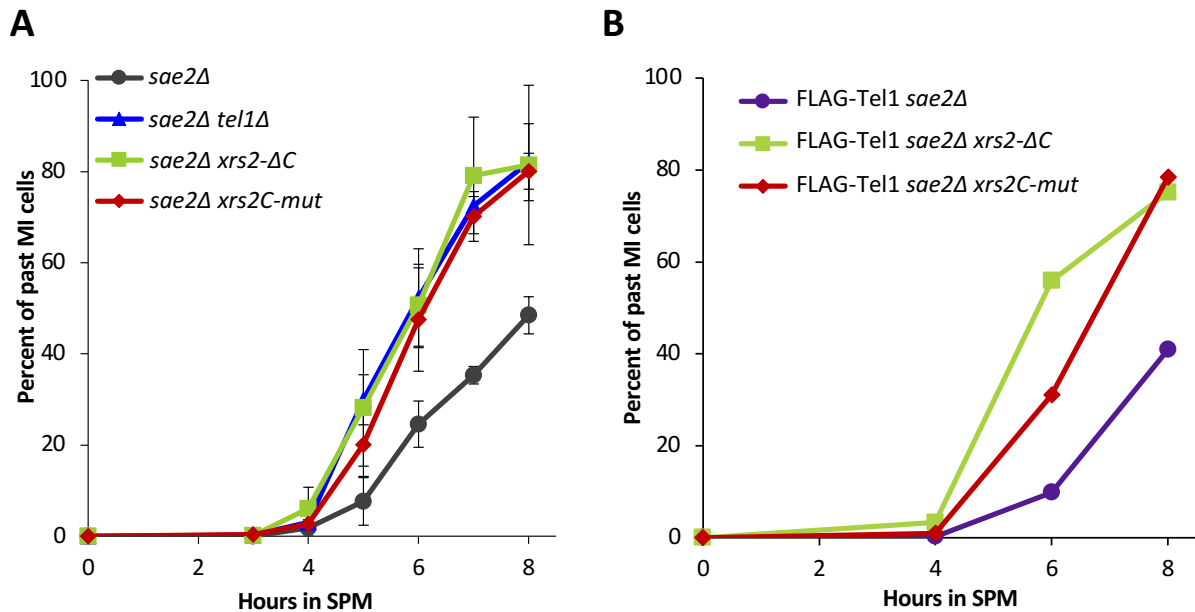


Figure 56 : Progression méiotique

(A) Progression méiotique des souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ*, *sae2Δ xrs2ΔC* et *sae2Δ xrs2C-mut*. L'avancement dans le cycle méiotique est suivi par marquage de l'ADN au DAPI et décompte des cellules à 1, 2 ou 4 noyaux. Le nombre de cellules à 2 et 4 noyaux permettent de calculer le pourcentage de cellule ayant passé la méiose I.

(B) Progression méiotique des souches FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ xrs2ΔC* et *sae2Δ xrs2C-mut*. L'avancement dans le cycle méiotique est suivi par marquage de l'ADN au DAPI et décompte des cellules à 1, 2 ou 4 noyaux. Le nombre de cellules à 2 et 4 noyaux permettent de calculer le pourcentage de cellule ayant passé la méiose I.

1. Checkpoint méiotique dépendant de Xrs2

Avant d'étudier l'effet des mutants *xrs2-ΔC* et *xrs2C-mut* sur le recrutement de Tel1 aux cassures méiotiques et la mise en place de l'interférence, j'ai vérifié la progression méiotique des souches utilisées qui sont toutes en fond génétique *sae2Δ* où la présence de cassures non résectées entraîne l'activation du « TM » checkpoint, dépendant de Tel1, de Mre11 et de Rad50 (Usui et al., 2001). Ainsi en contexte *sae2Δ*, seuls 50% des cellules en moyenne arrivent à passer la première division méiotique à 8h post-induction, tandis qu'en absence de Tel1 le checkpoint est inactivé et les cellules progressent plus rapidement (Figure 56A) (Usui et al., 2001). Les mutants *xrs2-ΔC* et *xrs2C-mut* présentent quant à eux une progression méiotique similaire à la souche *sae2Δ tel1Δ* (Figure 56A), indiquant que le TM checkpoint est aboli dans ces souches. De plus, les souches étiquetées FLAG-Tel1 *sae2Δ xrs2-ΔC* et *xrs2C-mut* présentent le même défaut de checkpoint que leurs équivalents non étiquetés, démontrant que le FLAG-tag n'impacte pas la progression méiotique de ces mutants (Figure 56B). Ce résultat montre que Xrs2 est également impliquée *via* son domaine C-

terminal dans la mise en place du TM checkpoint. Le domaine C-terminal de Xrs2 permet donc certainement l'interaction entre la protéine Tel1 et le complexe MRX nécessaire à la mise en place du checkpoint méiotique induit par les DSBs non résectées.

2. Le recrutement de Tel1 aux sites de cassures méiotiques est dépendant de Xrs2

Pour déterminer si le recrutement à l'ADN de Tel1 est dépendant de son interaction avec Xrs2 en méiose, j'ai réalisé des CHIP-qPCR en contexte *sae2Δ xrs2-ΔC* et *sae2Δ tel1-ΔC*. Le mutant *xrs2C-mut* a également été testé et les résultats obtenus seront exposés plus loin (cf. II.4). En contexte *sae2Δ xrs2-ΔC*, aucun enrichissement significatif de Tel1 n'est détecté aux sites de cassures par CHIP-qPCR (Figure 57A). De la même manière, la protéine tronquée Tel1-ΔC n'est pas enrichie aux sites de cassures (Figure 57B). Dans le même temps, j'ai mesuré l'enrichissement de la protéine Tel1 à l'axe en contexte *xrs2-ΔC*, et celui-ci est également fortement réduit en absence du domaine C-terminal de Xrs2 (Figure 57C). Le recrutement de Tel1 aux sites de cassures et à l'axe semble donc dépendant de son interaction avec le domaine C-terminal de Xrs2. Cependant, la protéine Tel1 est moins abondante dans ces deux mutants (*xrs2-ΔC sae2Δ* et *tel1-ΔC sae2Δ*) et présente le même niveau d'expression qu'en contexte *SAE2* sauvage (Figure 57D, Rakesh Aital) : la protéine Tel1 n'est pas accumulée au cours de la méiose comme en contexte *sae2Δ*. L'absence d'enrichissement de Tel1 aux sites de cassures en *xrs2-ΔC sae2Δ* pourrait donc être due à un niveau de protéine réduit dans ce contexte. De plus, nous avons montré que l'accumulation de la protéine Tel1 en contexte *sae2Δ* résulte en partie d'un arrêt de la progression méiotique (Figure 39), or dans le mutant *xrs2-ΔC sae2Δ* l'inactivation du checkpoint méiotique entraîne une progression méiotique plus rapide (Figure 56). Le niveau réduit de protéine dans ce mutant est donc, au moins en partie, une conséquence du défaut de checkpoint méiotique.

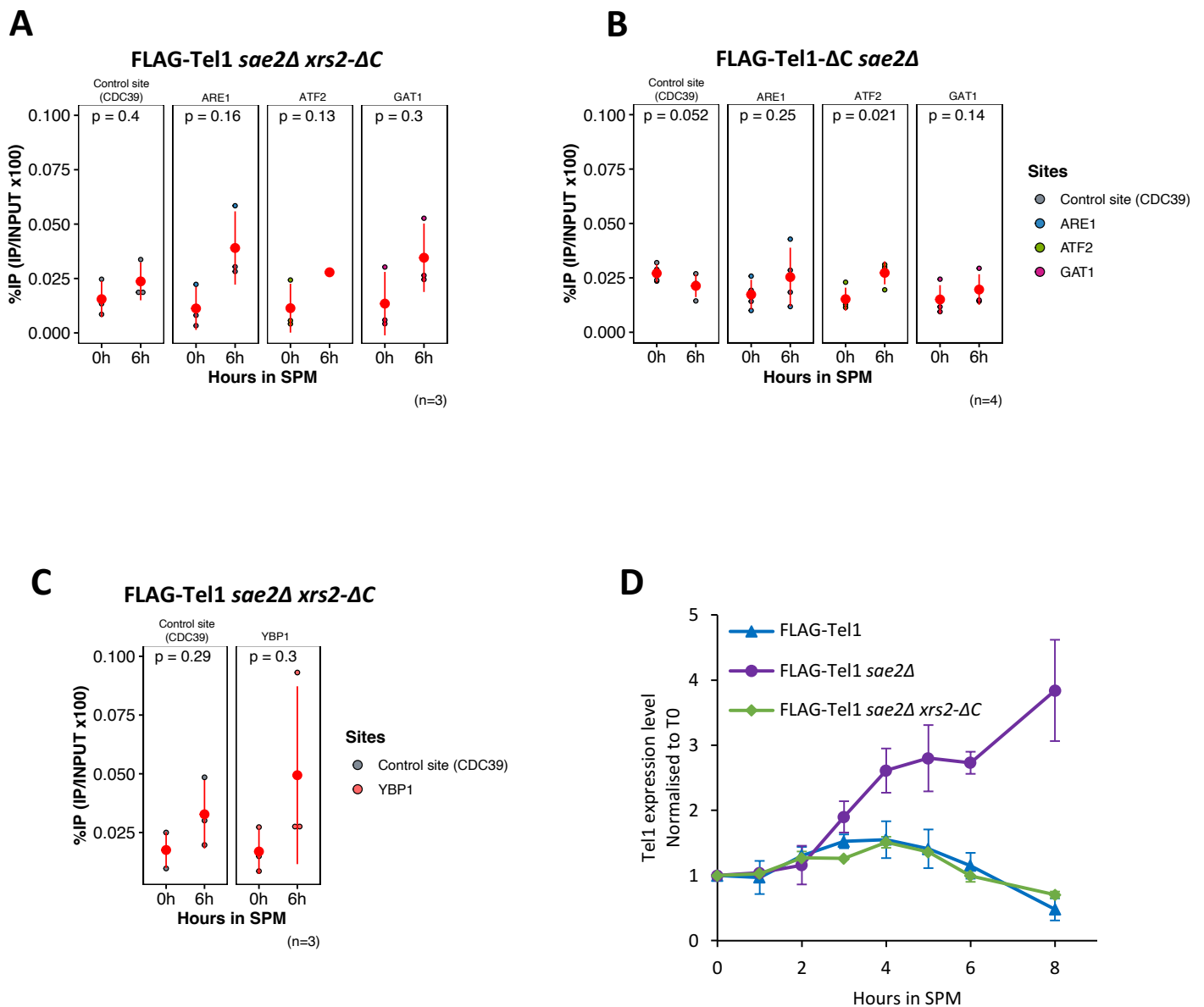


Figure 57 : Interaction Xrs2-Tel1 require pour son recrutement

(A) %IP en FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ xrs2Δ* au site contrôle et aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose.

(B) %IP en FLAG-Tel1-ΔC en contexte *sae2Δ* au site contrôle et aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose.

(C) Enrichissement de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ xrs2Δ* aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* à 6h après induction de la méiose.

(C) Quantification du niveau d'expression de FLAG-Tel1 en méiose. Les signaux détectés par Western blot sont quantifiés et normalisés au temps 0 (n=2).

Les FE correspondants sont présentés en Annexe 2 et Annexe 7

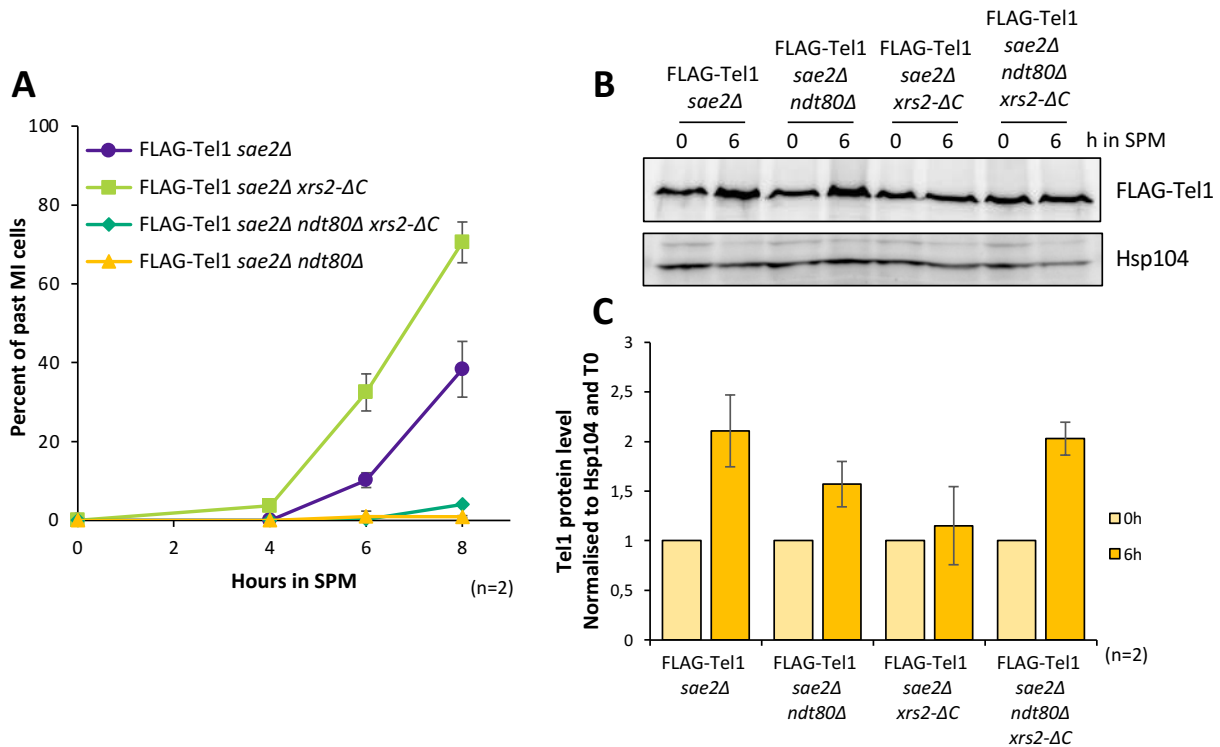


Figure 58 : Expression de Tel1 en contexte *ndt80Δ*

(A) Progression méiotique des souches *sae2Δ*, *sae2Δ xrs2ΔC*, *sae2Δ ndt80Δ* et *sae2Δ ndt80Δ xrs2ΔC*. L'avancement dans le cycle méiotique est suivi par marquage de l'ADN au DAPI et décompte des cellules à 1, 2 ou 4 noyaux.

(B) Détection de la protéine FLAG-Tel1 par Western blot en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ xrs2ΔC*, *sae2Δ ndt80Δ* et *sae2Δ ndt80Δ xrs2ΔC* à 6h après induction de la méiose.

(C) Quantification du niveau d'expression de FLAG-Tel1 à 0 et 6h post induction méiotique. Les signaux détectés par Western blot sont quantifiés et normalisés au contrôle de charge Hsp104 et au temps 0 (n=2).

Nous avons donc cherché à restaurer le niveau protéique de Tel1 mesuré en *sae2Δ* dans le contexte *xrs2-ΔC* en utilisant un mutant *ndt80Δ*. Dans ce contexte, le checkpoint du stade pachytène est activé, et les cellules ne peuvent passer la première division méiotique (Figure 58A)(Xu et al., 1995). L'arrêt du cycle cellulaire en *ndt80Δ* pourrait donc permettre de tester le rôle du domaine C-terminal de Xrs2 dans le recrutement de Tel1 en condition où le niveau protéique de Tel1 n'est pas réduit. Une première étape a donc consisté à vérifier le niveau d'expression de la protéine Tel1 en contexte *ndt80Δ*. Les ChIPs étant réalisés à 6h post induction méiotique, j'ai comparé le niveau protéique de Tel1 dans les différents contextes génétiques à 6h (Figure 58B, Figure 58C). De manière intéressante, le niveau protéique de Tel1 en contexte *ndt80Δ sae2Δ xrs2-ΔC* est similaire à celui obtenu en contexte *sae2Δ* (Figure 58C). L'utilisation d'un fond génétique *ndt80Δ* semble donc restaurer le niveau protéique de Tel1 en absence du domaine C-terminal de Xrs2.

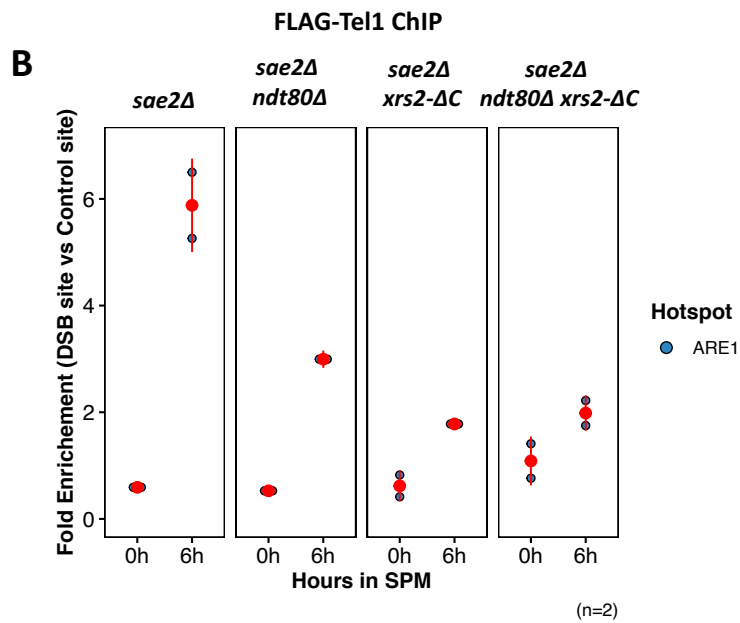
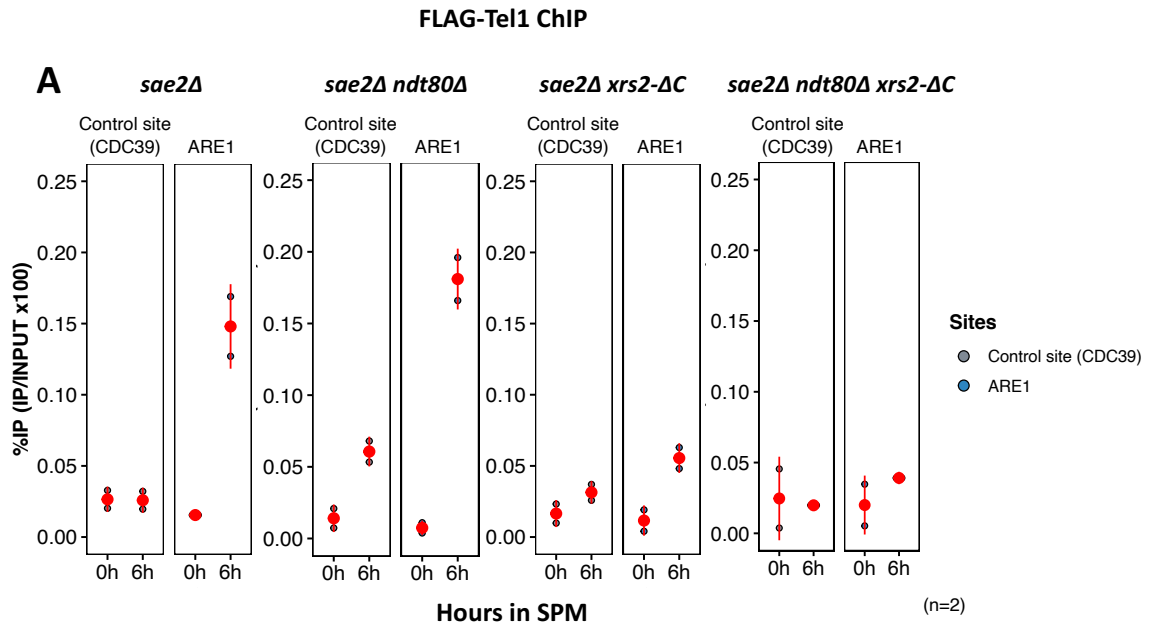


Figure 59 : Recrutement de Tel1 en contexte *xrs2-ΔC ndt80Δ*

(A) %IP de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ ndt80Δ*, *sae2Δ xrs2ΔC* et *sae2Δ ndt80Δ xrs2ΔC* par CHIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et au site de cassure *ARE1*.

(B) Enrichissement de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ ndt80Δ*, *sae2Δ xrs2ΔC* et *sae2Δ ndt80Δ xrs2ΔC* au hotspot de cassures *ARE1* à 6h après induction de la méiose.

J'ai donc pu analyser le défaut de recrutement de Tel1 en contexte *xrs2-ΔC* dans des conditions où le niveau protéique de Tel1 est le même. Les ChIPs ont été réalisés sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour la quantification du niveau protéique de Tel1. Premièrement, le niveau de %IP de Tel1 est similaire en contexte *sae2Δ* et *sae2Δ ndt80Δ* (Figure 59A). Le signal obtenu au site contrôle (*CDC39*) en contexte *sae2Δ ndt80Δ* est plus élevé qu'en contexte *sae2Δ* ce qui conduit à un enrichissement (FE) de Tel1 moins important (Figure 59B), mais Tel1 est néanmoins recrutée en absence de Ndt80. Cependant, en contexte *xrs2-ΔC sae2Δ*, l'enrichissement à *ARE1* est fortement réduit, et ce même en contexte *ndt80Δ* (Figure 59A, Figure 59B). Nous pouvons ainsi conclure que l'absence d'enrichissement en Tel1 aux sites de cassures en contexte *xrs2-ΔC* n'est pas due au niveau réduit de la protéine Tel1 dans ce mutant. Tel1 est donc recrutée aux sites de cassures par l'intermédiaire de Xrs2, spécifiquement *via* son interaction avec le domaine C-terminal de Xrs2, de la même manière qu'en cycle mitotique. L'interaction entre Tel1 et Xrs2 est donc essentielle au recrutement de la protéine kinase aux sites de cassures et à la mise en place du checkpoint méiotique dépendant de Tel1. Ces premières conclusions nous ont amenées à interroger le rôle de cette interaction dans une autre activité méiotique portée par Tel1 : la mise en place de l'interférence entre DSBs méiotiques.

3. Xrs2 est requise pour la mise en place de l'interférence

Le recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures méiotiques est dépendant de la formation des DSBs et du domaine C-terminal de la protéine Xrs2. En cycle mitotique, les fonctions de réponses aux dommages à l'ADN et télomériques de Tel1 sont dépendante de son recrutement à l'ADN, *via* Xrs2 (Ma and Greider, 2009; Nakada, 2003). Il semblait donc intéressant de déterminer si le contrôle de l'interférence entre DSBs nécessite le recrutement de Tel1 aux DSBs, ou si ce contrôle s'effectue en amont de la formation des cassures.

Pour tester cette hypothèse, j'ai mesuré l'interférence au locus *HIS4::LEU2* (Figure 60A) par la même approche que Garcia *et al* (Garcia et al., 2015), dans un contexte *xrs2-ΔC* et *xrs2-Cmut* (ce dernier mutant sera traité à part en II.4). En complément, Rakesh Aithal a réalisé la même analyse dans le mutant *tel1-ΔC*.

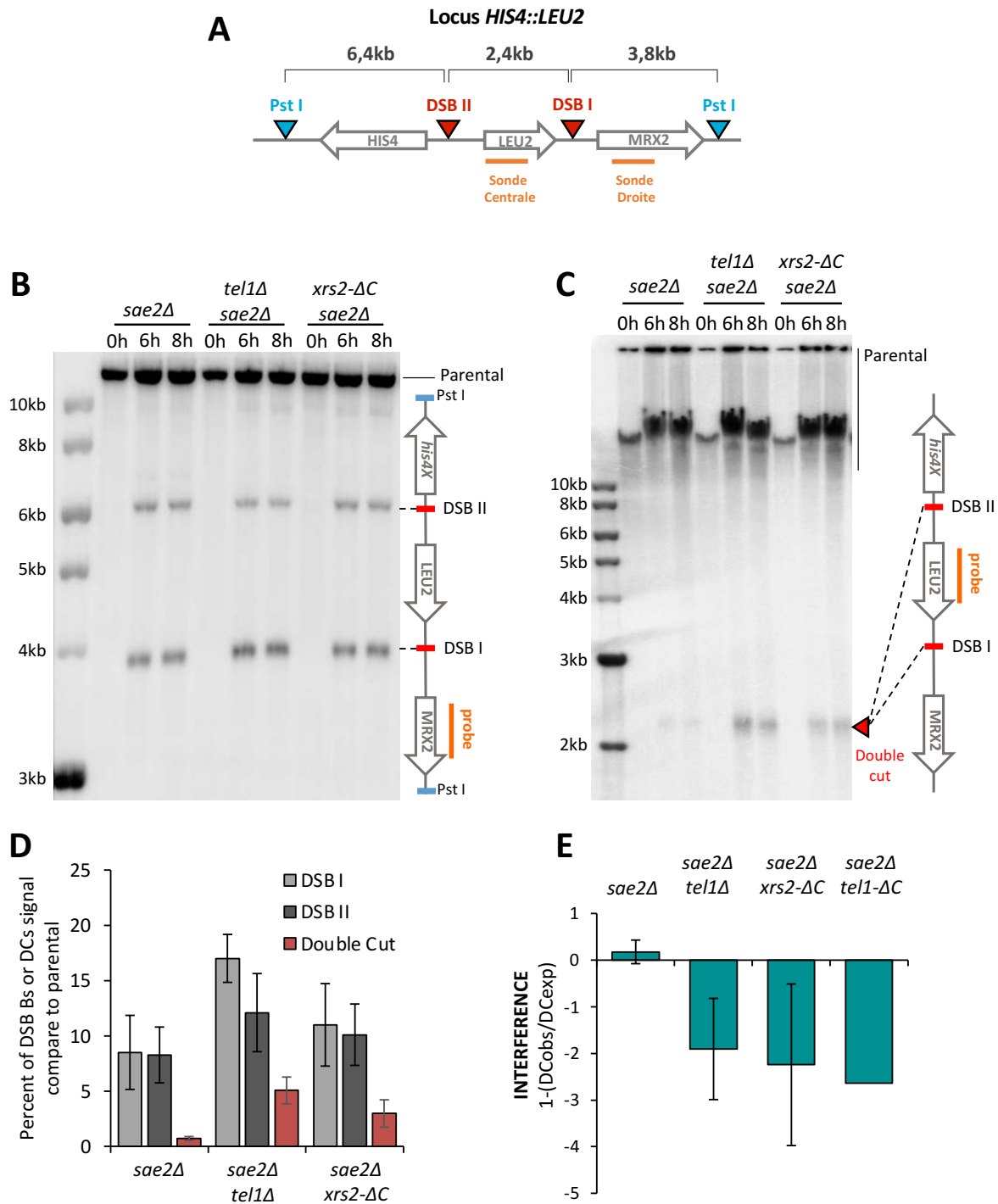


Figure 60 : Formation de DSBs et DCs au locus *HIS4::LEU2* en contexte *xrs2-ΔC*

(A) Schématisation du locus *HIS4::LEU2*

(B) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ xrs2-ΔC*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot.

(C) Détection des DCs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ xrs2-ΔC*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *LEU2* par Southern blot.

(D) Quantification des DSBs et DCs au locus *HIS4::LEU2*. Chaque valeur correspond au pourcentage de DSBs ou DCs par rapport au fragment parental. (n=4)

(E) Calcul de l'interférence entre DSBs méiotiques au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ*, *sae2Δ xrs2-ΔC* (n=4) et *sae2Δ tel1-ΔC* (n=1).

Pour rappel, deux sites de cassures sont présents au locus *HIS4::LEU2* de part et d'autre du gène *LEU2* (Figure 60A). Après digestion de l'ADN par enzyme de restriction (PstI ici), séparation sur gel d'agarose, transfert sur membrane, l'utilisation de la sonde *MRX2* à droite des sites de cassures permet de visualiser les DSBs formées aux sites I et II ainsi que les fragments non coupés (« parental », Figure 60B). La formation de DCs (*i.e.* fragments d'ADN générés par des coupures concertées au site I et II) est visualisée sans digestion préalable de l'ADNg, à l'aide d'une sonde centrale, localisée sur le gène *LEU2* (Figure 60A, Figure 60C). Les DSBs et les DCs sont ensuite quantifiées sur un autoradiogramme (Figure 60B – D).

En contexte *sae2Δ*, les DSBs sont formées aux deux sites de cassures (Figure 60B) à hauteur de ~7% (Figure 60D) et peu de DCs sont détectées (~1% de DCs, Figure 60C, Figure 60D). Comme démontré par Garcia *et al.*, le niveau de DSBs et de DCs augmente en absence de Tel1 (Figure 60B, Figure 60C) : le niveau de DSBs est d'à peu près 15% tandis que les DCs affichent un taux de 5% (Figure 60D). En contexte *sae2Δ xrs2-ΔC*, les DSBs sont formées, signifiant que le domaine C-terminal de Xrs2 n'est pas requis pour la formation des DSBs tandis que la protéine Xrs2 est essentielle à la formation des DSBs (Shima *et al.*, 2005). De plus, le niveau de DSBs et de DCs semble être plus important qu'en *sae2Δ* (Figure 60B – D) : ~13% et 4% respectivement en *sae2Δ xrs2-ΔC* contre ~7% et 1% en *sae2Δ* (Figure 60D). L'absence du domaine C-terminal de Xrs2 est donc associé à une forte augmentation du taux de DCs au locus *HIS4::LEU2*.

Ces mesures m'ont permis de calculer l'interférence entre les deux sites de cassures. Pour rappel, l'interférence est un rapport entre la fréquence de DCs observées (DC_{obs}) et la fréquence de DCs attendues (DC_{exp}), si les DSBs étaient formées de manière indépendante l'une de l'autre :

$$DC_{exp} = \frac{DSB I \times DSB II}{100} \quad I = 1 - \frac{DC_{obs}}{DC_{exp}}$$

Dans le contexte *sae2Δ*, et en accord avec les résultats de Garcia *et al.*, l'interférence calculée est nulle (Figure 60E) : les DSBs sont formées de manière indépendante l'une de l'autre et des événements de DCs peuvent survenir. En absence de Tel1, l'interférence calculée est négative (Figure 60E) : le mécanisme de contrôle limitant la formations de DCs n'est plus actif, et la formation d'une DSB parait promouvoir la formation d'une seconde DSB aux hotspots adjacents. Enfin, le mutant *sae2Δ xrs2-ΔC* présente également une interférence négative (Figure 60E), comme en absence de Tel1. Le domaine C-terminal de Xrs2 est donc requis pour limiter la formation de DCs concertées. Rakesh Aithal a également testé le mutant *sae2Δ tel1-ΔC* par Southern blot qui montre une interférence négative au locus *HIS4::LEU2* (Figure 60E). Ces résultats

permettent de conclure que l'interaction entre Tel1 et Xrs2 au contrôle de la formation de DCs. Le domaine C-terminal de Xrs2 étant requis pour le recrutement de la protéine aux sites de cassures, ces résultats indiquent que le recrutement de Tel1 aux hotspots est requis pour limiter la formation de DCs concertées.

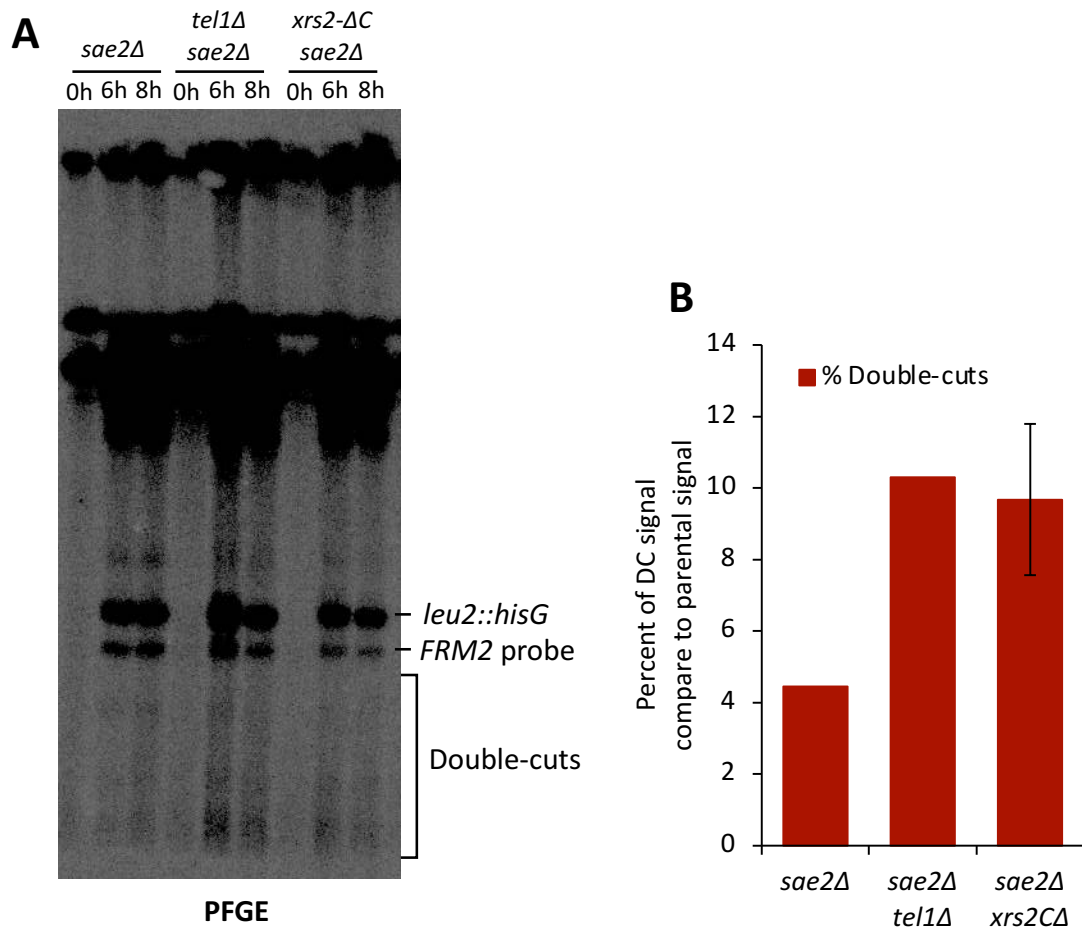


Figure 61 : Détection de DCs entre les locus *leu2::hisG* et *HIS4::LEU2*

(A) Electrophorèse à champs pulsés permettant la détection des événements de doubles cassures entre les locus *leu2::hisG* et *HIS4::LEU2* à l'aide de la sonde radiomarquée *FRM2*.

(B) Quantification du signal de double cassure par rapport à la quantité totale d'ADN (signal parental). Une moyenne des signaux à 6h et 8h a été réalisée. La souche *sae2Δ xrs2ΔC* a été testée en triplicat (n=3). n=1 pour *sae2Δ* et *sae2Δ tel1Δ*

J'ai également regardé l'impact du mutant *xrs2-ΔC* sur l'apparition de DCs entre des locus plus éloignés (*cf.* Chapitre II – Partie II). Par électrophorèse à champs pulsés, j'ai mesuré les DCs formées entre les locus *leu2::hisG* et *HIS4::LEU2* (Figure 61A). En contexte *sae2Δ* très peu de DCs sont visibles sur la membrane à 6 et 8h après induction méiotique, tandis qu'un signal plus fort apparaît dans les conditions *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ xrs2-ΔC* (Figure 61A). Après quantification des DCs, j'ai pu comparer mes résultats à ceux publiés par Garcia *et al.* : je mesure les mêmes fréquences de DCs que dans la littérature en contexte *sae2Δ* (~4%) et *sae2Δ tel1Δ* (~10%) (Figure 61B) (Garcia et al., 2015). Dans le mutant *sae2Δ xrs2-ΔC*, le même taux de DCs est mesuré entre

leu2::hisG et *HIS4::LEU2* qu'en contexte *sae2Δ tel1Δ*: ~10% (Figure 61B). Le mécanisme d'interférence limite la formation de DCs entre les locus *leu2::hisG* et *HIS4::LEU2*, et l'augmentation de la fréquence d'apparition des DCs peut refléter une perte de ce mécanisme de contrôle. Le domaine C-terminal de Xrs2 est donc également requis pour limiter la formation de DCs entre hotspots distants de ~20kb et semble participer à la mise en place de l'interférence.

L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de conclure que l'interaction Xrs2-Tel1 (via le domaine C-terminal de Xrs2) est requise pour l'activation de Tel1 en méiose. D'une part, en réponse à la formation de DSBs, Xrs2 permet le recrutement de Tel1 aux sites de cassures *via* son domaine C-terminal. D'autre part, l'interaction entre Tel1 et Xrs2 est essentielle à la mise en place du checkpoint méiotique dépendant de Tel1. Enfin, ce recrutement apparaît comme essentiel à la mise en place de l'interférence entre DSBs méiotiques.

4. Le « cas » *xrs2-Cmut*

En parallèle du mutant *xrs2-ΔC*, j'ai également testé le mutant *xrs2C-mut* qui contient deux mutations ponctuelles des acides aminés K846 et F847 (Figure 55B). En caractérisant ce mutant, Ma et Greider ont montré que celui-ci n'interagit plus avec Tel1 par co-immunoprécipitation et qu'il présente des défauts partiels d'élongation télomérique (Ma and Greider, 2009). Les autrices proposent que le mutant *xrs2C-mut* ne puisse plus recruter la protéine Tel1 aux télomères, causant les défauts d'élongation de ceux-ci. J'ai donc voulu utiliser ce mutant dans un contexte méiotique et évaluer le recrutement de Tel1 ainsi que l'interférence entre DSBs en contexte *xrs2C-mut*.

Comme montré en Figure 56, le mutant *sae2Δ xrs2C-mut* progresse de la même manière que les mutants *sae2Δ xrs2-ΔC* et *sae2Δ tel1Δ*, avec 80% des cellules qui ont passé la MI à 8h. Le mutant *xrs2C-mut* présente donc un défaut du checkpoint méiotique dépendant de Tel1, à l'image de *xrs2-ΔC*.

Par ChIP, j'ai évalué le recrutement de Tel1 aux sites de cassures dans le mutant *xrs2C-mut*, et celui-ci semble fortement réduire le recrutement de Tel1 : en contexte *sae2Δ* l'enrichissement de Tel1 est de 6 à 8 fois supérieur au site contrôle (Figure 42C), tandis qu'en contexte *sae2Δ xrs2C-mut* il est en moyenne de 2 comme dans le mutant *xrs2-ΔC* (Figure 57A, Annexe 2) ou dans le *SAE2* (Figure 41D). Cependant, le %IP mesuré est significatif en contexte *sae2Δ xrs2C-mut* contrairement au mutant *sae2Δ xrs2-ΔC* (*p-valeur* = 0,026 vs 0,16 au locus *ARE1*, Figure 62A, Figure 57A), il est donc possible qu'un recrutement faible ou transitoire de la protéine ait lieu dans ce mutant.

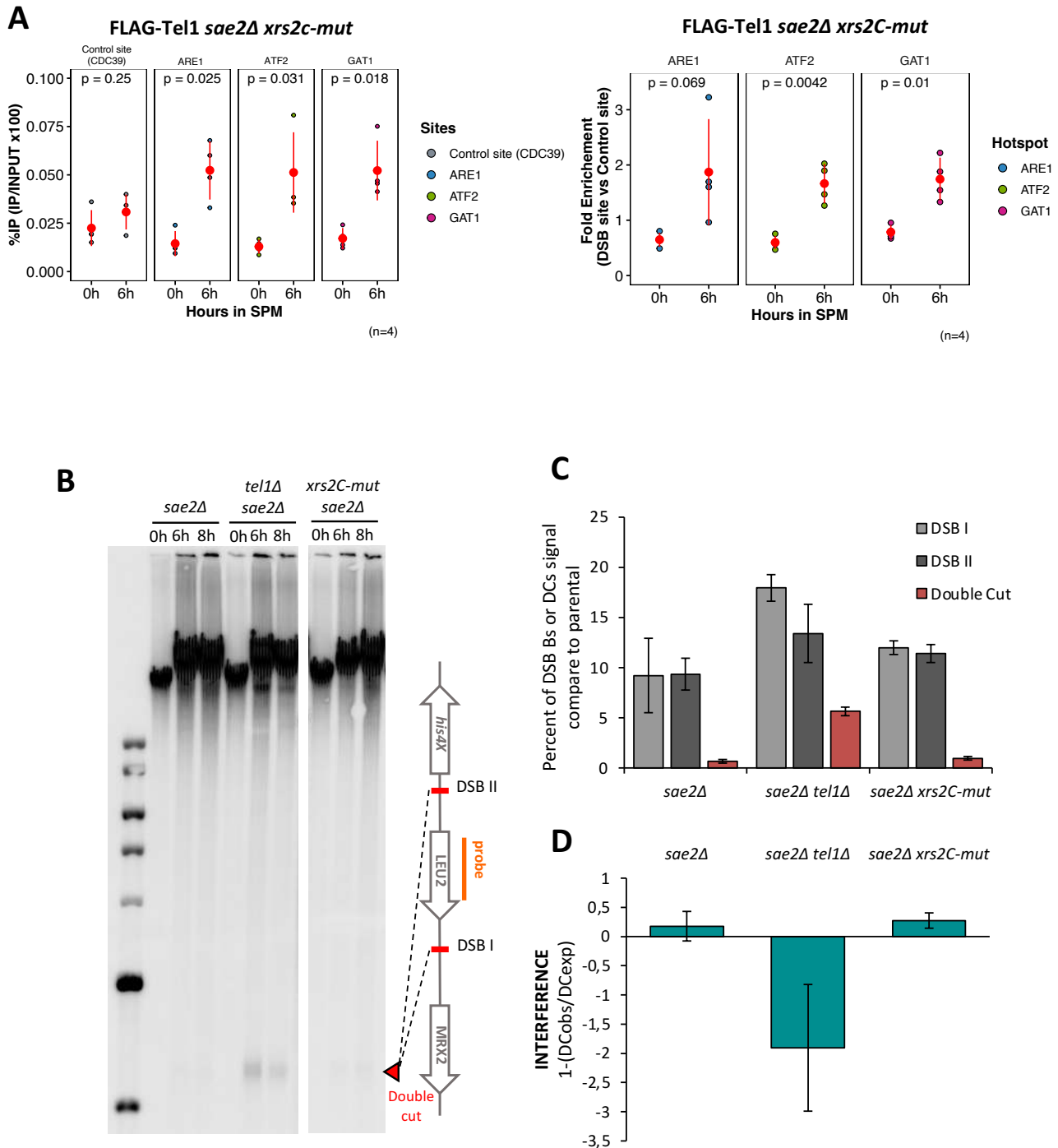


Figure 62 : Recrutement de Tel1 et interférence entre DSBs en contexte *xrs2C-mut*

(A) %IP en FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ xrs2C-mut* au site de contrôle et aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose. (Gauche)

Enrichissement de FLAG-Tel1 en contexte *sae2Δ xrs2C-mut* aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 6h après induction de la méiose. (Droite)

Les %IP et FE sont également en Annexe 1 et Annexe 2.

(B) Détection des DCs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ xrs2C-mut*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *LEU2* par Southern blot.

(C) Quantification des DSBs et DCs au locus *HIS4::LEU2*. Chaque valeur correspond au pourcentage de DSBs ou DCs par rapport au fragment parental (n=3).

(D) Calcul de l'interférence entre DSBs méiotiques au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ*, *sae2Δ xrs2C-mut* (n=3).

J'ai également analysé la formation de DCs par Southern blot au locus *HIS4::LEU2* dans le but de mesurer l'interférence dans le mutant *xrs2C-mut*. Dans ce contexte, très peu de DCs sont détectées après hybridation de la sonde centrale *LEU2* en comparaison au mutant *sae2Δ tel1Δ* (Figure 62B). Après quantification de la fréquence de coupure à chaque site (Annexe 9) et des DCs, une légère augmentation des DSBs dans le mutant *sae2Δ xrs2C-mut* est observée par rapport au contrôle *sae2Δ* (~11% vs 9% ; Figure 62C). Le niveau de DCs n'est pas augmenté dans ce mutant et est similaire à celui obtenu en contexte *sae2Δ* (~1% ; Figure 62C). Ainsi, en calculant l'interférence dans le mutant *sae2Δ xrs2C-mut* j'obtiens des valeurs similaires à celles obtenues en contexte *sae2Δ* (Figure 62D).

Le mutant *xrs2C-mut* semble donc affecter le checkpoint méiotique dépendant de Tel1 ainsi que le recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures, mais le contrôle de la formation des DCs n'est pas altéré suggérant que la mise en place de l'interférence n'est pas dépendante du recrutement de Tel1. Ces résultats sont en apparente contradiction avec ceux obtenus en contexte *xrs2-ΔC*. Néanmoins, il est probable qu'un recrutement transitoire de la protéine dans le contexte *xrs2C-mut*, soit suffisant pour mettre en place l'interférence entre DSBs méiotiques, et cette hypothèse est renforcée par d'autres données (*cf.* Résultats Partie II). Ce point sera discuté plus en détail dans le Chapitre VI – II. Le recrutement de la protéine Tel1kd et en IV – Discussion.

III. Pistes explorées pour expliquer le mécanisme d'interférence

Les approches par CHIP m'ont permis de proposer que la mise en place de l'interférence dépende du recrutement de Tel1 par Xrs2 aux sites de cassures. Cependant, le mécanisme d'interférence lui-même reste méconnu ainsi que les acteurs participant à inhiber la formation de cassures sur plusieurs dizaines de kilobases. En nous appuyant sur la littérature scientifique, nous avons testé l'effet sur l'interférence de différents « candidats », effecteurs ou modulateurs potentiels de l'interférence. J'exposerai donc dans cette partie la littérature nous ayant conduits à tester ces candidats, ainsi que les résultats obtenus pour chacun d'eux.

Afin de faciliter la lecture des résultats, certains Southern blot réalisés ont été placés en Annexe 10 – 10, seuls les plus pertinents à la compréhension et les quantifications ont été placées en figures principales.

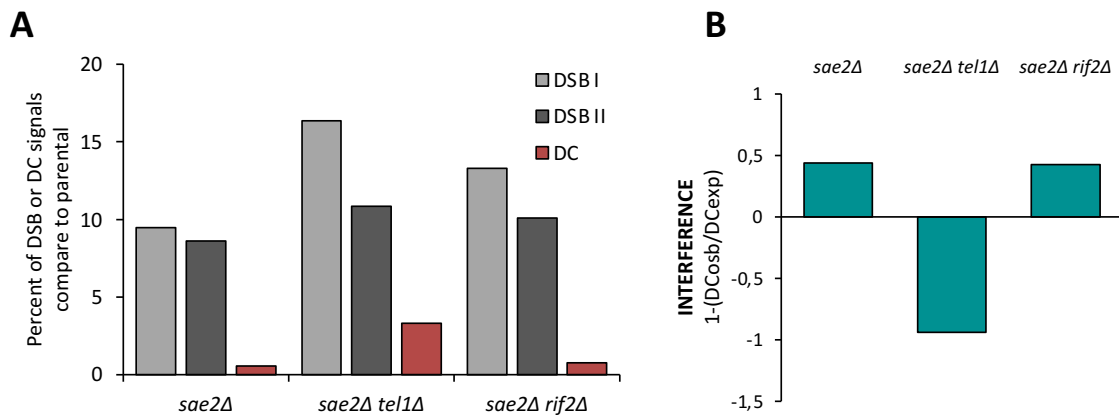


Figure 63 : Mesure de l'interférence entre DSBs au locus *HIS4::LEU2* en absence de Rif2

(A) Quantification des DSBs et DCs au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ rif2Δ*. Chaque valeur correspond au pourcentage de DSBs ou DCs par rapport au fragment parental. Les Southern blots correspondant se trouvent en Annexe 10. (n=1)

(B) Calcul de l'interférence entre DSBs méiotique au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ rif2Δ*. (n=1)

1. Implication des protéines télomériques : Rif1 et Rif2

Les protéines Rif1 et Rif2 sont des protéines télomériques associées à la protéine Rap1 qui reconnaît l'ADN double brin aux télomères (Lustig et al., 1990; Wotton and Shore, 1997). Les télomères sont érodés à chaque cycle répliatif et lorsque leur taille atteint un seuil critique, ils sont reconnus comme des DSBs par le complexe MRX, responsable du recrutement de Tel1 qui stimule l'élongation des télomères (Chang et al., 2007; Viscardi et al., 2007). Lorsque les télomères ne sont pas érodés, des complexes de Rap1 – Rif1 – Rif2 sont présents aux télomères, et leur présence inhibe l'action de la télomérase et l'élongation des télomères (Levy and Blackburn, 2004; Marcand et al., 1997; Wotton and Shore, 1997). Il a notamment été démontré que les protéines Rif1 et Rif2 peuvent se lier au complexe MRX afin de limiter la reconnaissance des télomères et l'activation de la télomérase (Hirano et al., 2009). Plus précisément, Rif2 interagit avec le domaine C-terminal de Xrs2 et est en compétition avec la protéine Tel1 pour s'associer à ce domaine (Hirano et al., 2009). Ainsi, il existe aux télomères une balance entre régulation positive (dépendante de Tel1) et négative (dépendante de Rif1/Rif2) de l'activité de la télomérase (Martina et al., 2012). L'association de Rif2 à MRX et sa compétition avec Tel1 est également observée aux sites de cassures HO en cycle végétatif (Cassani et al., 2016; Hirano et al., 2009). Plusieurs études démontrent, notamment *in vitro*, que Tel1 stabilise le

complexe MRX aux sites de cassures, ou aux télomères, tandis que Rif2 limite l'accès de Tel1 au complexe et stimule l'activité ATPase de Rad50 ce qui favorise l'éviction de MRX de l'ADN (Cassani et al., 2016; Hailemariam et al., 2019b; Hirano et al., 2009; Zhang et al., 2018).

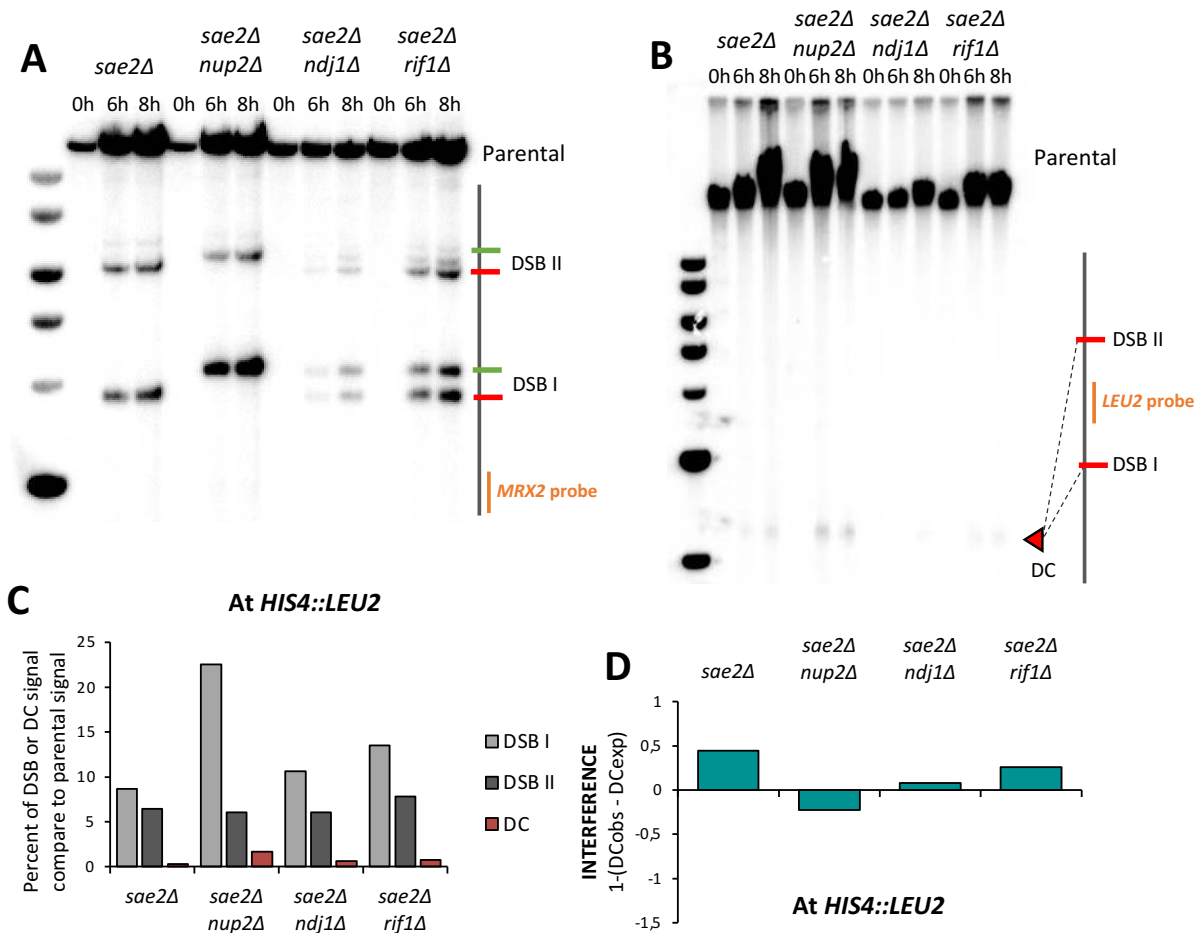


Figure 64 : Mesure de l'interférence entre DSBs au locus *HIS4::LEU2* en absence de Rif1, Nup2 ou Ndj1

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot.

(B) Détection des DCs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *LEU2* par Southern blot.

(C) Quantification des DSBs et DCs au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Chaque valeur correspond au pourcentage de DSBs ou DCs par rapport au fragment parental. (n=1)

(D) Calcul de l'interférence entre DSBs méiotique au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. (n=1)

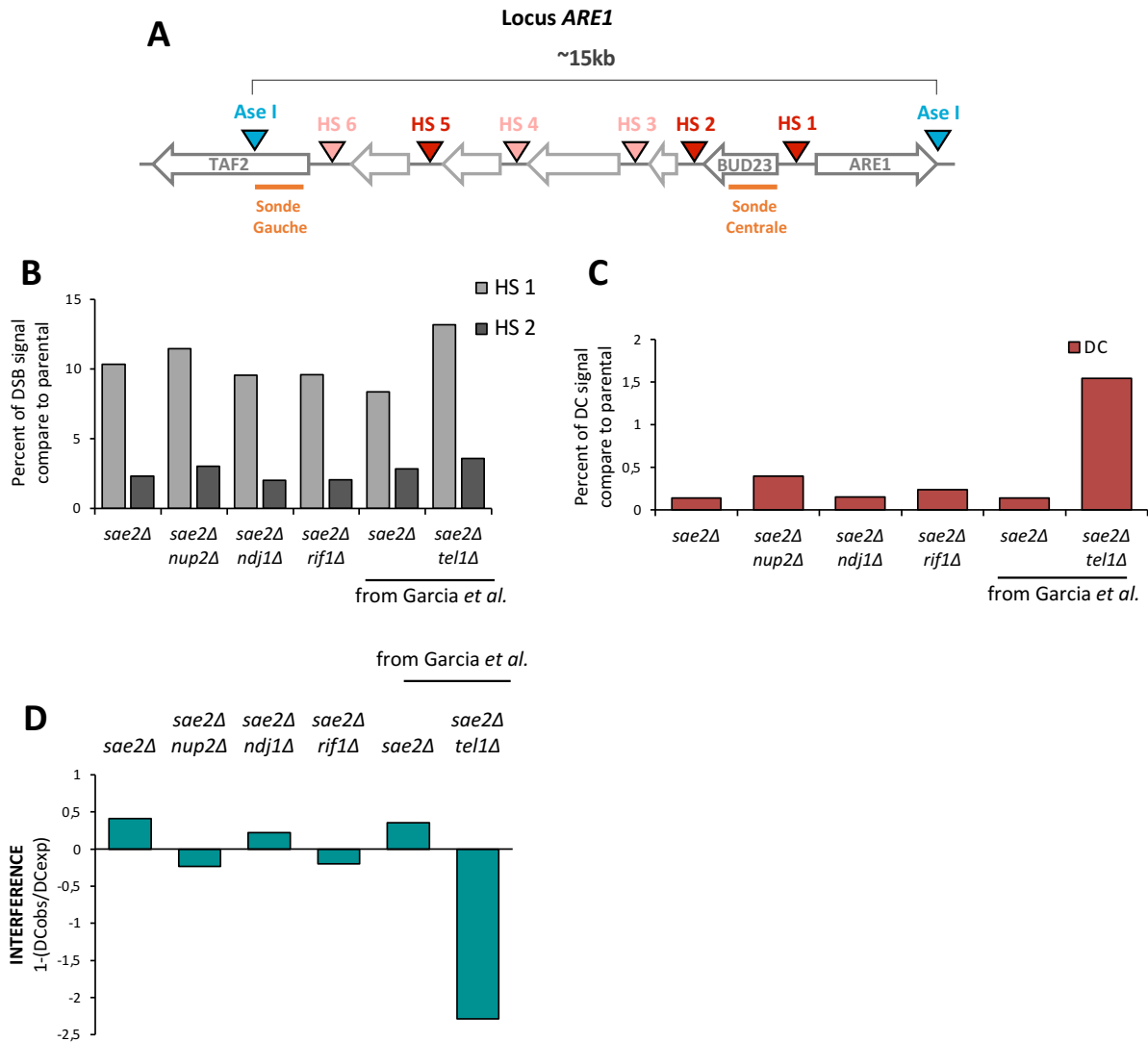


Figure 65 : Mesure de l'interférence entre DSBs au locus *ARE1* en absence de Rif1, Nup2 ou Ndj1

(A) Schématisation du locus *ARE1*. La sonde *TAF2* (sonde gauche) permet de mesurer les niveaux de DSBs aux différents hotspots. La sonde *BUD23* (sonde centrale) permet de mesurer le niveau de DCs entre les hotspots 1 et 2 (HS 1, HS 2).

(B) Quantification des DSBs au locus *ARE1* à l'aide de la sonde *TAF2* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Chaque valeur correspond au pourcentage de DSBs par rapport au fragment parental. (n=1)

(C) Quantification des DCs au locus *ARE1* à l'aide de la sonde *BUD23* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Chaque valeur correspond au pourcentage de DCs par rapport au fragment parental. (n=1)

(D) Calcul de l'interférence entre DSBs méiotique au locus *ARE1* en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. (n=1)

Ces différents éléments nous ont conduits à émettre l'hypothèse de la présence de Rif2 et/ou Rif1 aux DSBs méiotiques, et d'un potentiel effet sur l'interférence entre cassures méiotiques : Rif1 et/ou Rif2 pourraient limiter ou moduler l'effet de Tel1 aux DSBs méiotiques et la mise en place de l'interférence. J'ai donc réalisé une mesure de l'interférence en absence de Rif2 ou Rif1, au locus *HIS4::LEU2* et *ARE1* respectivement, où nous pourrions envisager une augmentation de l'interférence entre DSBs. D'une part, le taux de DCs au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ rif2Δ* est similaire à celui obtenu en *sae2Δ* (~1% de DCs ; Figure 63A, Annexe 10). La fréquence de DSBs aux sites I et II semble augmenter en absence de Rif2, mais il serait nécessaire de reproduire l'expérience pour confirmer cette augmentation (Figure 63A). Enfin, le calcul de l'interférence montre une interférence nulle en absence de Rif2, comme en contexte *sae2Δ* (Figure 63B). J'ai également testé le mutant *rif1Δ* au locus *HIS4::LEU2* (Figure 64) et *ARE1* (Figure 65). Contrairement au mutant *rif2Δ* qui a été construit par délétion du gène au laboratoire, la souche *rif1Δ sae2Δ* a été réalisée par croisement d'une souche *sae2Δ* du laboratoire et d'une souche *rif1Δ* construite par le laboratoire de Sean M. Burgess (Chu et al., 2017). Les multiples bandes correspondantes aux sites de cassures I et II (Figure 64A) sont dues à la présence de deux constructions du locus *HIS4::LEU2* différentes dans la souche diploïde (Annexe 12). Ce paramètre rend la quantification des DSBs et la mesure de l'interférence plus complexe. L'absence de *rif1Δ* ne révèle cependant pas d'augmentation de fréquence de DCs (~0,7% de DCs ; Figure 64B, Figure 64C), ni d'interférence négative à ce locus ($I=0,25$; Figure 53D). Afin de confirmer ces observations, j'ai mesuré l'interférence au locus naturel *ARE1* (Figure 65A). De la même manière qu'au locus *HIS4::LEU2*, la fréquence de DCs n'est pas augmentée en absence de Rif1 (~0,15% de DCs en contexte *sae2Δ*, ~0,24% en contexte *sae2Δ rif1Δ* contre ~1,5% en contexte *sae2Δ tel1Δ* ; Figure 65B) et l'interférence est nulle ($I=-0,2$ en contexte *sae2Δ rif1Δ* ; Figure 65C). Ces résultats m'ont permis de conclure que les protéines Rif1 et Rif2 ne participent pas à promouvoir l'interférence entre DSBs. Néanmoins, l'effet attendu en absence de Rif1 et Rif2 était une augmentation de l'interférence et nous n'avons pas non plus mesuré cette augmentation. Le test réalisé ici n'est peut-être pas adapté pour mesurer une augmentation de l'interférence et afin de constater un potentiel effet de Rif2 sur l'interférence, il aurait été intéressant de surexprimer la protéine en méiose : si celle-ci est en compétition avec Tel1 pour interagir avec Xrs2 et que la mise en place de l'interférence est dépendante du recrutement de Tel1, la surexpression de Rif2 pourrait réduire l'interférence entre DSBs. Il aurait également été intéressant de réaliser un CHIP de la protéine Tel1 en absence de Rif2 afin de mesurer une éventuelle accentuation du recrutement de Tel1 en absence de la protéine.

2. Implication de la périphérie nucléaire : Ndj1, Nup2

Esc1

En prophase I, les télomères sont reliés aux composants du cytosquelette *via* un pont protéique composé de protéines localisées sur la surface interne et externe de l'enveloppe nucléaire (Marcomini and Gasser, 2015). Ce pont permet d'assurer le mouvement des chromosomes lors de l'étape de formation du bouquet et lors de l'appariement des chromosomes homologues (Conrad et al., 2008; Kosaka et al., 2008; Koszul et al., 2008; Wanat et al., 2008). La protéine Ndj1 est une protéine exprimée en méiose qui s'accumule aux télomères chez *S. cerevisiae*, et est requise pour la formation du « bouquet » télomérique *via* son interaction avec la protéine Mps3 (Conrad et al., 2008; Trelles-Sticken et al., 2000). L'absence de Ndj1 entraîne des défauts d'appariement des chromosomes et des défauts de recombinaison méiotique (Trelles-Sticken et al., 2000). En 2017, Chu *et al.* ont montré une augmentation du niveau de DSBs au locus *HIS4::LEU2* en absence de la protéine Ndj1 (Chu et al., 2017). Dans la même étude, Chu *et al.* identifient la protéine Nup2 lors d'une copurification de la protéine Ndj1 (Chu et al., 2017). Nup2 est une protéine mobile associée au pore nucléaire, nommée nucléopore (Hood et al., 2000; Solsbacher et al., 2000). Celle-ci est retrouvée associée aux régions promotrices de gènes et participe au transport des gènes transcrits au pore nucléaire (Casolari et al., 2004). Dans leur étude, Chu *et al.* ont montré une forte augmentation du niveau de cassures au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ nup2Δ* (Chu et al., 2017). L'augmentation du niveau de cassures pouvant être associée à une perte d'interférence, Nup2 et Ndj1 nous sont apparus être des candidats intéressants.

Pour étudier leurs effets potentiels, j'ai croisé les souches *nup2Δ* et *ndj1Δ* générées par le laboratoire de Sean M. Burgess à une souche *sae2Δ* du laboratoire, puis mesuré l'interférence au locus *HIS4::LEU2*. Par Southern blot, plusieurs bandes sont observées à chaque site de cassures dans le mutant *sae2Δ ndj1Δ* (Figure 64A). Comme expliqué dans le cas du mutant *sae2Δ rif1Δ*, ce phénomène est dû à la présence de deux constructions *HIS4::LEU2* différentes dans les souches haploïdes parentales. Il a néanmoins été possible de mesurer la fréquence de DSBs à chaque site et l'inférence au locus *HIS4::LEU2*. En contexte *nup2Δ sae2Δ*, je mesure une augmentation de la fréquence de DSBs au site I similaire à celle observée par Chu *et al.* (~20% de DSBs au site I ; Figure 64C). De plus, plus de DCs sont formées dans ce mutant par rapport au contrôle *sae2Δ* (~1,6% de DCs en contexte *sae2Δ nup2Δ* contre ~0,3% en contexte *sae2Δ* ; Figure 64B, Figure 64C), mais cette augmentation résulte certainement de l'augmentation de la fréquence de cassure puisque l'interférence

n'est pas fortement affectée ($I = -0,22$; Figure 64D). En absence de Ndj1, le nombre de DCs ne semble pas augmenté ($\sim 0,5\%$ de DCs ; Figure 64B, Figure 64C), et l'interférence est nulle ($I = 0,07$; Figure 64D). Ce locus ne permettant pas de mesurer correctement l'interférence dans ce cas-là, j'ai également mesuré l'interférence au locus *ARE1*, comme pour *sae2Δ rif1Δ*. Le niveau de DCs n'est pas augmenté dans les mutants *sae2Δ nup2Δ* et *sae2Δ ndj1Δ* à ce locus (0,4% et 0,15% de DCs respectivement ; Figure 65B). Après calcul, les mutants ne présentent pas d'interférence négative au locus *ARE1* puisqu'ils affichent $I = -0,23$ et $0,22$ respectivement (Figure 65C).

L'augmentation du niveau de cassures dans le mutant *nup2Δ*, observée par Chu *et al.* et au laboratoire au locus *HIS4::LEU2*, suggère un rôle de la protéine dans la formation des DSBs, bien que ce rôle soit probablement indirect. En se liant à des régions promotrices de gènes transcrits, Nup2 pourrait limiter l'accès à la chromatine pour Spo11, ce qui expliquerait l'augmentation du niveau de DSBs en son absence. Il apparaît cependant clairement que Nup2 et Ndj1 ne sont pas impliquées dans le mécanisme d'interférence entre DSBs.

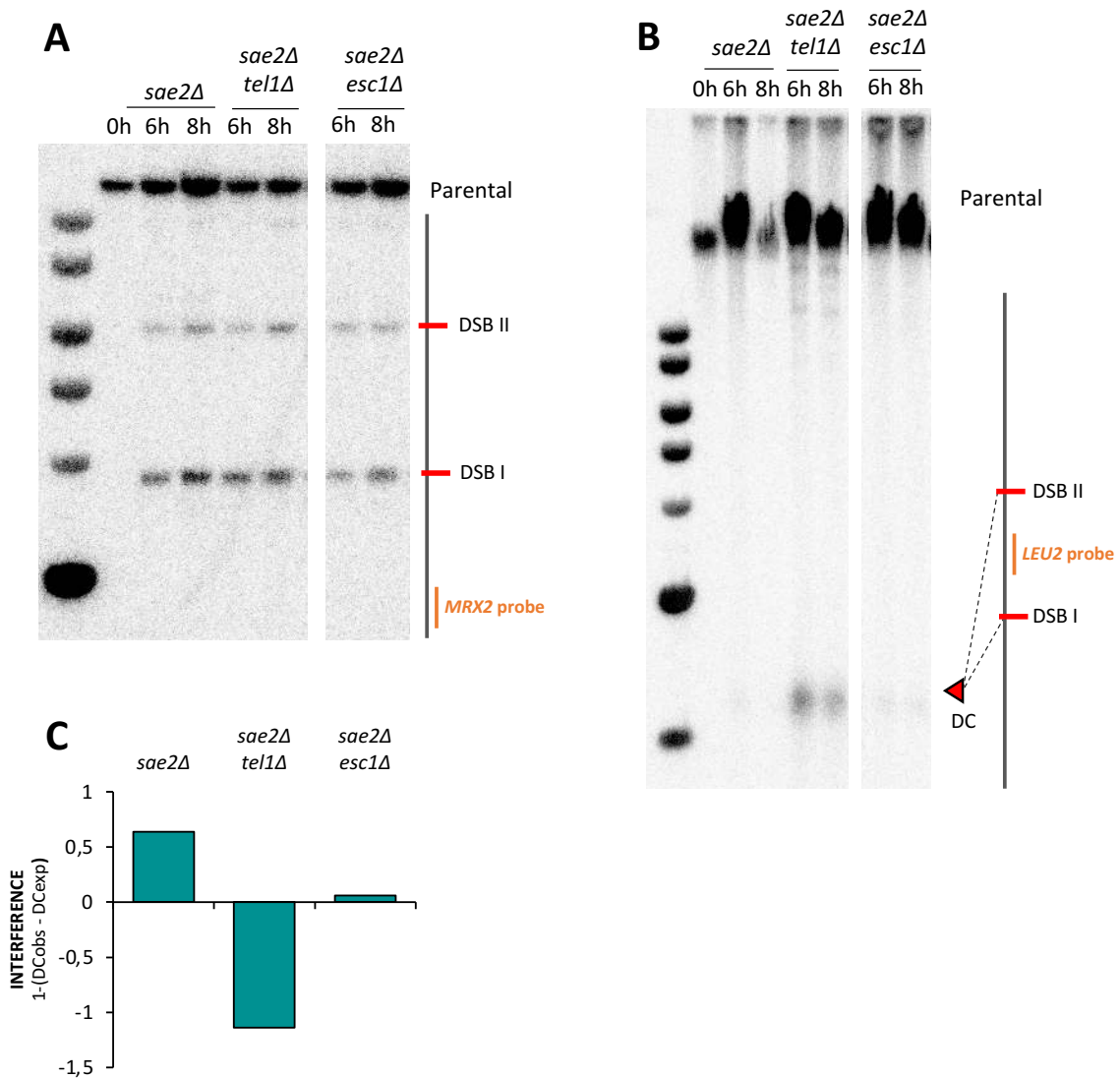


Figure 66 : Mesure de l'interférence entre DSBs au locus *HIS4::LEU2* en absence de Esc1

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans la souche *sae2Δ esc1Δ*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot.

(B) Détection des DCs formées au locus *HIS4::LEU2* dans la souche *sae2Δ esc1Δ*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *LEU2* par Southern blot.

(C) Calcul de l'interférence entre DSBs méiotique au locus *HIS4::LEU2* en contexte *sae2Δ esc1Δ*. (n=1)

De manière analogue à la relocalisation de gènes transcrits au pore nucléaire par Nup2, il a été montré que les télomères et les DSBs non résectées sont relocalisés à la membrane nucléaire et à proximité des pores nucléaires (Marcomini and Gasser, 2015). Ce processus repose sur de nombreuses protéines membranaires telles que Mps3 et Esc1 (Marcomini and Gasser, 2015). D'autre part, il a été montré que la relocalisation de certaines régions du génome à la périphérie nucléaire participait à l'extinction des gènes (« chromatin silencing ») et ce phénomène est dépendant des protéines Sir4, Esc1 et Ku80 (Taddei et al., 2004). Ces éléments nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'une relocalisation des DSBs méiotiques à la membrane nucléaire, et potentiellement d'une mise en place de l'interférence *via* cette relocalisation. En méiose, une étude récente, prépubliée sur biorxiv, suggère l'implication de Esc1 dans le processus de recombinaison méiotique : en contexte *esc1Δ*, l'interférence entre CO est réduite et le ratio NCO/CO est altéré (Smith et al., 2019). La perte d'interférence entre CO pouvant refléter une perte d'interférence entre DSBs, nous avons également testé l'impact de Esc1 sur l'interférence entre DSBs.

Après avoir réalisé le mutant *esc1Δ sae2Δ*, j'ai observé la formation de DSBs et de DCs dans ce mutant par Southern blot et mesuré l'interférence au locus *HIS4 ::LEU2* (Figure 66). Les DSBs ne sont pas augmentées et peu de DCs sont détectées dans le mutant *esc1Δ sae2Δ* (Figure 66B). Après calcul, il apparaît que l'interférence n'est pas négative dans ce mutant et est similaire à celle retrouvée dans le contrôle *sae2Δ* (Figure 66C). Ce résultat n'est cependant pas suffisant pour écarter l'hypothèse d'une relocalisation des DSBs méiotiques à la périphérie nucléaire. D'autres candidats participant à la relocalisation des DSBs en cycle mitotique pourraient également être testés tels que Mps3. Cependant cette dernière est une protéine essentielle et ne peut être supprimée. Il serait nécessaire d'utiliser le mutant *mps3Δ75-150* si celui-ci est capable de sporuler (Friederichs et al., 2012).

IV. Discussion – Chapitre IV

Cette partie discussion a pour but d'analyser et discuter les résultats présentés ainsi que de présenter les limites de certaines expérimentations menées.

1. Variabilité intrinsèque des expériences

Les ChIPs réalisés au cours de ma thèse présentent une grande variabilité, attestée par des écarts-types importants (Figure 41, Figure 42, Annexe 1). Cette variabilité est due à différents facteurs intrinsèques à la méiose et aux expériences de cinétiques méiotiques. Premièrement, la synchronisation des cellules lors de l'entrée

en méiose impacte la variabilité des expérimentations. Bien que le protocole expérimental soit optimisé pour assurer la meilleure synchronisation possible, celle-ci n'est pas parfaite, et des retards d'entrée en méiose au sein de la population induisent une variabilité bien connue dans le domaine. À cela s'ajoutent des différences de synchronie entre des cinétiques méiotiques réalisées de façon totalement indépendantes. De plus, de petites différences de conditions expérimentales peuvent altérer l'entrée en méiose, telles que la température de la pièce de culture (ouverte à tous), l'oxygénation des cellules qui dépend de la rotation des flasques de culture, ou encore l'eau et les composants permettant de préparer les milieux de pré-sporulation et de sporulation. Nous avons notamment rencontré des problèmes d'entrée en méiose qui se sont résolus en préparant les milieux de pré-sporulation et de sporulation avec de l'eau de la marque Volvic en remplacement de l'eau mili-Q disponible au laboratoire. Enfin, l'étape d'immunoprécipitation de la protéine d'intérêt peut également avoir un impact sur la variabilité des résultats. L'efficacité d'immunoprécipitation peut varier d'une expérimentation à une autre, bien que celle-ci soit optimisée. Ensemble, ces différents facteurs affectent les résultats obtenus sur les différentes répétitions faites des expériences et apportent une variabilité conséquente aux expériences de ChIP en méiose.

2. Limites des expériences de ChIP-seq

Chez *S. cerevisiae*, il existe ~3600 hotspots de DSBs répartis sur génome. Or, les analyses de ChIP-seq n'ont mis en évidence que 1505 sites d'enrichissement de Tel1 qui correspondent aux hotspots de cassure. De plus, 494 de ces sites correspondent également à des sites de l'axe. Ce constat est principalement dû à des limitations techniques de l'algorithme utilisé. En effet, les sites d'enrichissement sont détectés automatiquement en utilisant l'algorithme MACS2. Ces sites d'enrichissement de Tel1 sont par la suite corrélés aux sites de cassures ou aux sites de l'axe par comparaison avec la cartographie des DSBs (Pan et al., 2011) ou avec les ChIP-seq de Rec8 – Hop1 – Red1 (Sun et al., 2015). Cependant, à certains locus, MACS2 ne peut pas différencier plusieurs pics de Tel1 : c'est notamment le cas aux hotspots forts comme *ARE1* (Annexe 13). Plusieurs hotspots sont présents autour du hotspot *ARE1*, et plusieurs pics de Tel1 sont visibles dans cette région. Néanmoins, le fort enrichissement de la protéine Tel1 au locus *ARE1* limite la détection des pics adjacents par l'algorithme. Ainsi, il y a une sous-estimation du nombre de hotspots auxquels Tel1 est recrutée dans nos données. En effectuant l'analyse inverse qui consiste à déterminer le nombre de hotspots auquel un enrichissement de Tel1 est associé, nous avons mis en évidence que 2068 sites de

cassures présentait un enrichissement en Tel1 sur 3601 hotspots (Figure 48). L'absence d'enrichissement de Tel1 sur les 1533 hotspots restants peut être due à une absence de recrutement ou à une absence de détection par MACS2 de la protéine à ces sites. En effet, ces 1533 hotspots sont des hotspots faibles (Figure 48), et les enrichissements faibles en Tel1 peuvent ne pas être détectés par l'algorithme en fonction de la stringence de l'analyse. De manière similaire, à des locus où des signaux correspondant aux sites de cassures et aux sites de l'axe sont juxtaposés, l'algorithme peut échouer à discriminer deux pics différents (Annexe 13), générant artificiellement des sites d'enrichissements de Tel1 à la fois à l'axe et aux hotspots de cassures (Figure 48). Nous avons cherché à optimiser ce paramètre en augmentant la stringence de l'analyse, cependant l'augmentation de la stringence conduit à la perte des pics Tel1 les plus faibles qui co-localisent avec des hotspots ou des sites de l'axe, et nous avons dû trouver une balance entre ces différents paramètres. Le développement d'autres algorithmes de détection mieux adaptés à ce type d'analyse permettrait potentiellement d'améliorer la discrimination des sites d'enrichissement de Tel1 et d'avoir une estimation plus précise du nombre de hotspots auxquels Tel1 est recrutée.

L'analyse du CHIP-seq a également révélé un faible enrichissement de la protéine Spo11 aux sites de cassures, par rapport à l'enrichissement massif de Tel1 (Figure 47). Ce faible enrichissement peut s'expliquer par une incompatibilité de la méthode de séquençage du CHIP-seq et l'action de la protéine Spo11. En effet, la préparation des librairies pour le séquençage repose sur l'ajout d'adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADN d'intérêt. Or, lors de la génération de DSBs, Spo11 reste attachée de manière covalente à l'ADN et sa présence empêche la fixation des adaptateurs nécessaires au séquençage. L'enrichissement en Spo11 mesuré dans nos expériences correspond donc certainement, au moins en partie, à une fraction de Spo11 présente à proximité des hotspots de cassures, mais n'ayant pas généré de DSBs à ces sites. Il est important de noter que cette limite technique impacte également la détection de Tel1 à proximité des sites de coupures. Il serait cependant possible de contourner cette limite par un traitement des éluats de CHIP avec Tdp2 (pour Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2) qui coupe la liaison covalente reliant Spo11 à l'ADN (Gittens et al., 2019).

Lors de l'analyse du CHIP-seq de Tel1, nous avons également remarqué la présence de pics d'enrichissements en forme de « volcan » aux sites de cassures. Cette forme de pics est également présente lors de l'empilement des données aux sites de cassures (Figure 47), mais ne se retrouve pas aux sites de l'axe. Ceci est principalement dû à la présence des DSBs. De plus, comme pour le CHIP de Spo11, la présence de Spo11 liée de façon covalente aux extrémités 5' des DSBs va empêcher le séquençage d'au

moins une partie des fragments d'ADN d'intérêt dans le cadre du ChIP-seq de Tel1. Enfin, Johnson *et al.* ont démontré que de multiples cassures peuvent être formées au sein des hotspots (Johnson et al., 2021). Ces fragments étant de petite taille peuvent être perdus lors de la purification de l'ADN, et sont également liés par Spo11 de manière covalente ce qui empêche probablement leur séquençage.

Ainsi, le ChIP-seq présente des limites dans sa réalisation et dans son analyse. Nous avons notamment cherché à comparer les signaux d'enrichissement en Tel1 et Spo11 aux signaux de Spo11-oligos, or ceux-ci n'ont pas été obtenus par les mêmes techniques. Le ChIP-seq comporte notamment des étapes d'amplification, là où le CC-seq des Spo11-oligos est une mesure directe du signal de coupure. De plus, comme énoncé précédemment, la formation de DSBs et la liaison covalente de Spo11 aux extrémités 5' d'ADN impacte la détection des protéines aux sites de cassures.

3. Recrutement de Tel1 aux hotspots et à l'axe en réponse à la formation de DSBs

Mes résultats ont permis de démontrer que la protéine Tel1 est recrutée aux sites de cassures *via* le domaine C-terminal de Xrs2. En effet, nous avons émis l'hypothèse d'un recrutement de Tel1 aux sites de cassures en réponse à leur formation, mais sachant que le complexe MRX est requis pour la génération de DSBs, la possibilité d'un recrutement de Tel1 en amont de leur formation ne pouvait être immédiatement écartée. Cependant, l'absence d'enrichissement de Tel1 aux sites de cassures en contexte *spo11-Y135F* a permis de démontrer que Tel1 n'est pas recruté en amont, mais bien en aval de la formation des DSBs, de la même manière que dans le cadre de la réponse aux dommages à l'ADN dans lequel elle est impliquée en cycle végétatif.

L'étude du recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures par ChIP-seq a permis de mettre en évidence que ce recrutement est proportionnel à la force des hotspots (Figure 49). Pan *et al.* ont démontré une anti-corrélation entre le nombre de Spo11-oligos par chromosomes et la taille des chromosomes, *i.e* les petits chromosomes forment plus de DSBs que les grands chromosomes (Pan et al., 2011). Puisque l'enrichissement de Tel1 est proportionnel à la force des hotspots, nous nous attendions à ce que son recrutement soit également anti-corrélé à la force des hotspots. Cependant nos résultats montrent que si l'enrichissement de Tel1 suit cette tendance, l'anti-corrélation n'est pas significative, principalement en raison des chromosomes IX, VIII et V qui affichent un faible taux d'enrichissement en Tel1 malgré leur petite taille (Figure 51A). Le faible enrichissement obtenu sur ces chromosomes

peut être dû en partie à la présence de nombreux pics Tel1 de faible intensité sur ces chromosomes qui ne sont pas pris en compte par l'algorithme MACS2. Cependant, ces paramètres ne permettent pas d'expliquer totalement les résultats obtenus et les raisons de cette différence restent à être déterminées. De même, le chromosome XII présente un faible enrichissement en Tel1, et si la présence du rDNA peut affecter en partie l'analyse, ce paramètre ne suffit pas à expliquer les résultats obtenus (Figure 51A).

L'expérience de ChIP-seq a également permis de mettre en évidence l'enrichissement de la protéine Tel1 à l'axe. L'enrichissement de Tel1 étant dépendant de la formation des DSBs, ce résultat appuie le modèle TLAC dans lequel la formation des DSBs repose sur une liaison axe-boucle médiée par Spp1 et Mer2 (Acquaviva et al., 2013; Adam et al., 2018; Blat et al., 2002; Sommermeyer et al., 2013). De plus, bien que la présence de Tel1 à l'axe ne soit pas due à un recrutement direct de la protéine, la protéine pourrait y jouer un rôle. En effet, Tel1 et Mec1 sont connues pour phosphoryler la protéine Hop1, un composant de l'axe (Carballo et al., 2008; Joshi et al., 2015; Niu et al., 2005). En contexte *sae2Δ*, les protéines Tel1, Xrs2 et Pch2 sont requises pour la phosphorylation de la protéine Hop1, et ce indépendamment de Mec1 (Ho and Burgess, 2011) tandis qu'en contexte *dmc1Δ*, la phosphorylation de Hop1 repose sur la protéine Mec1 puisque les mutants *tel1Δ*, *pch2Δ* et *xrs2ΔN* (qui abolit le recrutement de Pch2) n'altèrent pas la phosphorylation de la protéine (Ho and Burgess, 2011). Hop1 subit donc deux vagues de phosphorylation : une première dépendante de Tel1, et une seconde dépendante de Mec1 (Carballo et al., 2008; Ho and Burgess, 2011). La présence de Tel1 à l'axe *via* son recrutement aux DSBs pourrait donc participer à sa mise en contact avec Hop1 et à assurer la première vague de phosphorylation de la protéine. Afin d'étudier cette hypothèse il serait intéressant d'étudier la phosphorylation de la protéine Hop1 dans un contexte *sae2Δ xrs2-ΔC* puisque cette mutation abolit le recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures et à l'axe (Figure 57). Pour aller plus loin, il serait également intéressant de regarder l'impact du recrutement de Tel1 sur le désassemblage de la protéine Hop1 de l'axe : en effet, Pch2 est responsable de l'éviction de la protéine (Börner et al., 2004; Chen et al., 2014), et Pch2 est requis avec Tel1 pour la phosphorylation de la protéine (Ho and Burgess, 2011). Cependant, aucun lien n'a pour l'instant été fait entre la phosphorylation de Hop1 par Tel1 – Mec1 et le désassemblage de la protéine Hop1 de l'axe. De plus, le désassemblage de Hop1 participant à la régulation de la formation des DSBs (*cf.* Chapitre II – Partie I), sa phosphorylation par Tel1 pourrait également participer au contrôle de la formation des DSBs *via* la mise en place de l'interférence.

3. Réduction du recrutement de Tel1 en *xrs2C-mut* et maintien de l'interférence

Les résultats obtenus en contexte *xrs2C-mut* sont surprenants au regard de ceux obtenus en contexte *xrs2-ΔC*. En absence complète du domaine C-terminal de Xrs2, le recrutement de Tel1, le checkpoint méiotique dépendant de Tel1 et l'interférence sont abolis, suggérant que le recrutement de Tel1 aux sites de cassures est requis pour mettre en place l'interférence entre DSBs. Dans le mutant *xrs2C-mut*, le recrutement apparaît fortement réduit, le checkpoint méiotique dépendant de Tel1 est aboli, mais l'interférence est maintenue. Ce résultat tend à réfuter l'idée que le recrutement de Tel1 est requis pour la mise en place de l'interférence. Cependant, le %IP de FLAG-Tel1 aux sites de cassures, bien que faible, est significativement différent de celui au site contrôle dans le mutant *xrs2C-mut* ce qui n'est pas le cas dans le mutant *xrs2-ΔC*. Ce constat m'a amené à considérer l'enrichissement de Tel1 aux hotspots comme significatif en contexte *xrs2C-mut* et non significatif en contexte *xrs2-ΔC*. Nous proposons ainsi qu'en contexte *xrs2C-mut* le recrutement de Tel1 est fortement réduit, mais non aboli : le recrutement transitoire de la protéine permettrait ainsi la mise en place de l'interférence, mais pas celle du checkpoint méiotique. Cette hypothèse est appuyée par une autre expérience réalisée dans le cadre de mon second projet : l'étude de l'activité kinase de Tel1 sur le contrôle de la formation de DCs. Je reviendrai dans la seconde partie sur ce résultat, mais brièvement : le mutant *tel1kd*, dont l'activité kinase est abolie, entraîne la formation de multiple DCs au sein des hotspots, visible par l'apparition d'une trainée d'ADN (« smear ») sur Southern blot (cf. Résultats – Partie II). Ce phénotype particulier est aboli dans un double mutant *tel1kd xrs2-ΔC*, mais pas dans le double mutant *tel1kd xrs2C-mut*, appuyant l'hypothèse d'un recrutement toujours actif de la protéine Tel1 aux sites de cassures dans le mutant *xrs2-K846/F847*. Toutefois, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que la mise en place de l'interférence soit indépendante du recrutement de Tel1, auquel cas le domaine C-terminal de Xrs2 jouerait un rôle dans la mise en place de l'interférence *per se*. Néanmoins, la suppression des 9 derniers acides aminés de la protéine Tel1, nécessaire à son interaction avec Xrs2, abolit également le recrutement de la protéine aux DSBs et la mise en place de l'interférence. Ensemble, ces résultats soutiennent l'hypothèse d'un recrutement de la protéine Tel1 requis pour la mise en place de l'interférence, et suggèrent qu'un recrutement transitoire de la protéine soit suffisant à l'établissement de l'interférence entre DSBs, mais pas à la mise en place du checkpoint TM.

4. Mécanisme d'interférence entre DSBs

Mes résultats ont permis de démontrer que la mise en place de l'interférence par Tel1 est dépendante du domaine C-terminal de Xrs2. Ce domaine étant responsable du recrutement de Tel1 aux sites de cassures, ce constat mène à proposer que le recrutement de Tel1 est requis pour la mise en place de l'interférence entre DSBs, et ce même dans le mutant *xrs2C-mut* où le recrutement de Tel1 est fortement réduit. Bien que ce résultat représente une avancée dans la compréhension du mécanisme, celui-ci reste encore inconnu à l'heure actuelle. De nombreux candidats ont été testés, avant mon arrivée au laboratoire et au cours de ma thèse, mais aucun n'a montré de perte d'interférence.

Il existe dans la cellule différentes voies de contrôle pour limiter la formation de DSBs : l'éviction de la protéine Hop1 de l'axe *via* Pch2 (Börner et al., 2004; Chen et al., 2014), l'activation de Mek1 et Ndt80 *via* la phosphorylation de Hop1 par Tel1 et Mec1 (Chen et al., 2018), ou encore la phosphorylation de Rec114 par Tel1 (Carballo et al., 2013). Nos résultats démontrent que le recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures conduit d'une part à la mise en place de l'interférence entre DSBs et d'autre part à la détection de Tel1 sur l'axe. De manière intéressante, le mutant *hop1^{SCD}* montre une augmentation du niveau de DSBs sur le chromosome III dans un contexte *rad50S* (Carballo et al., 2008), ce qui pourrait être compatible avec une perte d'interférence. De plus, la forme non phosphorylable de Rec114 (*rec114-8A*), protéine participant à la formation des DSBs et présente à l'axe, montre également une augmentation du niveau de DSBs sur le chromosome III comparable à celle observée en contexte *tel1Δ* (Carballo et al., 2013). Cependant, les mutants individuels *hop1^{SCD}* et *rec114-8A* ont été testés par Garcia *et al.* et les auteurs n'ont pas mesuré d'augmentation du niveau de DCs (Garcia et al., 2015), suggérant que l'interférence médiée par Tel1 n'est pas mise en place *via* la phosphorylation de ces protéines. Néanmoins, l'inactivation d'une voie de contrôle de la formation des DSBs n'est potentiellement pas suffisante, et peut être contrebalancée par les autres mécanismes de contrôles encore actifs. L'interférence médiée par Tel1 pourrait en effet résulter de l'activation de ces différentes voies en parallèle. Ainsi, il serait intéressant de tester des combinaisons de ces mutants tels que le double mutant *rec114-8A hop1^{SCD}*. Ce double mutant ne montre pas d'augmentation du niveau de Spo11-oligos (Mohibullah and Keeney, 2017), mais le niveau de DCs n'a pas été mesuré. L'abolition de ces deux voies de contrôle pourrait avoir un effet sur l'interférence entre DSBs. Dans ce contexte, l'interférence ne résulterait pas d'un mécanisme supplémentaire de contrôle

de formation des DSBs, mais de l'activation par Tel1 des différentes voies de rétrocontrôle négatif qui s'exercent sur la formation des DSBs.

Le rôle de l'axe dans la mise en place de l'interférence est une hypothèse qui s'intègre également dans le modèle proposé par Cooper *et al.* : les auteurs proposent un regroupement de plusieurs boucles de chromatine *via* la condensation de leur base autour de condensats de complexes RMM (Cooper *et al.*, 2016). Ces « clusters » de boucles permettraient la mise en place de l'interférence sur plusieurs boucles adjacentes et Tel1 limiterait la formation de DSBs sur plusieurs centaines de kilobases à la fois. La présence de Tel1 à l'axe et l'hypothèse d'une mise en place de l'interférence *via* une action de Tel1 à l'axe sont compatibles avec ce modèle. De plus, chez *S. pombe*, il a été démontré que l'interférence s'établit sur 200kb, ce qui correspond aux regroupements de hotspots observés chez cette espèce (Fowler *et al.*, 2018). Il a été ainsi proposé que l'interférence dépendante de Tel1 soit mise en place par clusters de hotspots, un modèle qui fait écho à celui proposé par Cooper *et al.* Chez *S. cerevisiae*, aucune observation ou mesure n'a montré la présence de clusters de hotspots ou de l'axe jusqu'à aujourd'hui, bien que la présence de « région chaude » de formation de DSBs soit compatible avec ce modèle. De plus, Garcia *et al.* ont montré qu'une boucle correspond à un cluster de hotspots et qu'en absence d'interférence ceux-ci sont simultanément coupés (Garcia *et al.*, 2015). Enfin, la littérature récente sur les condensats de RMM et le modèle de plateforme de chargement de Spo11 (Claeys Bouuaert *et al.*, 2021b; Johnson *et al.*, 2021) est également compatible avec ce concept.

5. Mre11 est recrutée aux sites de cassures, mais pas aux sites de l'axe

En étudiant le recrutement de la protéine Mre11 aux sites de cassures et à l'axe, j'ai obtenu des résultats intéressants et inattendus pour certains.

J'ai reproduit en partie les résultats obtenus par Borde *et al.* : Mre11 est enrichie aux sites de cassures en contexte *sae2Δ*, mais l'enrichissement est fortement réduit en contexte *spo11-Y135F* contrairement à ce qui était connu dans la littérature (Borde *et al.*, 2004). Il est cependant important de nuancer cette comparaison, puisque Borde *et al.* observent un fort enrichissement de Mre11 en fond *spo11-Y135F* à 3-4h post-induction méiotique, tandis que je me place ici à 6h post-induction méiotique. Les fonds génétiques utilisés sont également différents puisque Borde *et al.* ont travaillé en contexte sauvage tandis que j'ai travaillé en fond *sae2Δ*. Ces paramètres peuvent expliquer cette différence de résultats. De plus, mes résultats montrent une réduction,

et non une abolition complète du recrutement de Mre11 aux sites de cassures en fond *spo11-Y135F*. Des répétitions de l'expérience permettront de déterminer si cet enrichissement est significatif. Néanmoins, il est intéressant de s'interroger sur le recrutement important de Mre11 en contexte *sae2Δ* et sa faible présence en contexte *spo11-Y135F* aux sites de cassures alors que celle-ci est essentielle à la formation des DSBs. Ces résultats peuvent être interprétés comme révélant l'existence de deux vagues de recrutement de Mre11 : un premier recrutement en amont de la formation des DSBs où Mre11 participe à leur formation, et un second recrutement, plus important, en réponse à la formation des DSBs où Mre11 est essentielle à leur réparation. À 6h, ce deuxième mode de recrutement, dépendant de la formation des DSBs, serait alors majoritaire et potentiellement accru par le défaut de résection.

D'autre part, mes résultats montrent que Mre11 n'est pas présente à l'axe. Ce résultat est particulièrement surprenant puisque la protéine, au sein du complexe MRX, est essentielle à la génération de DSBs (*cf.* Chapitre I – Partie III). De plus, la protéine est présente aux sites de cassures qui sont à proximité de l'axe, et nous nous serions attendus à retrouver Mre11 associée à l'axe, comme dans le cas de la protéine Tel1. L'absence de détection de la protéine à l'axe peut être due à une limitation technique. En effet, Mre11 se lie directement à l'ADN *via* son domaine de liaison à l'ADN, contrairement à Tel1 qui s'associe aux coupures *via* Xrs2. De plus, Tel1 est une protéine de très haut poids moléculaire. Ces caractéristiques permettent potentiellement de détecter Tel1 à l'axe en raison d'une proximité physique plus importante avec celui-ci que Mre11. De plus, l'étape de fixation réalisée dans le cadre du CHIP de Tel1 est plus longue que dans le cas du CHIP de Mre11 (30min contre 15min). Pour pallier ce problème, j'ai réalisé un CHIP de Mre11 sur des échantillons fixés pendant 30min, mais cette modification du protocole a entraîné une augmentation du signal non spécifique ne permettant pas de distinguer un enrichissement spécifique. Une optimisation du protocole de CHIP permettrait potentiellement de détecter la protéine à l'axe. Excepté le complexe MRX, toutes les protéines essentielles à la formation des DSBs ont été détectées à l'axe, indépendamment de la formation des DSBs (Panizza et al., 2011). L'absence de Mre11 à l'axe, alors que le complexe MRX est essentiel à la formation des DSBs, suggère que la machinerie de formation de cassure n'est pas un super complexe protéique unique, mais qu'il est au contraire composé de plusieurs unités indépendantes. Ce résultat mériterait d'être plus exploré par la suite, par une analyse plus globale du recrutement des membres du complexe MRX sur le génome. Le recrutement de Mre11 en méiose a été étudié à l'échelle du génome par Kugou *et al.* cependant les auteurs n'ont pas réalisé d'analyse de corrélation entre les sites d'enrichissement de Rec8 et de Mre11

(Kugou et al., 2009). Il serait donc intéressant d'analyser à nouveau ces données pour regarder si Mre11 et Rec8 montrent une colocalisation, ou si au contraire Mre11 est absente des sites d'enrichissement de Rec8.

Chapitre VI : Régulation spatiale de la formation des DCs intra-hotspots par l'activité kinase de Tel1

I. Le phénotype *Tel1kd*

La protéine Tel1 est une kinase, et son rôle repose essentiellement sur cette activité dans le contexte de la réponse au dommage à l'ADN : phosphorylation de H2A aux sites de cassures, phosphorylation de Rad53, un effecteur de la voie de signalisation Tel1 – Mec1, etc. Une question légitime a donc été de déterminer si l'interférence entre DSBs méiotiques médiée par Tel1 était dépendante de l'activité kinase de la protéine. Cette question a été adressée avant mon arrivée au laboratoire, et il est apparu que l'absence d'activité kinase n'entraîne qu'une perte partielle de l'interférence. Cependant, la mesure de l'interférence dans le mutant *tel1kd* (dont l'activité kinase a été mutée) est potentiellement erronée en raison d'un phénotype particulier observé chez ce mutant par Southern blot. En effet, en analysant la formation des DSBs à différents locus, on observe l'apparition de multiples bandes ou d'une trainée d'ADN (« smear ») en contexte *tel1kd* (Figure 67). Au locus *HIS4::LEU2*, la sonde radiomarquée *MRX2* permet d'observer une bande à chaque site de cassures en contexte *sae2Δ* tandis que plusieurs bandes sont visibles en contexte *sae2Δ tel1kd* (Figure 67A). Aux loci *GAT1* ou *ERG25*, le signal de DSBs observé en contexte *sae2Δ* forme une trainée, aussi appelé « smear », en contexte *sae2Δ tel1kd* (Figure 67B, Figure 67C). Ce phénotype complique la quantification du niveau de DSBs et la mesure de l'interférence.

Ce phénotype a été étudié plus en détail et il est apparu que celui-ci est dû à la dérégulation de la formation des DCs intra-hotspots ou DCs « hyperlocalisées » (*cf.* Chapitre I – Partie III). Pour rappel, il a récemment été démontré que des événements de DC surviennent au sein des hotspots de cassures (Johnson et al., 2021; Prieler et al., 2021). L'analyse des DCs générées dans le mutant *tel1kd* a révélé une dérégulation numérique et spatiale de leur formation : le nombre et la taille des DCs formées sont augmentés, et celles-ci peuvent survenir au de-là du hotspot de cassures, notamment dans les régions 5' des gènes adjacents (non publié). Ces travaux ont conduit à la conclusion qu'il existe une régulation spatiale de la formation des DSBs et DCs intra-

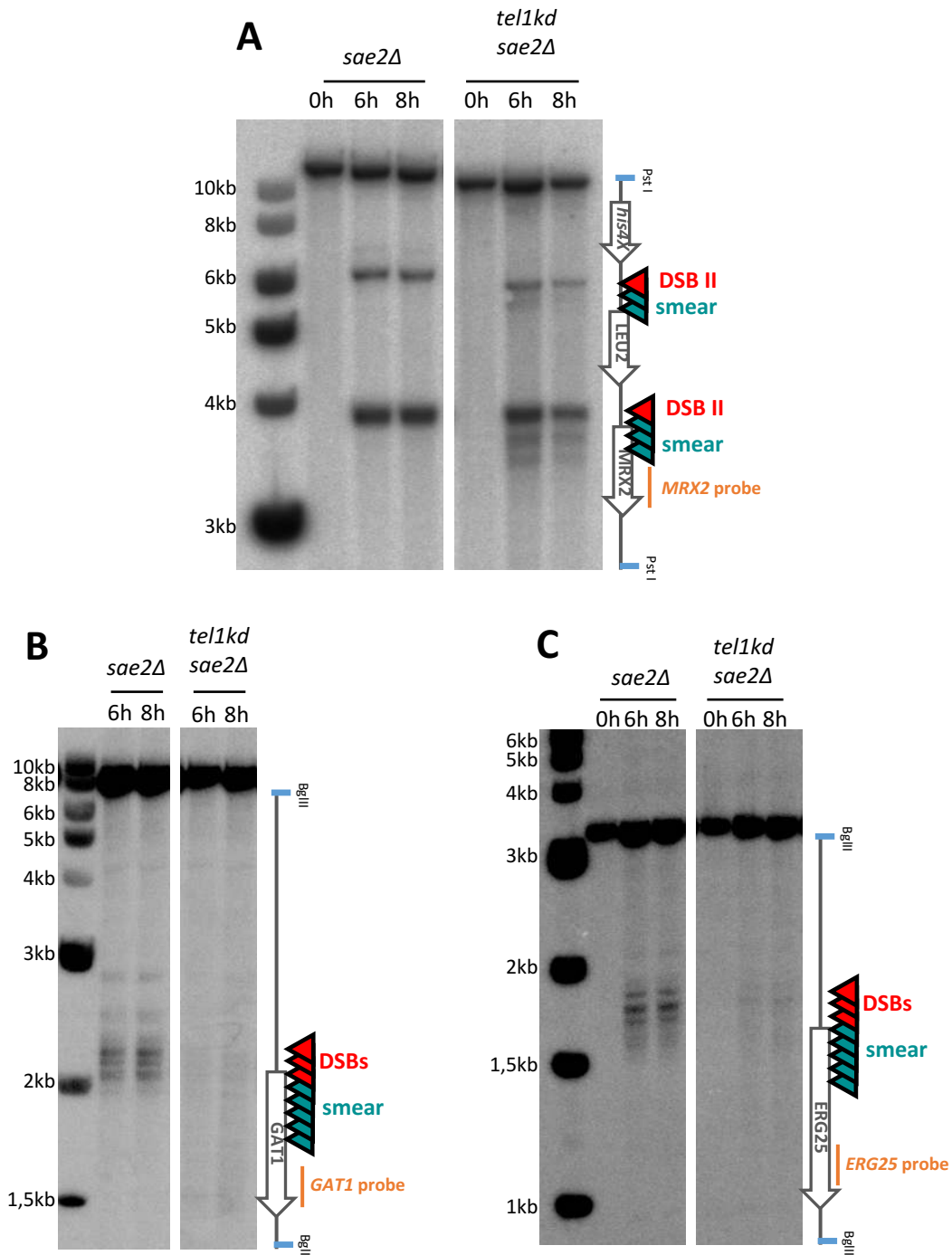


Figure 67 : Phénotype de propagation dirigée des DSBs en contexte *tel1kd*

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ* et *sae2Δ tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot. L'ADN est digéré par *PstI* et séparé sur un gel à 0,7% d'agarose.

(B) Détection des DSBs formées au locus *GAT1* dans les souches *sae2Δ* et *sae2Δ tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *GAT1* par Southern blot. L'ADN est digéré par *BglIII* et séparé sur un gel à 1,2% d'agarose.

(C) Détection des DSBs formées au locus *ERG25* dans les souches *sae2Δ* et *sae2Δ tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *ERG25* par Southern blot. L'ADN est digéré par *BglIII* et séparé sur un gel à 1,2% d'agarose.

hotspots dépendante de l'activité kinase de Tel1 (Figure 68). Ainsi, la présence de Tel1 sans activité kinase entraîne un déconfinement dirigé de la formation des DCs vers l'ORF adjacent, nommé « DC spreading » en anglais (Figure 68). De manière intéressante, l'absence complète de la protéine Tel1 n'induit pas une dérégulation aussi importante que le contexte *tel1kd*. En effet, l'absence de Tel1 induit un déconfinement très limité des DCs, uniquement détectable à certains hotspots par Southern blot (data non publiées).



Figure 68 : Dérégulation de la formation des DCs hyperlocalisés

Lors de la génération des DSBs par Spo11, des événements de double-cassures hyperlocalisées au sein des hotspots de cassures peuvent survenir (Johnson et al., 2021). Ces DCs hyperlocalisées sont concentrées au sein des hotspots *via* l'activité kinase de la protéine Tel1 (non publié). En absence d'activité kinase de Tel1, la régulation spatiale de ces DCs est abolie : des DCs de plus grandes tailles sont observées ainsi qu'une propagation dirigée vers la région des 5' des ORFs adjacents de celles-ci (non publié).

L'un de mes projets de thèse a donc consisté à étudier le phénotype particulier observé chez le mutant *tel1kd* et à comprendre la cause de cette dérégulation spatiale induite par la présence de la protéine mutée. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer si la protéine mutée, notée Tel1kd, est recrutée aux sites de cassures de la même manière que la protéine Tel1 non mutée. Nos résultats ont permis de démontrer que le recrutement de la forme mutée de Tel1 induit la dérégulation spatiale des DCs, et qu'abolir ce recrutement prévient le déconfinement des DCs. Ce constat nous a amenés à étudier les partenaires et cibles potentielles de phosphorylation de Tel1, et notamment la protéine Mre11. Il a été démontré *in vitro* que la protéine ATM phosphoryle MRE11 afin de promouvoir l'éviction du complexe MRN de l'ADN (Di Virgilio et al., 2009). Nous avons donc voulu déterminer si la présence de la protéine mutée Tel1kd pouvait empêcher l'éviction de la protéine Mre11 de l'ADN et ainsi conduire à la génération de DCs. En parallèle, Rakesh Aithal a montré par la technique de Turbo-ID une interaction entre Tel1 et la protéine Fun30 en méiose. Nous avons donc également testé l'implication de la protéine Fun30 dans le phénotype de propagation dirigée des DCs intra-hotspots. L'ensemble des résultats obtenus sur ce projet sera donc présenté ici.

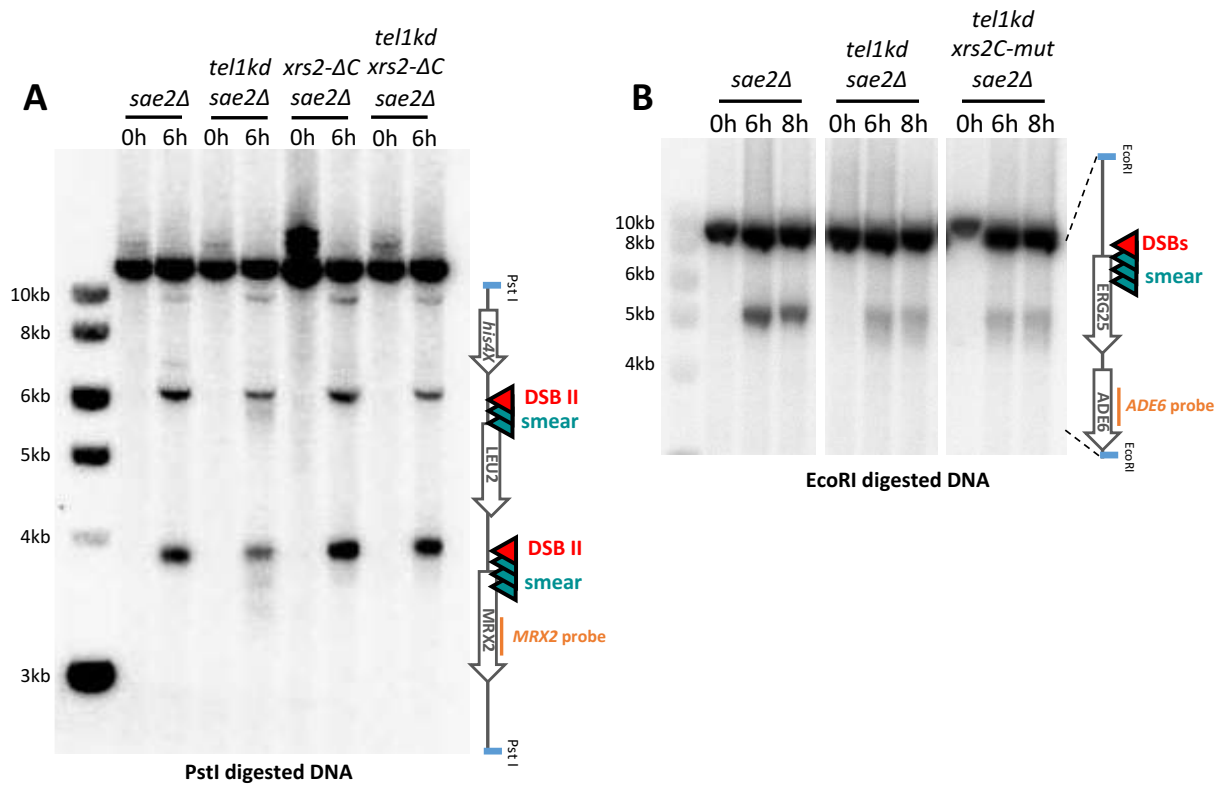


Figure 69 : Le phénotype de propagation dirigée des DCs est dépendant du recrutement de Tel1kd par Xrs2

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1kd*, *sae2Δ xrs2ΔC* et *sae2Δ xrs2ΔC tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot. L'ADN est digéré par *PstI* et séparé sur un gel à 0,7% d'agarose.

(B) Détection des DSBs formées au locus *ERG25* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1kd*, *sae2Δ xrs2C-mut tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *ADE6* par Southern blot. L'ADN est digéré par *EcoRI* et séparé sur un gel à 1,2% d'agarose.

II. Le recrutement de la protéine Tel1kd

La régulation spatiale des DCs intra-hotspots est dépendante de la protéine Tel1 et notamment de son activité kinase. En effet, comme énoncé précédemment, en absence de la protéine Tel1, il a été observé une augmentation du niveau de DCs ainsi qu'une propagation modérée de celles-ci. En revanche, la présence de la protéine mutée Tel1kd induit une forte dérégulation spatiale de la formation des DCs. Nous avons donc voulu comprendre comment la présence de la protéine mutée affecte de façon plus significative la régulation de la formation des DCs que l'absence complète de la protéine. Précédemment, j'ai démontré que la protéine Tel1 est recrutée aux sites de cassures *via* le domaine C-terminal de Xrs2. Nous avons donc cherché à déterminer si le recrutement de la protéine Tel1kd était responsable de la dérégulation observée en étudiant l'apparition des multiples bandes de DSBs caractéristiques du mutant *tel1kd* dans un double mutant *tel1kd xrs2CΔ*. Au locus *HIS4::LEU2*, les DSBs des sites I et II sont détectées à 6h post induction méiotique en contexte *sae2Δ* et *sae2Δ xrs2CΔ* (Figure 69A). En contexte *sae2Δ tel1kd*, les bandes correspondantes à chaque site de cassures sont moins intenses, et de multiples bandes plus petites apparaissent. Dans le triple mutant *sae2Δ xrs2CΔ tel1kd*, les multiples bandes et le « smear », observés en contexte *tel1kd*, ne sont pas visibles (Figure 69A). L'absence du domaine C-terminal de Xrs2 semble donc abolir le phénotype *tel1kd*. Le domaine C-terminal étant responsable du recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures, ces résultats indiquent que le recrutement de la protéine mutée Tel1kd aux sites de cassures cause la dérégulation et la propagation des DCs intra-hotspots.

Précédemment, nous avons testé l'impact du mutant *xrs2C-mut* sur le recrutement de Tel1 et la perte d'interférence entre DSBs (*cf.* Résultat – Partie I). Nous avons donc également testé l'impact de ce mutant sur la propagation des DCs hyperlocalisées observé en contexte *tel1kd*. Au locus *ERG25*, le signal de DSBs détecté est une trainée d'ADN dans le triple mutant *sae2Δ xrs2C-mut tel1kd* de la même manière que dans le mutant *sae2Δ tel1kd* (Figure 69B). Les mutations ponctuelles du mutant *xrs2C-mut* n'abolissent donc pas la propagation des DCs intrahotspots, contrairement au mutant *xrs2-ΔC*. Ce résultat est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le mutant *xrs2C-mut* n'abolit pas le recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures (*cf.* Résultat – Partie I).

Chez les mammifères, il a été démontré que la phosphorylation de MRE11 par ATM diminue l'association des deux protéines à l'ADN, tandis que l'absence de phosphorylation les stabilise à l'ADN (Di Virgilio et al., 2009). Il a ainsi été proposé que

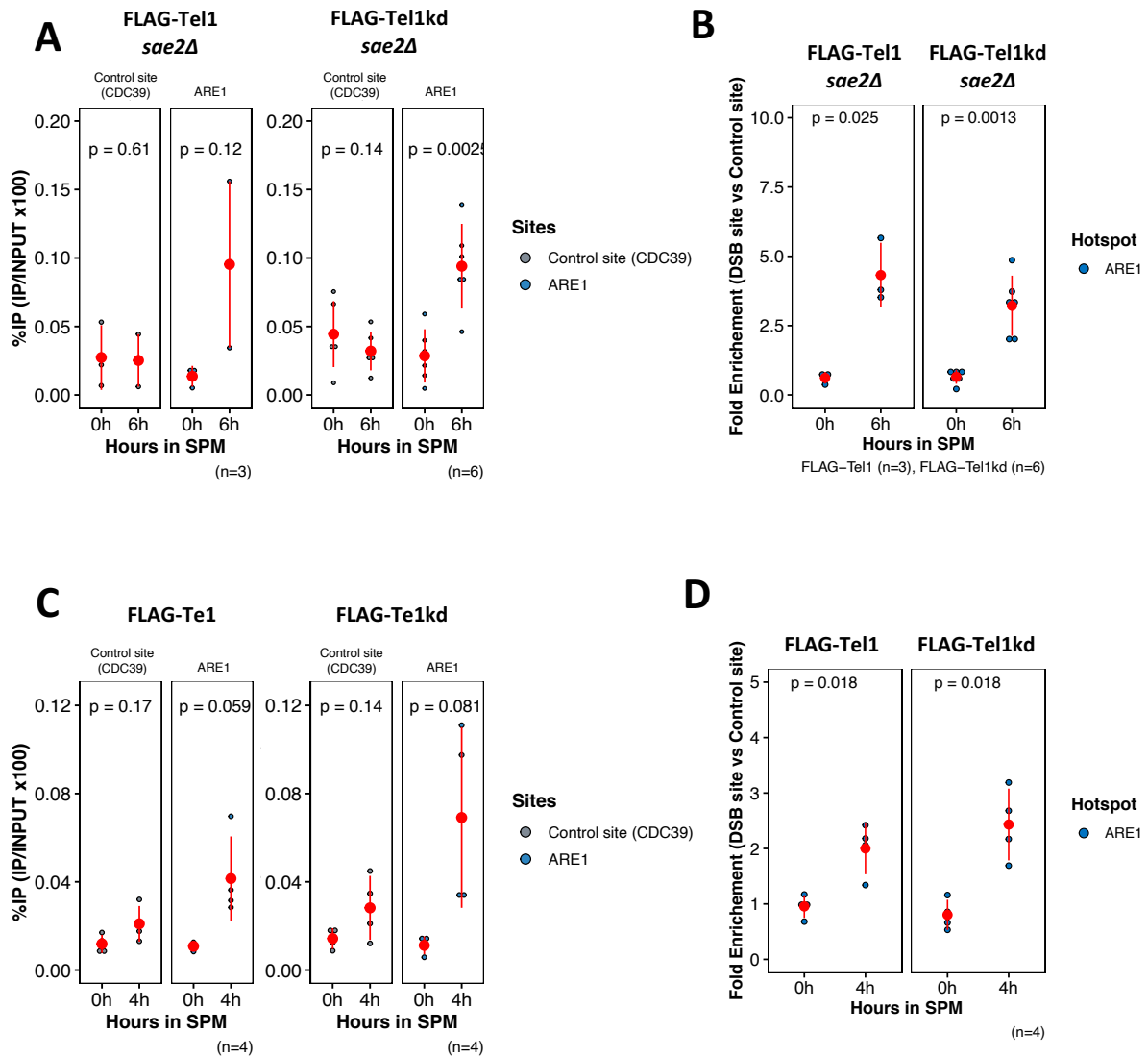


Figure 70 : Recrutement de la protéine Tel1kd au hotspot ARE1 en contexte SAE2 et sae2Δ

(A) %IP de FLAG-Tel1 et FLAG-Tel1kd en contexte *sae2Δ* par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et au hotspot de cassures *ARE1*. En rouge sont représentée la moyenne des valeurs et l'écart type associé. Les p-valeurs ont été calculées par test de Student (*cf.* Matériel et Méthode).

(B) Enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Tel1kd en contexte *sae2Δ* au hotspot de cassures *ARE1* normalisé au site contrôle.

(C) %IP de FLAG-Tel1 et FLAG-Tel1kd en contexte *SAE2* par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et au hotspot de cassures *ARE1*. En rouge sont représentée la moyenne des valeurs et l'écart type associé. Les p-valeurs ont été calculées par test de Student (*cf.* Matériel et Méthode).

(D) Enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Tel1kd en contexte *SAE2* WT au hotspot de cassures *ARE1* normalisé au site contrôle.

cette phosphorylation permette l'éviction de MRE11 et ATM de l'ADN (Di Virgilio et al., 2009; Paull, 2015). Ces éléments nous ont amenés à proposer une stabilisation des protéines Mre11 et Tel1kd à l'ADN. De plus, Mre11 participant à la formation des DSBs, la stabilisation de celle-ci aux sites de cassures en contexte *tel1kd* pourrait favoriser la formation de multiples DSBs au sein des hotspots. Afin d'explorer cette piste, j'ai comparé par CHIP le recrutement de la protéine mutée Tel1kd au recrutement de la protéine sauvage au site *ARE1*. Premièrement, j'observe un recrutement de la protéine Tel1kd en contexte *sae2Δ* au hotspot *ARE1* (Figure 70A, Figure 70B). En comparant l'enrichissement de la protéine sauvage Tel1 et mutée Tel1kd, je n'observe pas de différence : la moyenne des %IP est similaire dans les deux souches (~0,1 %IP, Figure 70A). Les enrichissements des deux protéines sont proches : ~4 fois enrichie par rapport au site contrôle pour la protéine Tel1 et 3 fois enrichie pour la protéine Tel1kd (Figure 70B). La protéine Tel1kd est donc recrutée aux hotspots de cassures et dans les mêmes proportions que la protéine sauvage en contexte *sae2Δ*. Cependant, en contexte *sae2Δ* la protéine Tel1 présente déjà un enrichissement fort aux hotspots de cassures et une augmentation de cet enrichissement pourrait être difficile à détecter. J'ai donc réalisé la même expérience dans un contexte *SAE2* WT à 4h post-induction méiotique, où l'enrichissement de Tel1 est plus faible qu'en contexte *sae2Δ*. En contexte *SAE2*, la protéine Tel1kd est également détectée au hotspot *ARE1* (Figure 70C, Figure 70D). Le %IP moyen mesuré en contexte *SAE2* semble en moyenne supérieur pour la protéine Tel1kd (~0,07%) que pour la protéine Tel1 (~0,04%, Figure 70C), cependant cet écart n'est pas significatif (*p-valeur* = 0,27). De plus, l'enrichissement par rapport au site contrôle est similaire pour les protéines sauvages et mutées (2 et 2,5 fois enrichie respectivement ; Figure 70D). Bien que l'enrichissement soit légèrement supérieur pour la protéine Tel1kd, cette différence n'est pas significative (*p-valeur* = 0,31). La protéine Tel1kd est donc recrutée aux hotspots de cassures dans des proportions comparables à la protéine sauvage, en contexte *SAE2* et *sae2Δ*. Il n'y a donc pas de rétention accrue de la protéine mutée aux sites de cassures.

Nos premiers résultats ont montré que la propagation dirigée des DCs intra-hotspots résulte du recrutement de la protéine mutée aux sites de cassures. Par ailleurs, l'absence de Tel1 n'induit pas le même phénotype. Ces deux aspects suggèrent que la présence de la protéine Tel1 participe à la délocalisation DCs intra-hotspots, indépendamment de son activité kinase, tandis que l'activité kinase de la protéine réprime leur formation. En suivant cette logique, nous avons proposé que le recrutement de la protéine Tel1 puisse stabiliser ou recruter une seconde protéine qui favoriserait la formation des DSBs, tandis que son activité kinase limiterait leur formation.

III. Piste explorée : rétention de la protéine

Mre11

Pour étudier le phénotype observé dans le mutant *tel1kd*, je me suis intéressée à la protéine Mre11. En effet, chez les mammifères, il a été démontré que la protéine ATM, orthologue de Tel1, est recrutée aux DSBs *via* le domaine C-terminal de NBS1, orthologue de Xrs2 (Falck et al., 2005; You et al., 2005). *In vitro*, ATM phosphoryle la protéine MRE11 ce qui réduit l'affinité du complexe MRN pour l'ADN, et il a été proposé que la phosphorylation de MRE11 induise l'éviction du complexe du site de cassure (Di Virgilio et al., 2009). D'autre part, chez *S. cerevisiae*, il a également été proposé que le recrutement de la protéine Tel1 par Xrs2 permette de stabiliser le complexe MRX sur l'ADN, aux sites de cassures ou au télomère, et ce indépendamment de l'activité kinase de Tel1 (Cassani et al., 2016; Hirano et al., 2009). En prenant en compte les différents éléments de la littérature, il était envisageable que le recrutement de la protéine Tel1 puisse stabiliser le complexe MRX aux DSBs méiotiques, indépendamment de l'activité kinase de Tel1, et que la phosphorylation de Mre11 par Tel1 promeuve l'éviction du complexe MRX, à l'image de ce qui a été observé chez les mammifères. En présence de la protéine *Tel1kd*, le complexe MRX serait stabilisé aux DSBs et favoriserait la formation de DSBs.

Afin de tester cette hypothèse, j'ai étudié le recrutement de la protéine Mre11 aux hotspots de cassures en contexte *tel1kd*. J'ai également généré différents phosphomutants de la protéine Mre11 : les motifs SQ/TQ, phosphorylés par Tel1, ont été substitués par des alanines (AQ). Par Southern blot, j'ai observé la formation des DSBs dans les phosphomutants afin de déterminer si ceux-ci mimaient le phénotype *tel1kd*. Dans le même temps, j'ai utilisé le mutant *mre11-P110L*, caractérisé par Chen *et al.*, et dont la mutation déstabilise l'interaction de Mre11 à l'ADN (Chen et al., 2015) et j'ai cherché à déterminer si cette mutation pouvait contrecarrer le phénotype *tel1kd*.

Pour étudier le recrutement de la protéine Mre11, j'ai cherché à utiliser une version étiquetée de la protéine. Cependant, j'ai rencontré de nombreuses difficultés avec les souches Mre11-myc et Mre11-HA en méiose. Je présenterai donc dans un premier temps les résultats obtenus avec les versions étiquetées de la protéine Mre11 avant de décrire les résultats obtenus sur le recrutement de la protéine et l'effet des phosphomutants générés.

1. L'utilisation de version étiquetée de Mre11 altère l'entrée en méiose

Pour étudier le recrutement de la protéine Mre11, j'ai tenté d'utiliser deux versions étiquetées de la protéine : Mre11-myc et Mre11-HA. La souche Mre11-myc a été générée au laboratoire avant mon arrivée, tandis que j'ai généré la souche Mre11-HA en clonant le gène Mre11 dans un plasmide pFA6-3HA-KAN::MX6. Les deux étiquettes myc et HA ont été intégrées en C-terminal, afin d'éviter de potentiellement altérer le domaine nucléase de la protéine qui est localisé en N-terminal.

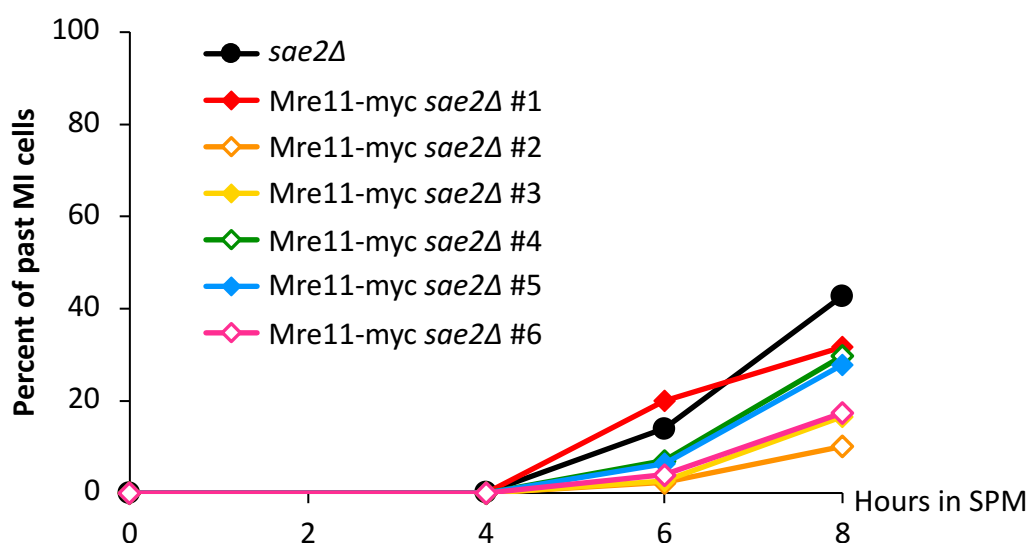


Figure 71 : Progression méiotique de la souche Mre11-myc *sae2Δ*

L'avancement dans le cycle méiotique est suivi par marquage de l'ADN au DAPI et décompte des cellules à 1, 2 ou 4 noyaux. 6 cinétiques méiotiques indépendantes ont été réalisées sur la souche Mre11-myc *sae2Δ*.

1.1 La souche Mre11-myc

En utilisant la version Mre11-myc, j'ai rapidement constaté des défauts ponctuels de progression méiotique. Afin de déterminer si ces défauts provenaient de la souche ou d'une mauvaise manipulation, j'ai réalisé une cinétique méiotique sur 6 réplicats indépendants de la souche Mre11-myc *sae2Δ*.

L'analyse de la progression méiotique a révélé des défauts importants pour certains réplicats (Figure 71). À 8h post-induction méiotique, la souche contrôle *sae2Δ* a atteint ~45% de cellules ayant passé au moins la première division méiotique, ce qui est attendu en raison du checkpoint méiotique dépendant de Tel1 (Figure 71). Parmi les souches Mre11-myc *sae2Δ*, les réplicats #1, #4 et #5 atteignent ~30% de cellules ayant passé la MI, tandis que les réplicats #2, #3 et #6 ne présente que ~10-17% de cellules ayant passé la MI (Figure 71). Les souches étiquetées présentent donc un

défaut variable de progression méiotique. Une analyse par cytométrie en flux (FACS) suggère un retard d'entrée en phase S des souches *Mre11-myc sae2Δ*, compatible avec les défauts de progression méiotique observés (données non présentées). Au vu de ces résultats problématiques, nous avons décidé de modifier la stratégie expérimentale en utilisant une étiquette 3HA.

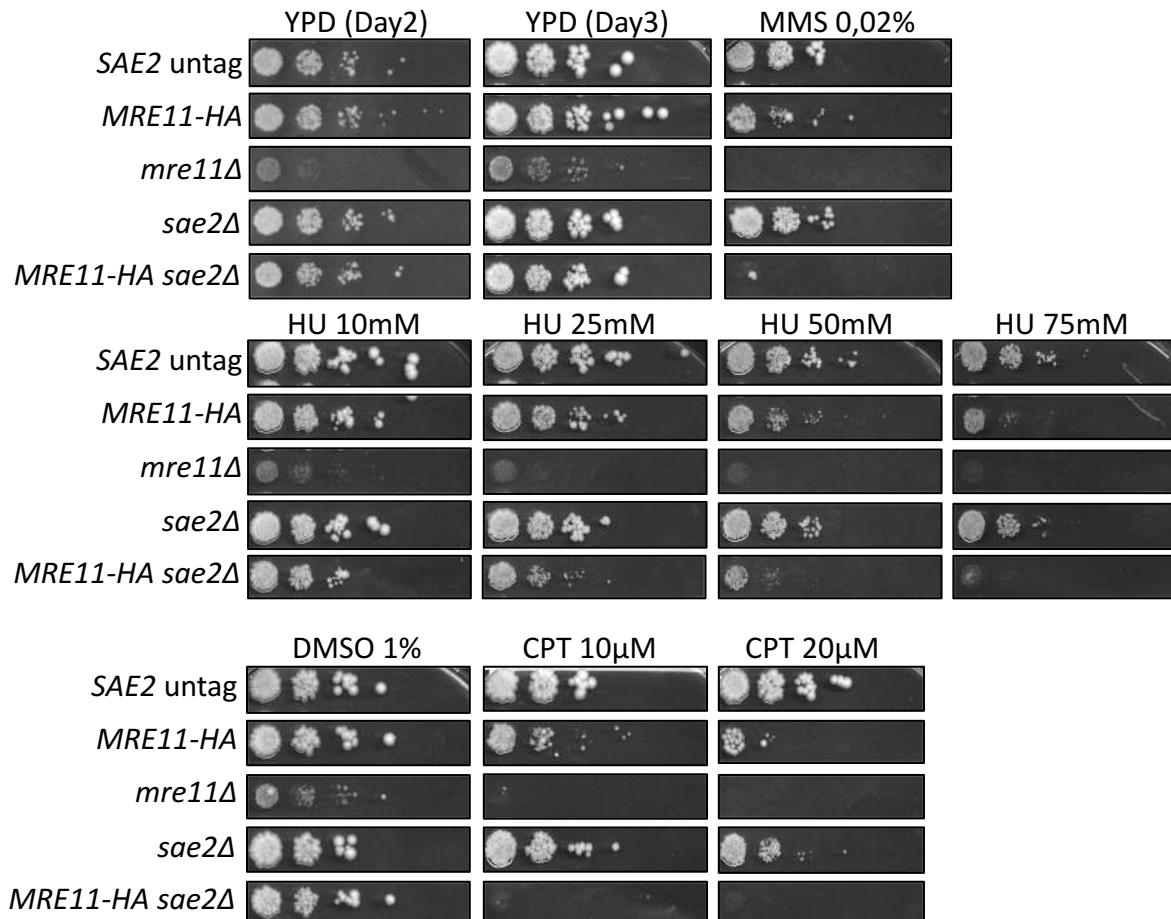


Figure 72 : Test en goutte des souches *Mre11-HA* en contexte *SAE2* et *sae2Δ*

Une dilution sériée d'un facteur 4 des souches *Mre11-Ha* en contexte *SAE2* et *sae2Δ* a été déposée sur YPD en présence ou en absence d'agents génotoxiques. Les cellules ont été mises en présence de différents agents génotoxiques : hydroxyurée (HU), méthanesulfonate de méthyle (MMS) et camptothécine (CPT), aux concentrations indiquées. La croissance des cellules sur YPD est présentée à 2 et 3 jours après dépôt sur boîte. La croissance des cellules en présence d'agents génotoxiques est présentée à 3 jours après dépôt sur boîte.

1.2 La souche *Mre11-HA*

Afin de générer la souche *Mre11-HA*, le gène *MRE11* a été cloné dans le plasmide pFA6-3HA-KAN::MX6 et le produit d'amplification *MRE11-3HA-KAN::MX6* a été transformé dans une souche de référence (VG737, cf. Matériel et Méthode). Au vu des difficultés rencontrées avec l'étiquette myc, j'ai cherché à déterminer l'impact potentiel de l'étiquette HA sur les cellules. D'une part j'ai réalisé un test en goutte

(« spot test ») pour observer l'effet potentiel de l'étiquette HA sur la croissance végétative et la résistance aux dommages à l'ADN. D'autre part, j'ai contrôlé la progression méiotique et la capacité à former des DSBs de la souche étiquetée Mre11-HA.

Résistance aux dommages à l'ADN en présence de l'étiquette HA

En réalisant un test en goutte, j'ai pu comparer la croissance végétative et la résistance à différents agents génotoxiques des souches Mre11-HA en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ* par rapport à des souches non étiquetées. En contrôle, j'ai également utilisé la souche *mre11Δ*, connue pour avoir un retard de croissance et une sensibilité très importante aux agents génotoxiques.

En absence d'agent génotoxique, j'ai pu comparer la croissance des souches étiquetées par rapport aux souches non étiquetées : au 2^{ème} et 3^{ème} jour après dépôt des cellules sur milieu YPD, les souches étiquetées ne présentent pas de retard de croissance par rapport aux souches non étiquetées (Figure 72). Je ne note pas non plus de différence dans le nombre et la taille des colonies entre les souches étiquetées et non étiquetées (Figure 72).

J'ai également comparé la résistance des souches à différents agents génotoxiques : le méthanesulfonate de méthyle (MMS), qui est un agent alkylant de l'ADN et qui entraîne le blocage des fourches de réplication ; l'hydroxyurée (HU) qui réduit la production de désoxyribonucléotides en inhibant la ribonucléotide réductase (RNR), entraînant alors le ralentissement et l'arrêt des fourches de réplication ; et enfin, la camptothécine (CPT) qui bloque l'action de religation des topoisomérases de type I et conduit à la formation de DSBs aux extrémités bloquées.

En présence de MMS à 0,02%, les souches non étiquetées (*SAE2* et *sae2Δ*) sont capables de former des colonies tandis que les souches étiquetées présentent une sensibilité associée à une croissance ralentie (Figure 72). L'effet de la présence du HA est exacerbé en contexte *sae2Δ* puisque les souches étiquetées sont incapables de pousser en présence de MMS (Figure 72). La présence de l'étiquette HA sensibilise la souche au MMS et impacte sa résistance. La résistance à l'HU a été testée pour différentes concentrations (de 10 à 100mM). Dès 25mM HU, les souches étiquetées en contexte *SAE2* et *sae2Δ* présentent une sensibilité plus importante que les souches contrôles non étiquetées (Figure 72). L'effet est fortement amplifié à 50mM HU, et à 75mM HU les souches étiquetées sont incapables de former des colonies (Figure 72). Les souches étiquetées présentent donc une sensibilité importante à la présence d'HU. Enfin, j'ai testé la croissance des souches en présence de 10μM et 20μM de CPT. La CPT étant dissoute dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), les cellules sont également

placées en présence de 1% de DMSO en contrôle, et celles-ci ne présentent aucun défaut de croissance (Figure 72). En présence de 10 μ M de CPT, les souches étiquetées en contexte *sae2 Δ* sont incapables de former des colonies (Figure 72). En contexte *SAE2* WT, les souches étiquetées forment des colonies en présence de 10 μ M de CPT mais la croissance cellulaire est affectée en présence de l'étiquette HA (Figure 72). Cet effet est exacerbé à 20 μ M de CPT, où la souche Mre11-HA forme très peu de colonies et présente de gros défauts de croissance végétative. Les souches étiquetées présentent donc également une forte sensibilité à la CPT.

La présence de l'étiquette HA ne semble donc pas impacter la croissance végétative des cellules en absence d'agent génotoxique. Cependant, la présence de l'étiquette affecte fortement la résistance des cellules aux agents génotoxiques, et donc la réponse aux dommages à l'ADN. Mre11 est une protéine essentielle des voies de réparation de DSB (Gobbini et al., 2016) et joue également un rôle important aux fourches de réplication bloquées (Tittel-Elmer et al., 2009). Il est possible que la présence de l'étiquette HA affecte les fonctions de réparation de Mre11 et induise la sensibilité aux agents génotoxiques observée.

Défauts méiotiques en présence de l'étiquette HA

J'ai également contrôlé la progression méiotique de la souche étiquetée Mre11-HA *sae2 Δ* . Pour rappel, en contexte *sae2 Δ* , la présence de DSBs non resectées entraîne l'activation d'un checkpoint dépendant de Tel1 et Mre11 (Usui et al., 2001), et seuls 50% de cellules passent la MI après 8h en milieu de sporulation (Figure 73A). La souche Mre11-HA *sae2 Δ* se comporte de manière similaire à la souche contrôle : ~50% des cellules ont passé la MI à 8h post induction méiotique (Figure 73A). J'ai poursuivi l'analyse de la souche Mre11-HA *sae2 Δ* en vérifiant la formation des DSBs au locus *HIS4::LEU2*. Par Southern blot, les DSBs sont détectées dans la souche contrôle *sae2 Δ* mais pas dans la souche Mre11-HA *sae2 Δ* (Figure 73B), suggérant que l'étiquette HA altère la formation des DSBs méiotiques.

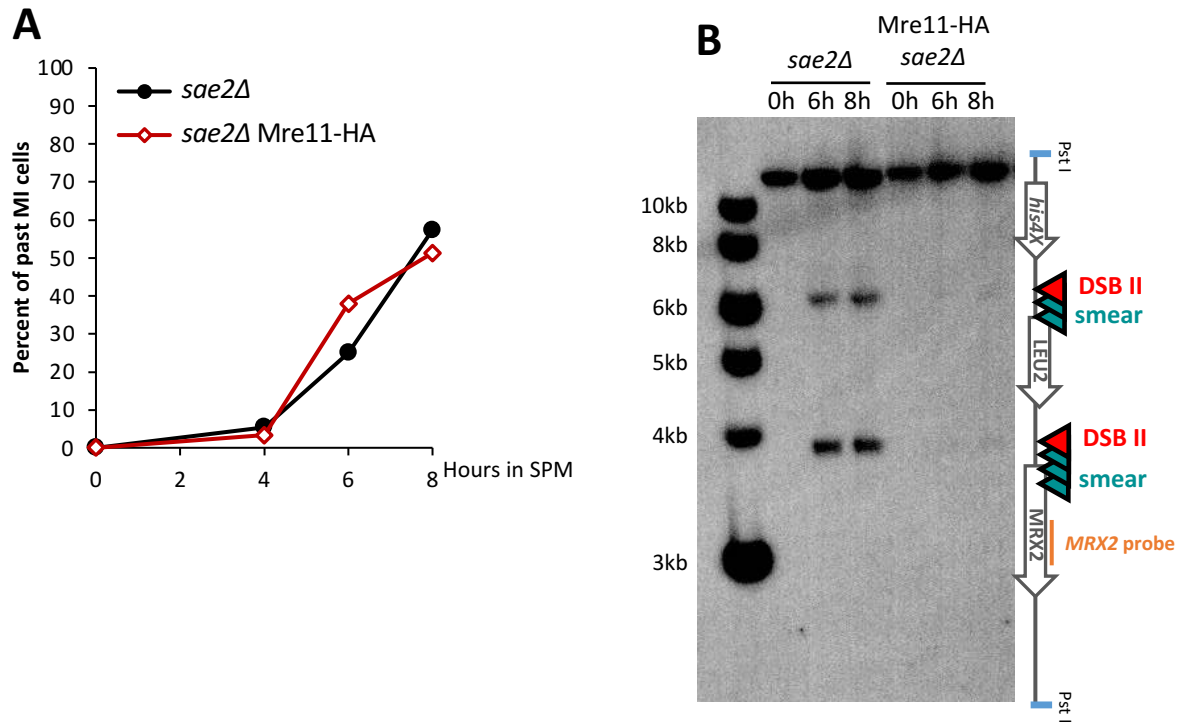


Figure 73 : Défauts méiotiques de la souche Mre11-HA *sae2Δ*

(A) Progression méiotique des souches *sae2Δ* et Mre11-HA *sae2Δ*. L'avancement dans le cycle méiotique est suivi par marquage de l'ADN au DAPI et décompte des cellules à 1, 2 ou 4 noyaux.

(B) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ* et Mre11-HA *sae2Δ*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot. L'ADN est digéré par *Pst*I et séparé sur un gel à 0,7% d'agarose.

L'étiquette HA fusionnée à la protéine Mre11 impacte donc la réponse aux dommages à l'ADN en cycle mitotique (Figure 72) et la formation des DSBs méiotiques (Figure 73). De plus, l'étiquette myc altère l'entrée en méiose et la progression méiotique (Figure 71). Ensemble, ces différents résultats m'ont mené à la conclusion que la présence d'une étiquette sur la protéine Mre11 affecte négativement le programme méiotique, possiblement en déstabilisant la protéine Mre11. Dans la littérature, deux études utilisent une forme étiquetée de Mre11 en méiose sans que les fonctions de la protéine ou la progression méiotique ne semblent affectées (Chen et al., 2016; Kugou et al., 2009). D'une part, Chen *et al.* utilisent une version Mre11-6HA tandis que nous avons utilisé une étiquette 3HA ce qui pourrait expliquer les différences obtenues (Chen et al., 2016). D'autre part, Kugou *et al.* utilisent l'étiquette FLAG lors de leur ChIP sur Mre11 (Kugou et al., 2009). Il aurait été intéressant de tester ces étiquettes également.

Néanmoins, au vu des difficultés rencontrées avec les versions étiquetées de Mre11, nous avons décidé de poursuivre l'étude de Mre11 en absence d'étiquette, en utilisant un anticorps commercial directement dirigé contre la protéine.

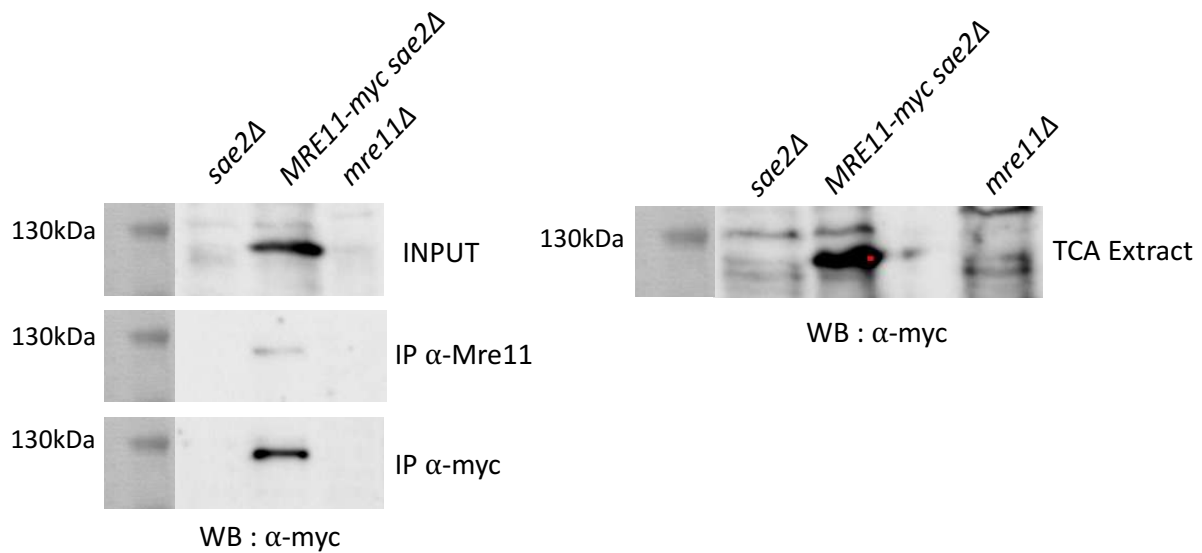


Figure 74 : Test de l'anticorps dirigé contre la protéine Mre11 par immunoprécipitation de Mre11-myc

Western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre l'étiquette myc. Les échantillons sont issus d'une immunoprécipitation réalisée avec un anticorps anti-Mre11 ou anti-myc. En révélant la présence de la protéine avec un anticorps anti-myc, Mre11-myc est détectée après immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre Mre11 et l'anticorps dirigé contre myc. En contrôle, un Western blot contre la protéine étiquetée Mre11-myc a été réalisé. Le western blot complet et non mis en forme a été placé en Annexe 14.

2. Enrichissement de Mre11 à *ARE1* en absence d'activité

Tel1

Comme énoncé en amont, nous avons proposé que le recrutement de Tel1 stabilise potentiellement la protéine Mre11 à l'ADN, tandis que l'activité kinase de Tel1 serait requise pour son éviction. Afin de déterminer si la présence de Tel1kd stabilise plus la protéine Mre11 aux hotspots de cassures que la protéine Tel1, j'ai comparé l'enrichissement de la protéine Mre11 au locus *ARE1* en présence de la protéine Tel1 non mutée (*sae2Δ*), de la protéine mutée Tel1kd (*sae2Δ tel1kd*), ainsi qu'en absence de la protéine Tel1 (*sae2Δ tel1Δ*).

Au vu des défauts d'entrée en méiose des souches contenant une version étiquetée de la protéine Mre11, j'ai utilisé un anticorps dirigé contre Mre11 afin de réaliser le CHIP. J'ai donc dans un premier temps testé l'efficacité d'immunoprécipitation de l'anticorps polyclonal commercial anti-Mre11 (Abcam, ab12159). J'ai immunoprécipité la protéine Mre11-myc avec l'anticorps dirigé contre la protéine et j'ai confirmé l'immunoprécipitation de la protéine par Western blot en révélant la présence de la protéine à l'aide d'un anticorps anti-myc (Figure 74, Annexe 14).

Après avoir confirmé l'efficacité de l'anticorps, j'ai réalisé le CHIP de Mre11. Comme montré dans la partie résultat précédente (Figure 54), Mre11 est enrichie au site de cassures *ARE1* en contexte *sae2Δ* (Figure 75A, Figure 75B). Les %IP en contexte *tel1Δ sae2Δ* et *tel1kd sae2Δ* sont en moyenne plus élevées, mais les valeurs sont plus dispersées (Figure 75A). Mre11 est donc présente au locus *ARE1* dans les différents contextes. En absence de Tel1, l'enrichissement de Mre11 est plus important qu'en contexte *sae2Δ* : 15 fois enrichies en contexte *sae2Δ tel1Δ* vs 5 en *sae2Δ* (*p-valeur* = 0,002, Figure 75B). En contexte *tel1kd sae2Δ*, les valeurs obtenues sont plus dispersées, certaines valeurs se rapprochent de celles obtenues en *tel1Δ sae2Δ* tandis que d'autres sont plus basses (Figure 75B). L'enrichissement moyen de Mre11 en contexte *tel1kd sae2Δ* est plus important qu'en contexte *sae2Δ* (11 fois enrichie vs 5 fois enrichies respectivement, Figure 75B) cependant cette différence n'est pas significative (*p-valeur* = 0,096). Ainsi, Mre11 semble plus enrichie aux hotspots de cassures en absence de la protéine Tel1 ou en absence de son activité kinase. Mes résultats ne montrent pas d'enrichissement plus important de la protéine Mre11 en contexte *tel1kd sae2Δ* qu'en contexte *tel1Δ sae2Δ*, ce qui va à l'encontre de notre hypothèse de départ.

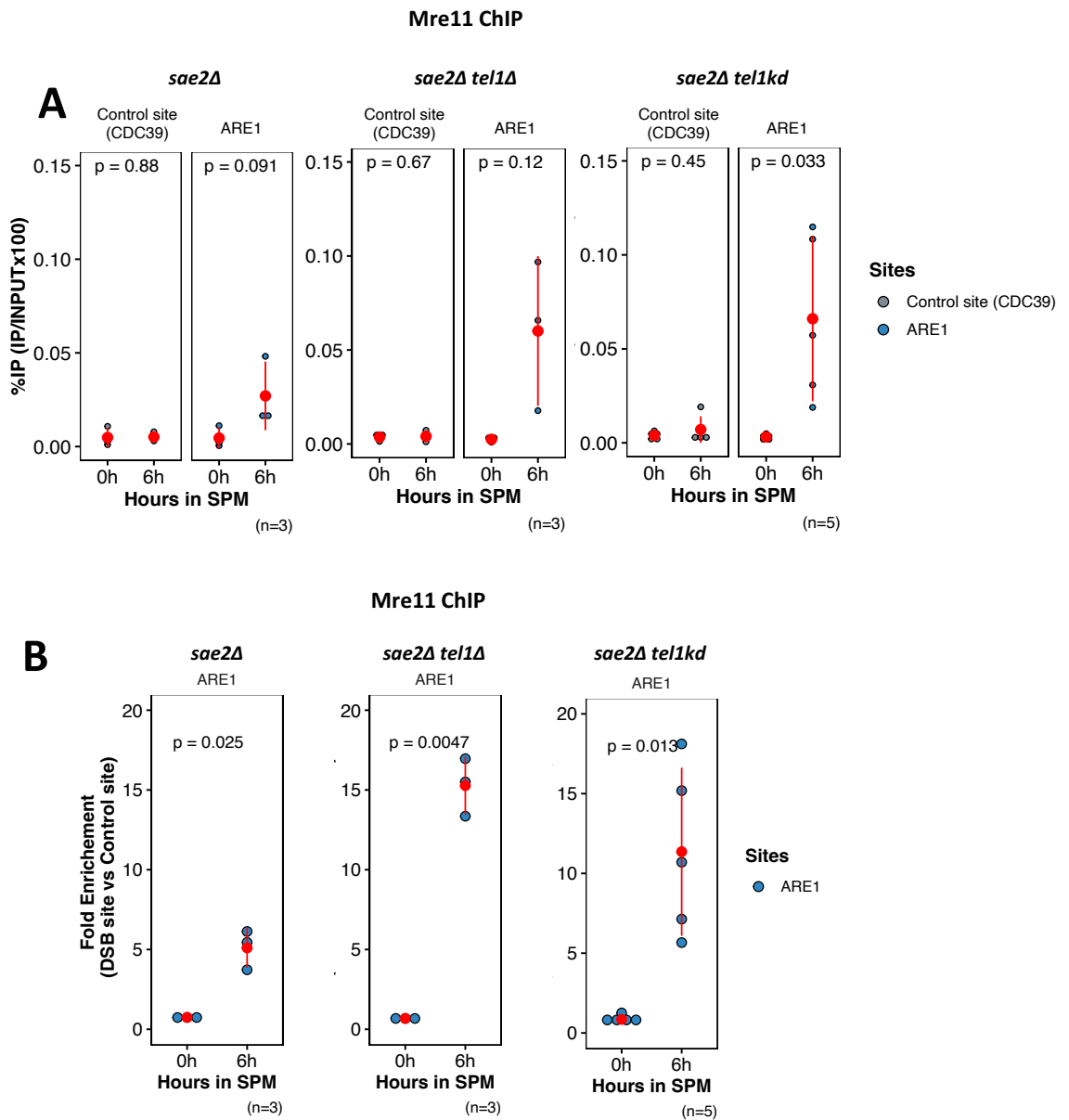


Figure 75 : Recrutement de Mre11 au hotspot ARE1 en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ tel1kd*

(A) %IP de Mre11 en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ tel1kd* par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et au hotspot de cassures *ARE1*. En rouge sont représentée la moyenne des valeurs et l'écart type associé. Les p-valeurs ont été calculées par test de Student (cf. Matériel et Méthode).

(B) Enrichissement en Mre11 en contexte *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ tel1kd* au hotspot de cassures *ARE1* normalisé au site contrôle.

L'absence de différence d'enrichissement entre les conditions *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ tel1kd* pourrait être due à l'utilisation du fond génétique *sae2Δ*, et à une accumulation déjà trop importante de la protéine en absence de Tel1 pour déceler une augmentation en présence de la protéine mutée Tel1kd. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé le CHIP de Mre11 en contexte *SAE2* WT. Je n'ai cependant pas obtenu d'enrichissement significatif de la protéine Mre11 : les %IP obtenus sont 10 à 100 fois plus faible que ceux obtenus habituellement pour les CHIPs de Mre11 en contexte *sae2Δ* ou de Tel1 (Annexe 15) et les %IP obtenus en contexte *SAE2* WT sont équivalents à ceux obtenus dans la condition contrôle « sans anticorps » (Annexe 15). Une répétition du CHIP m'a mené au même résultat, suggérant que le CHIP de Mre11 en contexte *SAE2* WT nécessite d'être optimisé.

En conclusion, il semblerait que l'absence d'activité de la protéine Tel1 (*tel1Δ* ou *tel1kd*) induise un recrutement ou une stabilisation de Mre11 aux hotspots. L'activité de Tel1 pourrait donc être requise pour déstabiliser Mre11 à l'ADN, ou éviter son accumulation aux sites de cassures. Cette déstabilisation pourrait être causée par la phosphorylation de la protéine par Tel1, et il serait intéressant d'étudier l'enrichissement des formes non phosphorylables de Mre11 aux sites de cassures. Nos résultats ne permettent cependant pas d'expliquer la différence de dérégulation des DCs intrahotspots entre les contextes *tel1Δ* et *tel1kd*.

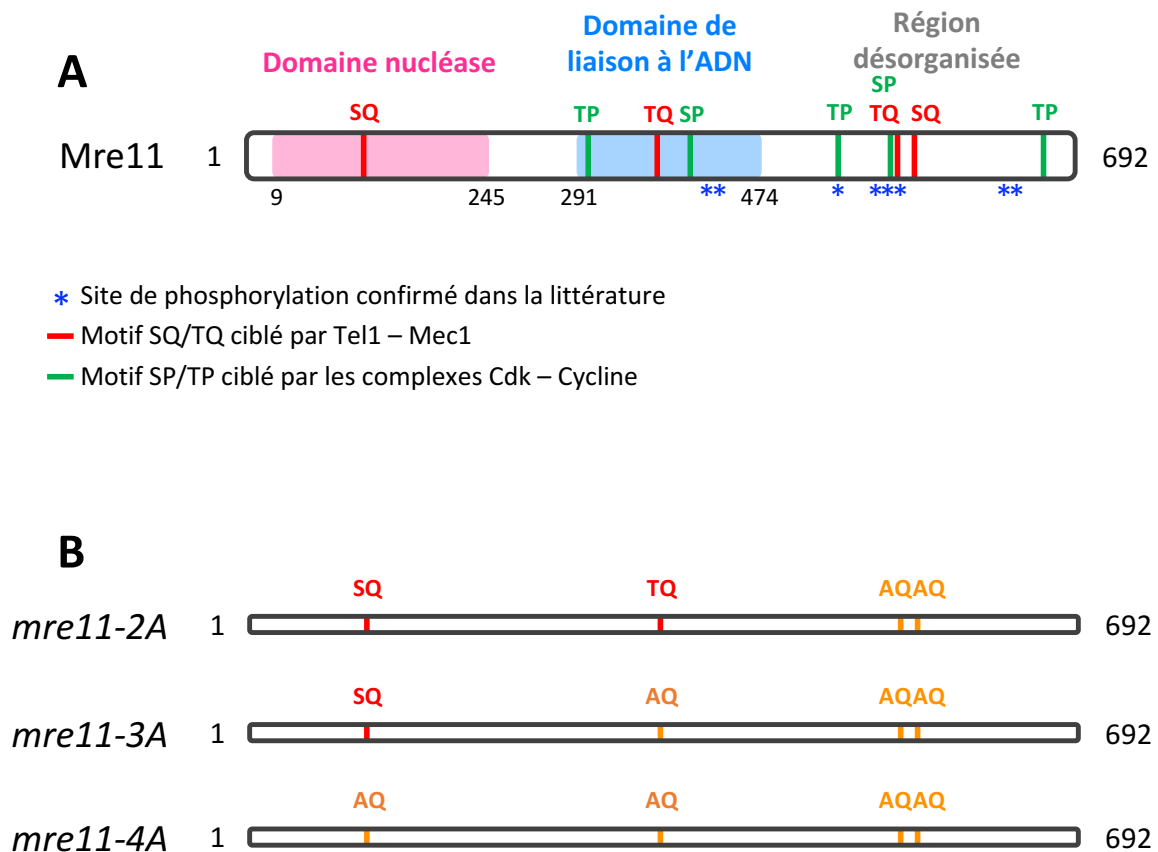


Figure 76 : Schématisation de la protéine Mre11 et localisation des motifs de phosphorylation SQ/TQ

(A) Représentation schématique de la protéine Mre11 et des principaux domaines identifiés. L'activité nucléase est portée par le domaine nucléase localisé en N-terminal de la protéine. Au centre de la séquence protéique se trouve le domaine de liaison à l'ADN de Mre11. Enfin, la région C-terminale est une région désorganisée. Les motifs de phosphorylation SQ/TQ ciblés par Tel1 – Mec1 sont représentés en rouge. Les motifs de phosphorylation SP/TP ciblés par les complexes Cdk – cycline sont représentés en vert. Les * représentent les résidus dont la phosphorylation a été confirmée par spectrométrie de masse (Albuquerque et al., 2008; Jones et al., 2011; Lanz et al., 2021; MacGilvray et al., 2020).

(B) Schématisation des phosphomutants de Mre11 générés. Le mutant *mre11-2A* possède deux mutations ponctuelles aboutissant à la substitution des résidus T564 Et S578 par des alanines. Le mutant *mre11-3A* possède également une substitution du résidus T377 en alanine. Le mutant *mre11-4A* possède, en plus des trois premières mutations, une substitution du résidu S94 en alanine

3. Génération et utilisation de formes non phosphorylables de la protéine Mre11

Au cours du cycle mitotique, la protéine Mre11 est phosphorylée par le complexe Cdc28-Clb2, notamment en fin de phase S jusqu'en métaphase (Simoneau et al., 2014). Cette phosphorylation promeut la réparation d'éventuelles DSBs par HR et participe à l'inhibition de la voie NHEJ (Simoneau et al., 2014). En présence de dommages de l'ADN, la protéine Mre11 est également phosphorylée par les protéines Tel1 – Mec1 (D'Amours and Jackson, 2001; Usui et al., 2001). En absence de Tel1, la phosphorylation de Mre11 est fortement réduite, et l'absence de Tel1 et Mec1 abolit complètement la phosphorylation de Mre11 dépendante des dommages à l'ADN (D'Amours and Jackson, 2001; Usui et al., 2001). De plus, la phosphorylation de Mre11 en réponse aux dommages à l'ADN ne requiert pas de phosphorylation dépendante du cycle cellulaire (Simoneau et al., 2014). De manière intéressante, Di Virgilio *et al.* ont observé *in vitro* qu'une préincubation de MRE11 avec ATM, ou l'utilisation de la forme MRE11-8D qui mime la phosphorylation de la protéine, réduisaient l'interaction de MRE11 avec l'ADN (Di Virgilio et al., 2009). Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de MRE11 par ATM déstabilise l'interaction de la protéine avec l'ADN.

Ces différents éléments nous ont amenés à étudier le rôle de la phosphorylation de Mre11 chez *S. cerevisiae* en méiose dans le cadre de la formation des DCs intra-hotspots. Dans cette optique, j'ai généré des formes mutantes de Mre11 dont les motifs SQ/TQ ont été substitués par des AQ. La protéine Mre11 possède quatre sites SQ/TQ : S94, localisé dans le domaine nucléase de la protéine ; T377, localisé dans le domaine de liaison à l'ADN ; T564 et S578, tous deux localisés dans la région C-terminale de Mre11 (Figure 76). Parmi ces quatre sites de phosphorylation, seul le résidu T377 a récemment été identifié comme phosphorylé *in vivo* par spectrométrie de masse dans une étude visant à étudier le phosphoprotéome de *S. cerevisiae* en présence d'un agent réducteur des ponts disulfure, le dithiothréitol (DTT) (MacGilvray et al., 2020). Par mutagenèse dirigée, j'ai muté les quatre motifs SQ/TQ et transformé une souche *MRE11* WT avec la construction *mre11-4A*. J'ai finalement obtenu trois formes mutées de Mre11 : *mre11-2A*, dont les résidus T564 et S578 ont été mutés, *mre11-3A*, qui contient en plus la mutation du résidu T377, et enfin le mutant *mre11-4A*, dont les quatre sites ont été mutés (Figure 76). Ces phosphomutants ont originellement été générés sur la version étiquetée Mre11-HA, et au vu des difficultés rencontrées avec cette souche, j'ai poursuivi l'étude des phosphomutants de Mre11 en absence de l'étiquette HA.

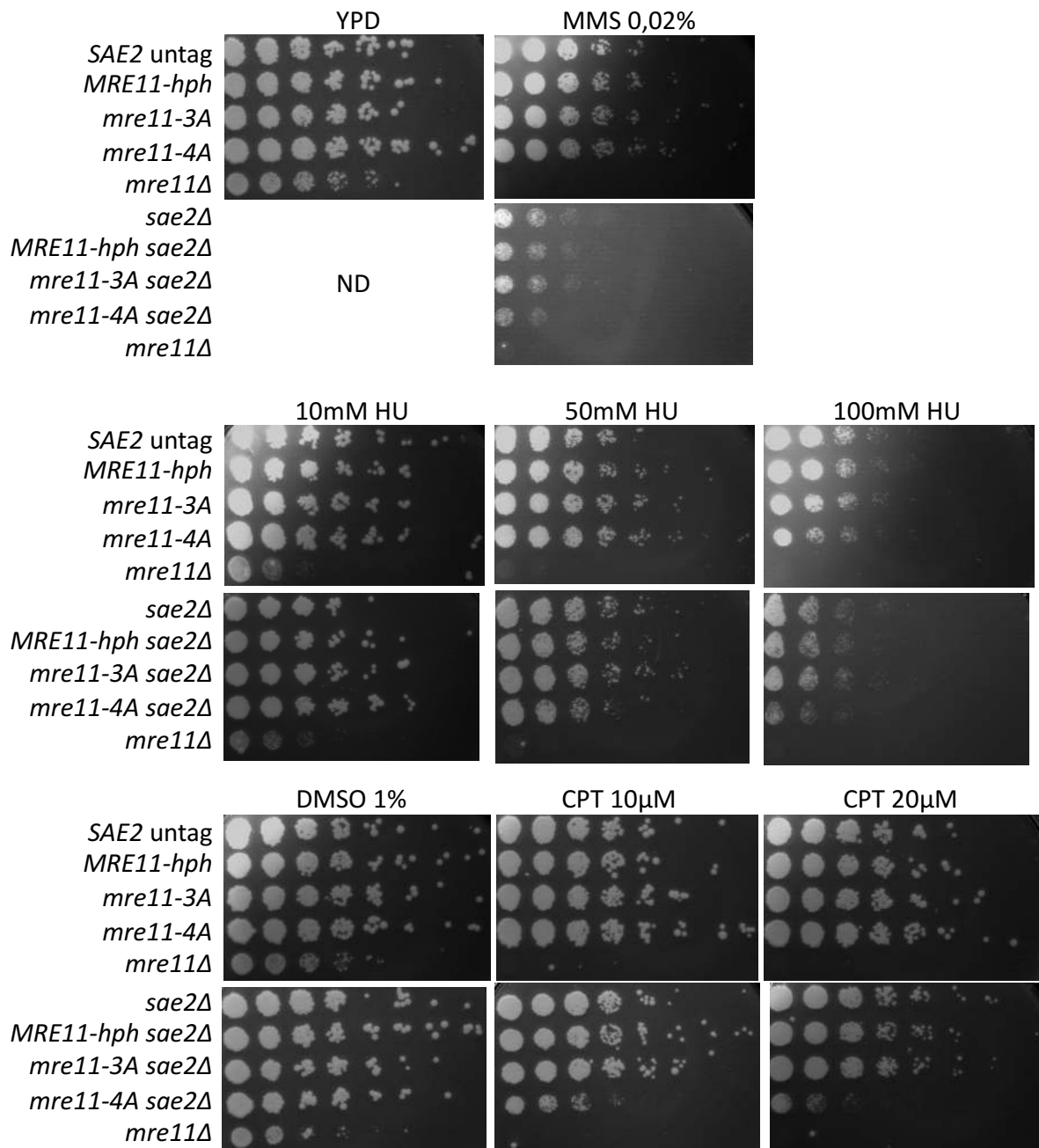


Figure 77 : Test en goutte des phosphomutants *mre11-3A* et *mre11-4A* en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ*

Une dilution sériée d'un facteur 4 des phosphomutants de Mre11 en contexte *SAE2* WT et *sae2Δ* a été déposée sur YPD en présence ou en absence d'agents génotoxiques. Les cellules ont été mises en présence de différents agents génotoxiques : hydroxyurée (HU), méthanesulfonate de méthyle (MMS) et camptothécine (CPT), aux concentrations indiquées. La croissance des cellules est présentée 3 jours après dépôt sur boîte.

J'ai contrôlé l'impact des phosphomutants *mre11-3A* et *mre11-4A* sans étiquette HA sur la réponse aux dommages à l'ADN en cycle mitotique (Figure 65). Les mutants ayant été transformés et sélectionnés avec la cassette de résistance à l'hygromycine, j'ai également testé si la présence de la cassette n'altérait pas les fonctions de Mre11. En présence de MMS, les mutations ponctuelles ne semblent pas altérer la croissance cellulaire en contexte *SAE2* WT (Figure 77). En fond génétique *sae2Δ*, les cellules sont fortement sensibles à la présence de MMS (Figure 77). Le phosphomutant *mre11-4A* semble accentuer cette sensibilité, mais la faible différence avec le contrôle *sae2Δ* ne permet pas de conclure clairement (Figure 77). La présence d'hydroxyurée semble également impacter le mutant *mre11-4A*, notamment en contexte *sae2Δ* où le mutant présente une sensibilité à l'HU dès 50mM (Figure 77). En contexte *SAE2* WT, il apparaît une légère sensibilité à 100mM HU pour le mutant *mre11-4A* (Figure 77). Les phosphomutations semblent donc induire une sensibilité aux fortes concentrations d'hydroxyurée, et ce phénotype est aggravé en contexte *sae2Δ*. Enfin, en présence de camptothécine, les phosphomutants ne présentent pas de sensibilité en contexte *SAE2* WT (Figure 77). En contexte *sae2Δ* cependant, la souche *mre11-4A sae2Δ* forme peu de colonies et celles-ci présentent une croissance ralentie (Figure 77). La forme non phosphorylable *mre11-4A* présente donc une sensibilité aux dommages à l'ADN, principalement en contexte *sae2Δ*. Cette sensibilité n'est pas retrouvée chez le mutant *mre11-3A*, il semblerait donc que la phosphorylation du résidu S94 soit suffisante pour la résistance aux dommages à l'ADN. De plus, la sensibilité du phosphomutant *mre11-4A* se révèle notamment en contexte *sae2Δ*. Il y a donc une synergie des deux mutations, et la phosphorylation de Mre11 semble être importante pour répondre à la présence de dommage à l'ADN en absence de Sae2 (*cf.* V – Discussion).

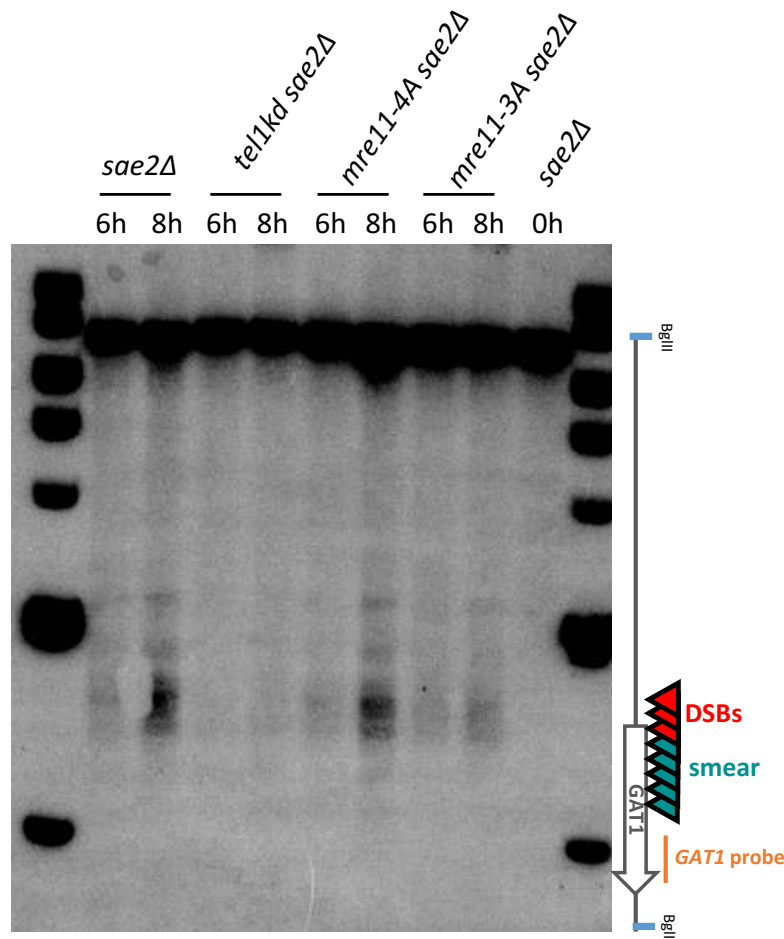


Figure 78 : Formation des DSBs méiotiques au locus *GAT1* en présence de formes non phosphorylable de Mre11

Détection des DSBs formées au locus *GAT1* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1kd*, *sae2Δ mre11-3A* et *sae2Δ mre11-4A*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *GAT1* par Southern blot. L'ADN est digéré par *BglIII* et séparé sur un gel à 1,2% d'agarose.

J'ai poursuivi l'analyse des mutants *mre11-4A* et *mre11-3A* en analysant la formation des DSBs au locus *GAT1* afin de tester si les phosphomutants mimaient le phénotype observé en contexte *tel1kd*. En contexte *sae2Δ*, plusieurs bandes correspondant aux DSBs formées au locus *GAT1* sont détectées (Figure 78). En contexte *tel1kd sae2Δ*, le signal de DSB s'estompe fortement dû à la propagation des DSBs vers le corps du gène *GAT1* (Figure 78). Dans le mutant *mre11-4A sae2Δ*, les DSBs sont détectées et semblent d'intensité similaire à celles observées chez le contrôle *sae2Δ* (Figure 78). De même pour le mutant *mre11-3A sae2Δ*, le signal de DSB est toujours présent et n'est pas estompé comme en contexte *tel1kd* (Figure 78). Cependant, bien que la qualité du Southern blot ne permette pas de conclure clairement sur le phénotype observé, il semble que la mutation des quatre sites SQ/TQ de Mre11 ne reproduise pas le phénotype observé en contexte *tel1kd*. Ce résultat suggère que l'absence de phosphorylation de Mre11 par Tel1 n'est pas la cause de la

dérégulation de la formation des DCs intra-hotspots. Néanmoins, il n'est pas exclu que d'autres sites non-consensus soient phosphorylés par la protéine Tel1, et nous ne pouvons donc pas exclure totalement cette hypothèse. Je reviendrai sur ce point dans la discussion.

4. Déstabilisation de la liaison de Mre11 à l'ADN *via* le mutant *mre11-P110L*

En cycle mitotique, il a été proposé que la sensibilité aux dommages à l'ADN observée dans le mutant *sae2Δ* soit due, en partie au moins, à la persistance du complexe MRX aux sites de cassures (Chen et al., 2015). Le mutant *mre11-P110L* atténue la sensibilité aux dommages à l'ADN d'une souche *sae2Δ* (Chen et al., 2015), et la mutation P110L déstabilise l'interaction de Mre11 avec l'ADN : par CHIP, la protéine mutée Mre11-P110L est moins enrichie au site de cassure HO que la protéine Mre11 sauvage et la rotation, ou « turn-over », des foyers Mre11 radio-induits est accrue (Chen et al., 2015). Il a ainsi été proposé que la mutation P110L promeut la dissociation de la protéine Mre11 de l'ADN, atténuant l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN rad53-dépendente en contexte *sae2Δ*.

Cette étude fait écho à notre hypothèse de départ proposant une stabilisation du complexe MRX en contexte *tel1kd sae2Δ*. Afin d'explorer le rôle de Mre11 et de sa stabilisation sur l'ADN sur la propagation dirigée des DCs intrahotspots observées en contexte *tel1kd*, nous avons testé l'impact du mutant *mre11-P110L* sur le phénotype. La mutation P110L a donc été insérée dans le gène *MRE11*, en transformant le fragment *mre11-P110L-NAT* dans notre souche de référence, et le diploïde triple mutant *mre11-P110L tel1kd sae2Δ* a été généré par croisement. Par Southern blot, j'ai ensuite observé la formation des DSBs au locus *HIS4::LEU2* et comparé les signaux obtenus en fond *tel1kd sae2Δ* et *mre11-P110L tel1kd sae2Δ* (Figure 79). En contexte *mre11-P110L sae2Δ* les DSBs sont formées et le signal semble similaire à celui obtenu en contexte *sae2Δ* (Figure 79). Enfin, dans le triple mutant *mre11-P110L tel1kd sae2Δ*, on observe un « smear » similaire à celui observé en contexte *tel1kd sae2Δ* (Figure 79), signifiant que le mutant *mre11-P110L* n'abolit pas le phénotype *tel1kd*. La déstabilisation de Mre11 à l'ADN ne permet donc pas de prévenir la propagation dirigée des DCs intrahotspots causée par le recrutement de la protéine Tel1kd.

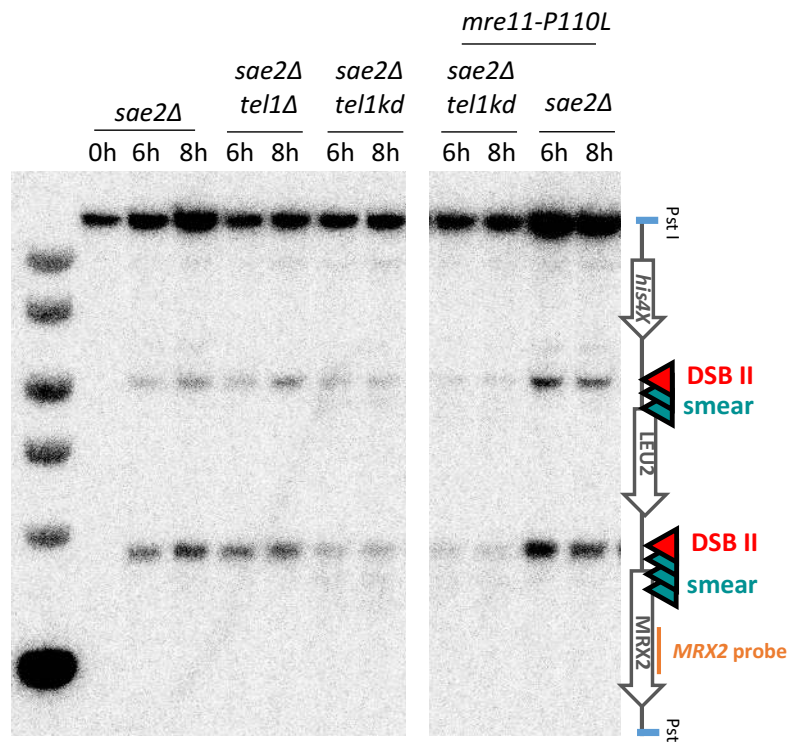


Figure 79 : Formation des DSBs méiotiques au locus *HIS4::LEU2* dans la souche *mre11-P110L sae2Δ*

Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ mre11-P110L* et *sae2Δ tel1kd mre11-P110L*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot. L'ADN est digéré par *Pst*I et séparé sur un gel à 0,7% d'agarose.

Ensemble, nos résultats ne permettent pas de mettre en lien la stabilisation de la protéine Mre11 à l'ADN et le phénotype de propagation des DCs intrahotspots observé en contexte *tel1kd*. Nous avons pu montrer par ChIP que la protéine Mre11 est plus enrichie au hotspot *ARE1* en absence de Tel1 ou de son activité (Figure 75). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de stabilisation plus importante de la protéine en contexte *tel1kd*. Or, le phénotype de propagation des DCs intrahotspots est dépendant du recrutement de la protéine mutée Tel1kd aux sites de cassures (Figure 69A) et est très peu observé en absence de Tel1.

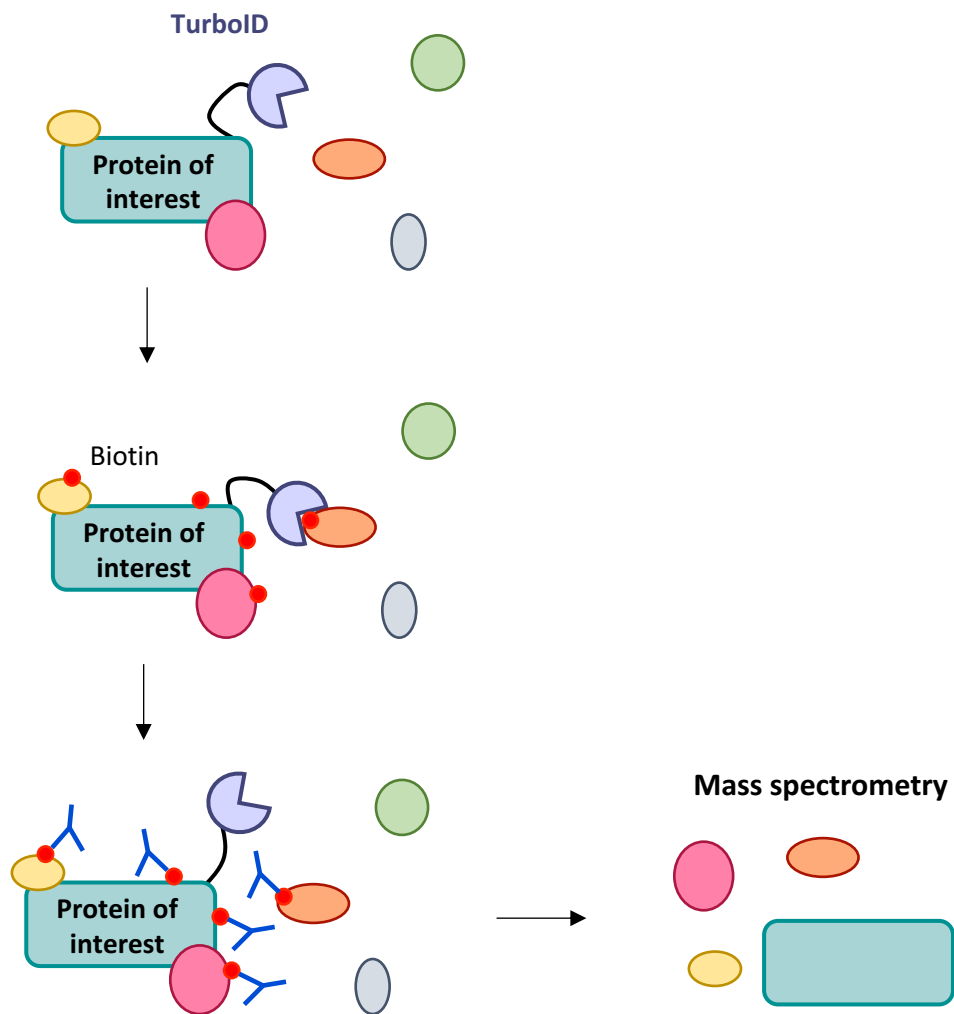


Figure 80 : Technique d'identification de potentiels partenaires de Tel1 par « Turbo-ID »

Schématisation de la technique Turbo-ID utilisée pour identifier des partenaires potentiels de Tel1 en méiose. La biotine ligase TurboID est fusionnée à une protéine d'intérêt, ici Tel1. Après ajout de biotine, la sous-unité peut biotinyler les protéines interagissant avec Tel1 mais également des protéines à proximité qui n'interagissent pas directement avec Tel1. Les protéines biotinylées sont par la suite immunoprécipitées, analysées et identifiées par spectrométrie de masse.

IV. La protéine Fun30 est impliquée dans la dérégulation spatiale des DCs intrahotspots en contexte *tel1kd*

Dans le but d'identifier des partenaires potentiels de Tel1, Rakesh Aithal a réalisé un test de biotinylation dépendant de la proximité *via* la technique du Turbo-ID (Larochelle et al., 2019). Brièvement, cette technique repose sur la fusion de la biotine ligase TurboID à une protéine d'intérêt, Tel1 dans notre cas. En présence de biotine, l'unité TurboID peut ajouter une biotine sur toutes les protéines à proximité physiques de Tel1, que celles-ci interagissent directement avec Tel1 ou non (Figure 80). Par immunoprécipitation, les protéines « biotinylées » sont purifiées et analysées par spectrométrie de masse. Cette technique a permis de mettre en évidence une potentielle interaction entre Tel1 et la protéine Fun30.

La protéine Fun30 est un remodelleur de la chromatine impliquée dans différents processus tels que la réplication de l'ADN, le maintien de l'hétérochromatine, la transcription, etc. (Bantele and Pfander, 2019). De manière intéressante, la surexpression de Fun30 ou de SMARCAD1, son homologue chez les mammifères, mène à une instabilité génomique (Al Kubaisy et al., 2016; Ouspenski et al., 1999; Ubersax et al., 2003), suggérant que la régulation de leurs activités est un point important pour maintenir la stabilité du génome. Il a été montré que Fun30 facilite la résection de l'ADN aux sites de cassures HO en cycle mitotique (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012), notamment la résection longue distance en promouvant l'activité des protéines Exo1 et Sgs1, responsables de cette étape (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012). Cependant, il semblerait que la promotion de la résection ne soit pas due à l'activité de remodelage de la chromatine de Fun30 puisque les nucléosomes ne montrent pas de changement de position autour de la cassure (Costelloe et al., 2012) bien qu'elle soit dépendante de l'activité ATPase de Fun30 (Bantele et al., 2017). Fun30 semble favoriser la résection en limitant le recrutement de la protéine Rad9, un inhibiteur de la résection (Chen et al., 2012). Une interaction entre Tel1 et Fun30 avait déjà été mise en évidence en cycle végétatif par spectrométrie de masse lors d'une analyse des complexes protéiques (Gavin et al., 2002), mais aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée sur cette interaction. En revanche, SMARCAD1, l'homologue de Fun30 chez les mammifères, est connue pour être phosphorylée par ATM en réponse aux dommages à l'ADN et cette phosphorylation est requise pour l'étape de résection des DSBs (Chakraborty et al., 2018).

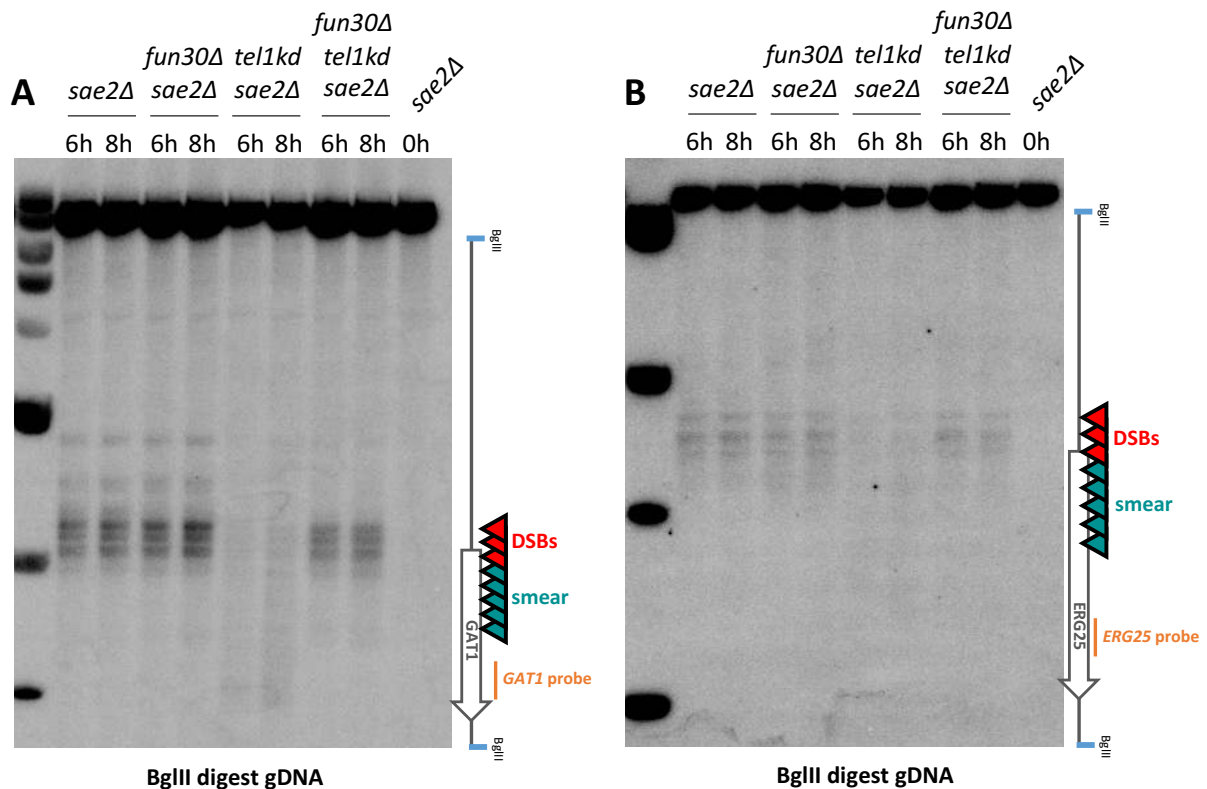


Figure 81 : Le phénotype *tel1kd* est aboli en absence de Fun30

(A) Détection des DSBs formées au locus *GAT1* dans les souches *sae2Δ fun30Δ* et *sae2Δ fun30Δ tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *GAT1* par Southern blot. L'ADN est digéré par BgIII et séparé sur un gel à 1,2% d'agarose.

(B) Détection des DSBs formées au locus *ERG25* dans les souches *sae2Δ fun30Δ* et *sae2Δ fun30Δ tel1kd*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *ERG25* par Southern blot. L'ADN est digéré par BgIII et séparé sur un gel à 1,2% d'agarose.

En méiose, Fun30 n'a jusqu'alors pas été étudiée. Chez *S. pombe*, il a cependant été suggéré que des remodeleurs de la chromatine, dont Fft3 (l'homologue de Fun30), jouent un rôle sur l'activité des hotspots méiotiques et la recombinaison méiotique (Storey et al., 2018). Puisque nous avons mis en évidence une interaction entre Tel1 et Fun30 en méiose, nous avons cherché à déterminer si la protéine participait au contrôle de la formation des DSBs méiotiques. De manière intéressante, l'absence de Fun30 affecte la position des nucléosomes au sein des promoteurs de gènes (Byeon et al., 2013). Notamment, l'absence de Fun30 augmente la taille de la région appauvrie en nucléosomes en 5' des gènes, et la position des nucléosomes -1, +2 et +3 est modifiée en contexte *fun30Δ* (Byeon et al., 2013). Ces éléments nous ont amenés à interroger le rôle de Fun30 dans la formation des DCs intra-hotspots et plus particulièrement dans le phénotype observé en *tel1kd*.

Pour étudier le rôle de Fun30 dans la régulation des DCs intrahotspots, nous avons observé par Southern blot la formation des DSBs à différents locus en contexte *tel1kd* (Figure 81). En contexte *fun30Δ sae2Δ*, les DSBs sont détectées aux locus *GAT1* (Figure 81A) et *ERG25* (Figure 81B) de la même manière qu'en contexte *sae2Δ*. Chez le mutant *tel1kd sae2Δ*, le signal de DSBs s'estompe et une trainée d'ADN apparaît, correspondant à la formation de multiples cassures dans la région 5' de *GAT1* et *ERG25* (Figure 81A, Figure 81B). En revanche, dans le triple mutant *fun30Δ tel1kd sae2Δ*, le signal est similaire à celui observé en contexte *sae2Δ* et *sae2Δ fun30Δ* (Figure 81A, Figure 81B). Il apparaît ainsi que l'absence de Fun30 contrecarre la dérégulation des DCs intrahotspots induite par le contexte *tel1kd*. Ces résultats montrent que la protéine Fun30 participe à la dérégulation des DCs intrahotspots en contexte *tel1kd*.

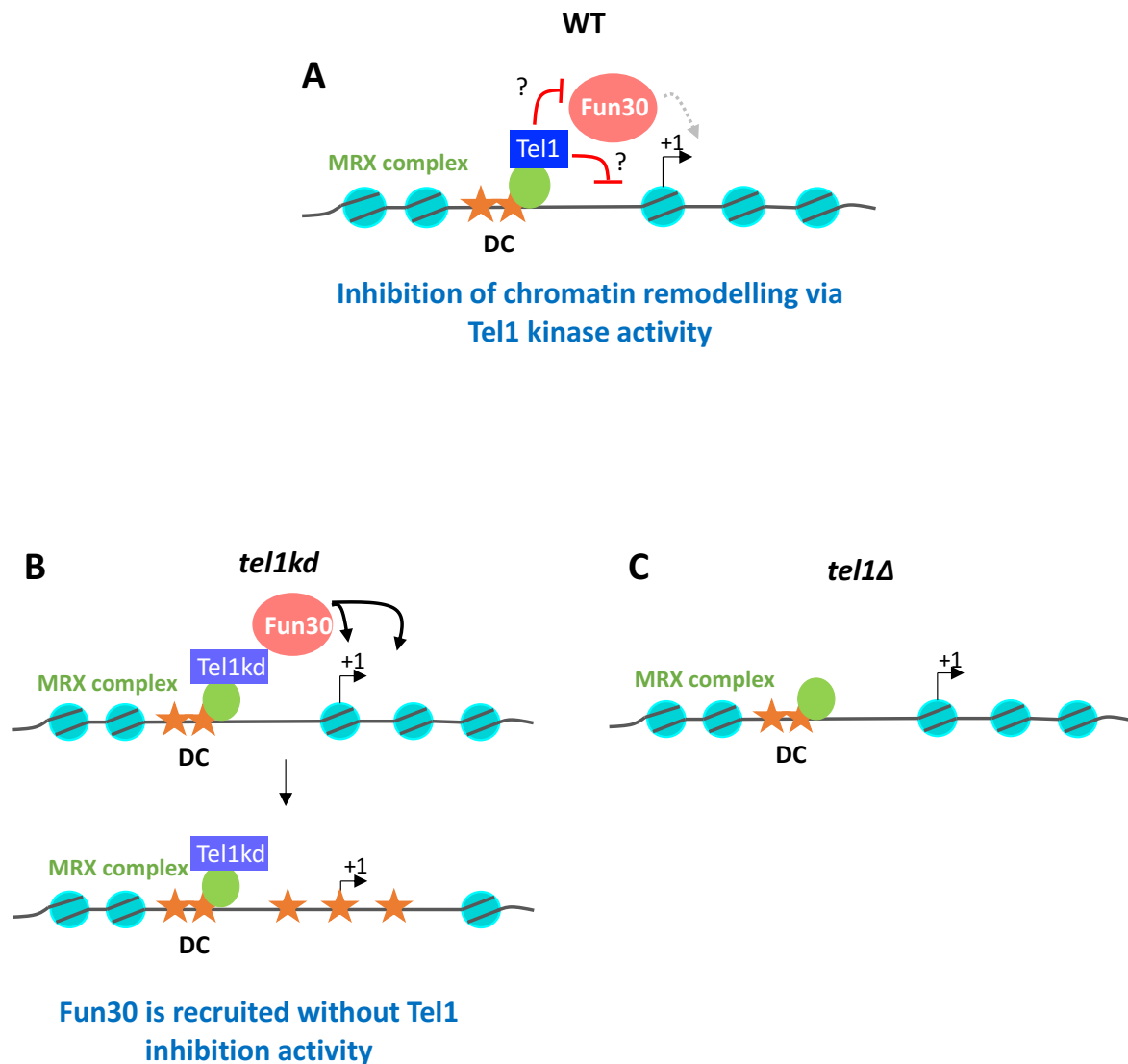
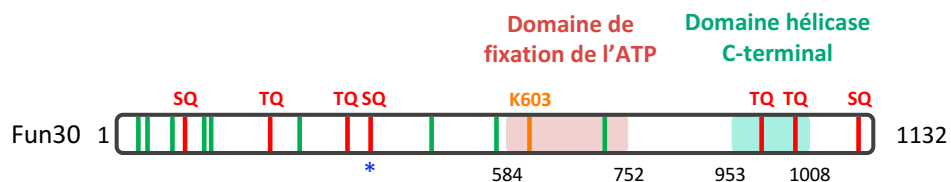


Figure 82 : Modèle de régulation de l'activité de remodelage de la chromatine de Fun30 via l'activité kinase de Tel1

- (A)** En réponse à la formation de DSBs, la protéine Tel1 est recrutée au site de cassures *via* la protéine Xrs2. Notre modèle propose que la protéine Fun30 soit également recrutée aux sites de cassures, et que son activité soit régulée par l'activité kinase de Tel1.
- (B)** En présence de Tel1 dépourvue d'activité kinase, la protéine mutée est également recrutée aux sites de cassures, et pourrait entraîner également le recrutement de Fun30. En absence d'activité kinase de Tel1, l'activité de Fun30 ne serait pas régulée, ce qui pourrait engendrer un remodelage de la chromatine localement. Ce remodelage pourrait agrandir la région appauvrie en nucléosome et ainsi rendre l'ADN accessible à Spo11.
- (C)** En absence de Tel1, la protéine Fun30 n'est pas recrutée aux sites de cassure et n'induit donc pas de remodelage de la chromatine.

Ces résultats nous ont amenés à proposer un modèle expliquant le rôle de Fun30 et Tel1 dans la régulation des DSBs intra-hotspots (Figure 82). Tout d’abord, les résultats acquis suggèrent que la protéine Fun30 est présente aux sites de cassures méiotiques, certainement recrutée par la protéine Tel1 (Figure 82A), ce qui reste à être démontré. Dans ce contexte, nous proposons que l’activité kinase de Tel1 soit requise pour réguler l’activité de Fun30 aux sites de DSBs en phosphorylant directement Fun30 ou en limitant l’accès à la chromatine de Fun30 *via* la phosphorylation de H2A (Figure 82A). En effet, il a été montré *in vitro* que la phosphorylation du résidu S126 de H2A limite la liaison de Fun30 à la chromatine et favorise la liaison de Rad9 (Bonetti et al., 2018). Ainsi, en contexte *tel1kd*, Fun30 serait toujours recrutée aux hotspots de cassures mais son activité ne serait pas inhibée par l’activité kinase de Tel1, et favoriserait la formation de DSBs potentiellement en élargissant les régions appauvries en nucléosome (Figure 82B). Il est également possible que l’activité kinase de Tel1 agisse sur des composants de la machinerie de formation des DSBs directement et non pas sur l’activité de Fun30. *In fine*, Fun30 pourrait participer à l’ouverture de la chromatine, ce qui augmenterait l’opportunité de formation de DSBs pour Spo11 (Figure 82A). En contexte *tel1Δ*, Fun30 n’est pas activement recrutée aux hotspots de cassures, et la chromatine n’est pas remodelée, limitant la propagation des DCs intrahotspots (Figure 82C).



- * Site de phosphorylation confirmé (Albuquerque *et al.*, 2008)
- Motif SQ/TQ ciblé par Tel1 – Mec1
- Motif SP/TP ciblé par les complexes Cdk – Cycline
- Activité ATPase

Figure 83 : Schématisation de la protéine Fun30

Représentation schématique de la protéine Fun30 et des principaux domaines identifiés. L’activité de la protéine repose sur le domaine de fixation de l’ATP qui contient le résidu K603 essentiel à l’activité de remodelage de la protéine. Le domaine hélicase en C-terminal assure l’ouverture de la chromatine. Les motifs de phosphorylation SQ/TQ ciblés par Tel1 – Mec1 sont représentés en rouge. Les motifs de phosphorylation SP/TP ciblés par les complexes Cdk – cycline sont représentés en vert. Le * représente un résidu identifié pour être phosphorylé par Tel1 – Mec1 (Albuquerque *et al.*, 2008).

A

		S86Q	T228Q	T358Q	S383Q	T976Q	T1000Q	S1103Q
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fun30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Saccharomyces arboricola</i>	Fun30p	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Fun30p	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Candida glabrata</i>	AO440_002156	✓	✗	✗	✓	✓	✓	✗
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ZBIST_1515	✗	✓	✗	✗	✓	✓	✗
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	fft3	✗	✗	✗	✗	✓	✓	✗
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ETL1	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗
<i>Drosophila melanogaster</i>	Etl1	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
<i>Danio rerio</i>	Smarcad1a	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✗
<i>Mus musculus</i>	Smarcad1	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗
<i>Homo sapiens</i>	SMARCAD1	✗	✗	✗	✗	✗	✓	✗

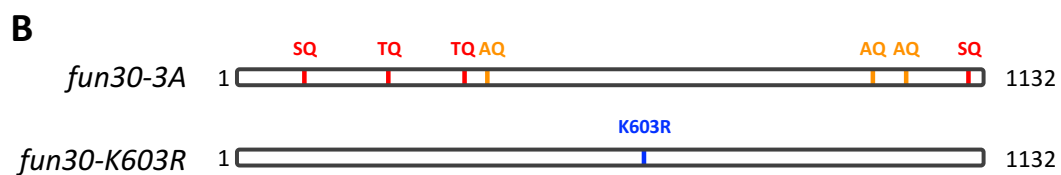


Figure 84 : Conservation des motifs SQ/TQ entre Fun30 et ses orthologues

(A) Tableau de conservation des motifs SQ/TQ de Fun30 chez *S. cerevisiae* à SMARCAD1 chez *H. sapiens*. Dans ce tableau figure plusieurs membres du genre *Saccharomyces* (*S. arboricola*, *S. boulardii*), de la famille des *Saccharomycetaceae* (*C. glabrata*, *Z. bailii*) et plusieurs organismes modèles (*S. pombe*, *A. thaliana*, *D. melanogaster*, *D. rerio*, *M. musculus* et *H. sapiens*).

(B) Schématisation des mutants de Fun30 générés. Dans le mutant *fun30-3A*, les motifs S383Q, T976Q et T1000Q ont été mutés en remplaçant les sérines et thréonines par des alanines. La phosphorylation du motif S383Q a été confirmée par spectrométrie de masse. Les motifs T976Q et T1000Q sont quant à eux les motifs les mieux conservés au travers de l'évolution. Le mutant *fun30-K603R* est un mutant le résidu essentiel à la fixation de l'ATP est substitué par une arginine, abolissant ainsi l'activité de remodelage de la chromatine de Fun30.

Afin d'appréhender le rôle de Fun30 aux hotspots de cassures, nous avons cherché d'une part si la propagation des DCs observée était dépendante de l'activité ATPase de Fun30. Pour ce faire nous avons généré le mutant *fun30-K603R* dont l'activité ATPase est abolie (Costelloe et al., 2012). D'autre part nous avons voulu déterminer si Fun30 était directement phosphorylée par Tel1. La protéine Fun30 contient 7 motifs SQ/TQ potentiellement ciblés par Tel1 (Figure 83), dont j'ai évalué la conservation de la levure à l'humain (Figure 84A). Les 7 motifs SQ/TQ semblent conservés au sein du genre *Saccharomyces* mais la plupart des sites ne sont pas conservés au sein de la famille des *Saccharomycetaceae* : seuls les résidus T976 et T1000 sont conservés (Figure 84A). En comparant la séquence protéique de Fun30 avec celle de ses homologues chez les principaux organismes modèles, il apparaît que le résidu T1000 est fortement conservé, excepté chez *Drosophila melanogaster* et *Danio rerio* (Figure 84A). De manière intéressante, les sites T976 et T1000 sont localisés dans le domaine hélicase de Fun30 (Figure 83). Au vu de la conservation et de la localisation de ces deux résidus, j'ai décidé de générer des formes non phosphorylables de ceux-ci en les substituant par des alanines. De plus, parmi les 7 sites identifiés chez *S. cerevisiae*, la phosphorylation du résidu S383 a été confirmée par spectrométrie de masse (Albuquerque et al., 2008). Par la technique du CRIPR-Cas9, j'ai substitué les résidus S383, T976 et T1000 par des alanines et ainsi généré le mutant *fun30-3A* (Figure 84B). Ces mutants seront testés par la suite et permettront de mieux comprendre l'interaction qu'il existe entre Tel1 et Fun30, le mode de régulation de Fun30 aux DSBs méiotiques, et le rôle de cette dernière dans la maturation des DSBs méiotiques.

V. Discussion

1. Stabilisation et éviction de la protéine Mre11 de l'ADN

Afin d'appréhender la régulation spatiale des DCs intrahotspots, nous avons cherché à étudier l'association de Mre11 à l'ADN par différentes approches. Nous souhaitons notamment déterminer si la stabilisation de Mre11 à l'ADN, ainsi que son éviction de l'ADN, étaient dépendantes de Tel1 et de son activité kinase. D'une part, par ChIP, j'ai montré un enrichissement plus important de Mre11 aux hotspots de cassures en absence de Tel1 ou de son activité kinase (Figure 75). Cependant, cet enrichissement n'est pas plus important en contexte *tel1kd* qu'en contexte *tel1Δ* dans un fond génétique *sae2Δ*, et il sera intéressant d'optimiser le ChIP de Mre11 en contexte *SAE2* WT afin de détecter une potentielle différence. Toutefois, nos résultats actuels de ChIP ne permettent pas de conclure à une stabilisation de Mre11 aux sites de cassures uniquement dépendante de l'activité kinase de Mre11. L'augmentation d'enrichissement de Mre11 aux sites de cassures en contexte *tel1Δ* et *tel1kd* peut également résulter d'une augmentation du niveau de DSBs dans ces fonds génétiques. Enfin, il est important de noter que l'efficacité d'immunoprécipitation de l'anticorps commercial anti-Mre11 n'est pas optimale (Figure 74), ce qui peut altérer les résultats obtenus par ChIP.

D'autre part, nous avons cherché à stabiliser ou déstabiliser Mre11 à l'ADN *via* différents mutants. Afin de mimer l'absence de phosphorylation par Tel1 et potentiellement augmenter la stabilisation de Mre11 à l'ADN, nous avons travaillé sur une forme non phosphorylable de Mre11 dont les 4 motifs SQ/TQ ont été substitués par AQ. Ce mutant n'a cependant pas montré de dérégulation des DCs intrahotspots similaire à ce qui est observé en contexte *tel1kd*, suggérant qu'une phosphorylation de Mre11 par Tel1 sur ces sites ne participe pas à réguler spatialement la formation des DCs intrahotspots. Cependant, il est possible que Mre11 soit phosphorylée sur des motifs non-consensus par Tel1. En effet, il a été montré que la mutation des sites SQ/TQ de la protéine Xrs2 n'est pas suffisante pour abolir la phosphorylation dépendante de Tel1 et Mec1 et que des sites non-consensus sont également phosphorylés (Simoneau et al., 2014). Afin de s'assurer que la phosphorylation dépendante de Tel1 est abolie dans le mutant *mre11-4A*, il serait intéressant de contrôler par Western blot l'état de phosphorylation de la protéine. De plus, l'identification de sites de phosphorylation (consensus ou non) *in vivo* pourrait être réalisée par une spectrométrie de masse de Mre11, purifiée au cours de la méiose. Enfin, pour appréhender la stabilité du mutant *mre11-4A* à l'ADN, il aurait été

intéressant d'étudier l'enrichissement aux sites de cassure du phosphomutant par CHIP. En parallèle, nous avons également cherché à déstabiliser Mre11 de l'ADN en utilisant le mutant *mre11-P110L*, décrit par Chen *et al.* Celui-ci n'a cependant pas permis d'abolir la propagation des DCs observées en contexte *tel1kd*, appuyant notre conclusion que la stabilisation et/ou l'éviction de Mre11 de l'ADN ne participent pas à réguler spatialement les DCs intrahotspots.

Ensemble nos résultats tendent à montrer que la propagation dirigée des DCs intrahotspots causée par *Tel1kd* n'est pas due à une stabilisation de la protéine aux sites de cassures. Néanmoins, l'augmentation de l'enrichissement de Mre11 aux hotspots en absence de *Tel1* ou de son activité kinase suggère un rôle de *Tel1* *via* son activité kinase dans le recrutement et/ou la stabilisation de la protéine à l'ADN, bien qu'on ne puisse exclure que ce phénomène soit dû à l'augmentation du niveau de DSBs dans ces fonds génétiques.

2. La phosphorylation de Mre11 participe à la résistance aux dommages à l'ADN

Bien que le phosphomutant *mre11-4A* n'ait pas montré d'effet notable sur la formation des DSBs méiotiques, nous avons mis en évidence une sensibilité importante de ce mutant à la camptothécine en contexte *sae2Δ* (Figure 77). Il a été montré que Mre11 est phosphorylée en réponse aux dommages de l'ADN, principalement par *Tel1* (D'Amours and Jackson, 2001). De plus, la phosphorylation de Mre11 semble être dépendante de l'activité nucléase de la protéine, et il a été proposé qu'elle puisse survenir dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle négatif de l'activité de Mre11 ou *Tel1* aux sites de cassures (D'Amours and Jackson, 2001). Les auteurs proposent notamment que la phosphorylation de Mre11 puisse modifier ses propriétés biochimiques et ainsi réguler l'activité du complexe MRX (D'Amours and Jackson, 2001). De manière intéressante, nous n'avons pas observé de sensibilité aux dommages à l'ADN dans le mutant *mre11-3A*, suggérant que le résidu S94 est important pour la réponse aux dommages à l'ADN. Ce résidu est localisé dans le domaine nucléase de la protéine Mre11 (Figure 76), il est donc possible que la mutation altère l'activité nucléase de MRE11, ou que sa phosphorylation soit requise pour l'activité nucléase de la protéine et donc dans la voie de réponses aux dommages à l'ADN, suggérant un lien entre l'activité nucléase de Mre11 et la phosphorylation de la protéine par *Tel1*. Les causes de l'hypersensibilité du mutant *mre11-4A sae2Δ* sont à l'heure actuelle inconnues, et celle-ci pourrait refléter la perte d'un checkpoint, une dérégulation de la protéine ou être due à une stabilisation de Mre11 sur l'ADN.

3. Rôle de Fun30 en méiose

Nos résultats ont permis de mettre en évidence un rôle de Fun30 aux DSBs méiotiques, et notamment que sa présence participe à la dérégulation spatiale des DCs intrahotspots en contexte *tel1kd*. Ceux-ci nous ont amenés à proposer que Fun30 soit activement recrutée par Tel1 aux DSBs méiotiques. Par conséquent il sera important d'étudier le recrutement de Fun30 aux DSBs méiotiques et le rôle de Tel1 dans ce recrutement. Nos résultats suggèrent que l'activité de remodelage de la chromatine de Fun30 favorise la formation de multiples DSBs tandis que l'activité kinase de Tel1 limite leur formation. L'activité de remodelage de Fun30 est connue pour agrandir les régions appauvries en nucléosomes au niveau des promoteurs en altérant la position des nucléosomes -1, +2 et +3 en cycle végétatif (Byeon et al., 2013). Aux DSBs méiotiques, il est possible que Fun30 ait la même activité et participe à agrandir les régions appauvries en nucléosomes, ce qui donnerait plus d'opportunité à Spo11 pour générer des DSBs. Dans ce contexte, l'activité kinase de Tel1 permettrait de limiter la formation de DSBs par Spo11. La protéine Tel1 pourrait directement phosphoryler Fun30 pour limiter son activité de remodelage de la chromatine, et ainsi limiter la formation de DSBs, et c'est ce que nous nous proposons de tester en générant un phosphomutant de la protéine. De plus, il a été montré que la phosphorylation de H2A en réponse aux dommages à l'ADN limite la liaison de Fun30 à la chromatine (Eapen et al., 2012). L'activité de Fun30 aux DSBs méiotiques pourrait donc également être limitée par la phosphorylation de H2A médiée par Tel1. Enfin, en observant la propagation des DCs générées en contexte *tel1kd*, il apparaît que celles-ci peuvent être formées jusqu'à 800 nucléotides du site de cassures initial (données non publiées). De manière intéressante, la résection longue distance s'effectue également sur 800 nucléotides (Zakharyevich et al., 2010) et il a été montré en cycle végétatif que l'activité de remodelage de la chromatine de Fun30 est importante pour la résection longue distance (Chen et al., 2012; Costelloe et al., 2012). Ces éléments suggèrent que le recrutement de Fun30 aux DSBs méiotiques pourrait participer au remodelage de la chromatine, tandis qu'en parallèle l'activité kinase de Tel1 inhiberait la machinerie de formation de DSBs.

Pour répondre à ces questions, il sera intéressant de s'intéresser aux rôles de Fun30 aux DSBs méiotiques, et de déterminer si celle-ci promeut la maturation des DSBs comme en cycle végétatif. De manière intéressante, il a récemment été démontré *in vitro* que l'activité de Tel1 dépendait de la présence de grandes régions appauvries en nucléosomes (Hailemariam et al., 2019a), et le remodelage de la chromatine de Fun30 aux DSBs méiotiques pourrait donc participer à l'activation de Tel1 en méiose.

De plus, il a été proposé chez *S. pombe* que les remodeleurs de la chromatine, dont Fft3 l'orthologue de Fun30, participent à la spécification des sites de recombinaison méiotiques (Storey et al., 2018), et un rôle similaire de Fun30 chez *S. cerevisiae* pourrait être envisagé.

Enfin, l'abolition du phénotype de propagation dirigée des DSBs en absence de Fun30 permettrait de mesurer l'interférence entre deux hotspots dans un contexte *tel1kd* et de déterminer si celle-ci dépend de l'activité kinase de Tel1. En effet, la mesure de l'interférence en contexte *tel1kd* est rendue difficile par la présence de multiples DCs intrahotspots, et les premières mesures n'ont montré qu'une perte partielle de l'interférence en présence de la protéine Tel1 mutée (données non publiées). L'utilisation du mutant *fun30Δ* permettra ainsi de mesurer plus précisément le niveau de DSBs et la génération de DCs entre hotspots en contexte *tel1kd* et ainsi déterminer le rôle de l'activité kinase de Tel1 dans la mise en place de l'interférence.

CONCLUSION

La reproduction sexuée repose sur la génération de gamètes haploïdes, produits par la méiose. Le programme méiotique permet la ségrégation des chromosomes homologues *via* la génération de crossovers par le mécanisme de recombinaison homologue. La génération de crossovers est un élément clé du processus méiotique qui assure la stabilité du génome et promeut dans le même temps la diversité génétique entre les individus, et leur formation repose sur l'introduction de cassures double-brin de l'ADN (*cf.* Chapitre I). Chez *S. cerevisiae*, plusieurs centaines de cassures double-brin sont générées au cours de la méiose, afin d'aboutir à au moins un crossover par paire de chromosomes homologues. Néanmoins, la présence de cassures double-brin représentant un danger pour l'intégrité du génome, la régulation fine de leur formation représente un défi important pour la cellule.

Différents mécanismes de régulation de la formation des DSBs permettent notamment de contrôler le nombre de cassures formées ainsi que de réguler spatialement leur formation, assurant la répartition des DSBs sur le génome (*cf.* Chapitre II). Au laboratoire, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au mécanisme d'interférence entre cassures double-brin méiotiques, qui participe à la régulation spatiale de leur formation en limitant la génération de cassures à proximité les unes des autres (Garcia et al., 2015). Ce mécanisme est dépendant de la protéine kinase Tel1, et son absence conduit à l'apparition de doubles cassures en *cis* (Figure 24) (Garcia et al., 2015). Le mode d'action de Tel1 dans le cadre de l'interférence est cependant méconnu à ce jour. Au cours de ma thèse j'ai cherché à étudier le recrutement de la protéine Tel1 sur le génome, et plus particulièrement à déterminer si la mise en place de l'interférence était dépendante du recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures.

En outre, des travaux récents du laboratoire ont montré l'existence de doubles cassures générées de manière physiologique au sein des hotspots de cassures (Johnson et al., 2021; Prieler et al., 2021). Des travaux non publiés ont quant à eux montré que la régulation spatiale de ces DCs intrahotspots dépend de l'activité kinase de la protéine Tel1. Afin d'appréhender ce mécanisme de contrôle, nous avons cherché à déterminer les facteurs participant à la régulation des DCs intrahotspots.

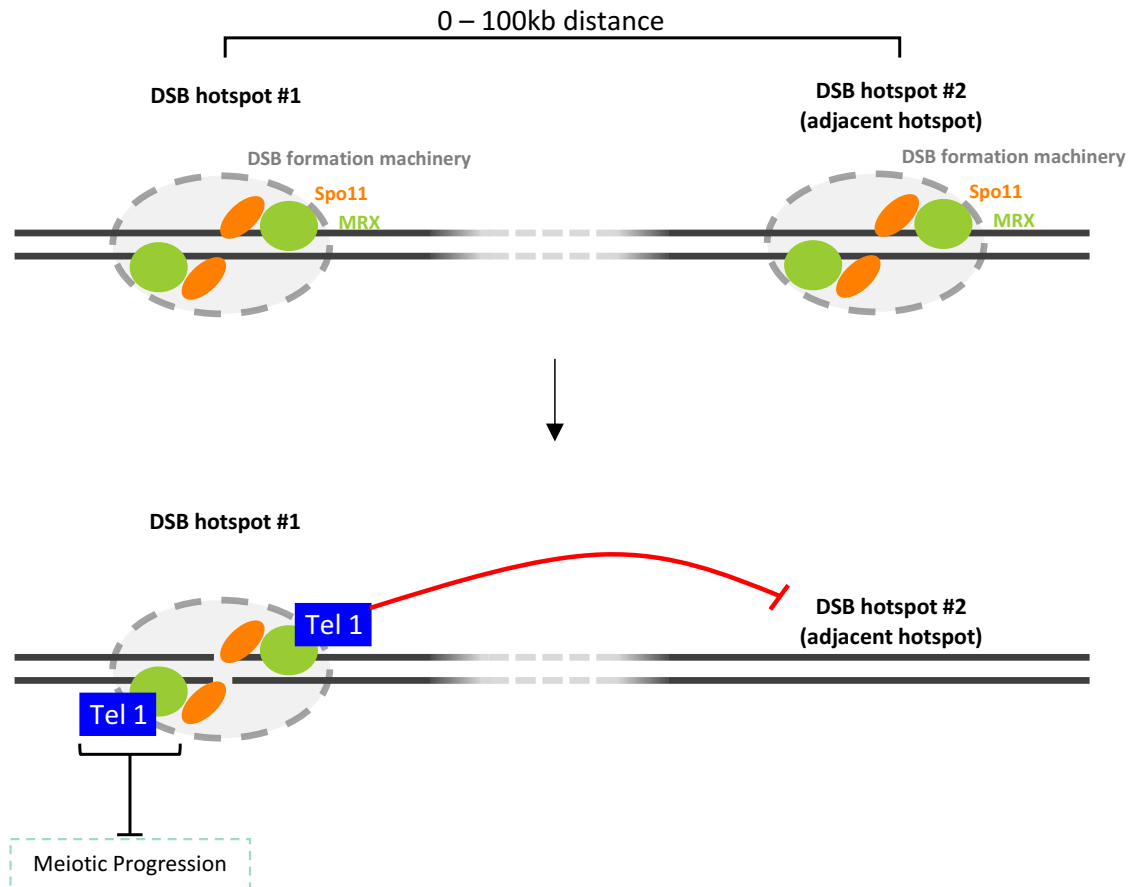


Figure 85 : Recrutement de Tel1 aux sites de cassures et mise en place de l'interférence

La génération des DSBs méiotiques sur le génome s'opère au sein de points chauds de cassures (« hotspots »). Celles-ci sont catalysées par Spo11 au sein d'une machinerie de formation de cassures. Mes travaux ont montré que lors de la génération d'une DSB, la protéine Tel1 est recrutée au site de cassure *via* le domaine carboxy-terminal de Xrs2. De plus, ce recrutement est apparu essentiel à la mise en place de l'interférence entre DSBs. Ce mécanisme de régulation spatiale des DSBs, médié par Tel1, inhibe la génération de DSBs sur des hotspots adjacents, et ce jusqu'à 100kb du premier site de cassure. Mes résultats ont également montré que l'interaction de Tel1 et Xrs2 est requise pour la mise en place du checkpoint TM qui s'active en présence de DSBs non maturées.

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que la protéine Tel1 est recrutée aux sites de cassures méiotiques *via* le domaine carboxy-terminal de Xrs2, à l'image de son recrutement au site HO en cycle végétatif. De plus, j'ai pu démontrer que le domaine carboxy-terminal de Xrs2 est essentiel à la mise en place de l'interférence. Ces résultats nous ont amenés à proposer la mise en place de l'interférence entre cassures double-brin méiotiques repose sur le recrutement de Tel1 aux sites de cassures *via* le domaine carboxy-terminal de Xrs2 (Figure 85). Le complexe MRX étant requis pour la formation des DSBs, nous avons émis l'hypothèse que Tel1 puisse être recrutée en amont de la formation de cassures, et que l'interférence soit mise en place et préétablit le paysage de DSBs. Cependant, mes résultats ont démontré que Tel1 est recruté en réponse à la formation des cassures. L'interférence n'est donc pas mise en place en amont de la formation des DSBs, mais en réponse à leur génération. Le paysage de DSBs au sein de chaque cellule semble donc se mettre en place au fur et à mesure que les cassures sont générées. Mes travaux ont également montré que l'interaction entre Tel1 et Xrs2 est requise pour la mise en place du checkpoint méiotique dépendant de Tel1 et Mre11.

L'analyse globale du recrutement de la protéine Tel1 a permis de mettre en évidence un enrichissement de la protéine aux hotspots de cassures sur l'ensemble du génome, proportionnel à la force des coupures, ainsi qu'aux sites de l'axe. Cependant, Tel1 n'est pas directement recrutée aux sites de l'axe, puisque cet enrichissement est dépendant de la formation des DSBs. La protéine Tel1 semble donc être mise en contact avec l'axe *via* son recrutement aux hotspots et la liaison de la boucle d'ADN à l'axe qui s'opère lors de la formation des DSBs (Figure 86). De manière intéressante, Tel1 est connue pour phosphoryler la protéine Hop1, un composant de l'axe, et Rec114, qui fait partie de la machinerie de formation de cassures (Carballo et al., 2008, 2013). Il sera donc intéressant de déterminer si la phosphorylation de ces protéines est dépendante du recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures. De plus, la phosphorylation de Hop1 et Rec114 par Tel1 participe au contrôle de la formation des DSBs et il serait intéressant de déterminer si leur phosphorylation participe à la mise en place de l'interférence. Les phosphomutants individuels de Hop1 et Rec114 ne montrent pas de perte d'interférence (Garcia et al., 2015). Néanmoins, Hop1 et Rec114 ne semblent pas participer aux mêmes voies de contrôle de la formation des DSBs, et l'absence d'une seule de ces voies ne permet peut-être pas d'abolir l'interférence entre cassure double-brin. Il sera donc intéressant de mesurer l'interférence dans un double mutant *hop1-SCD rec114-8A*.

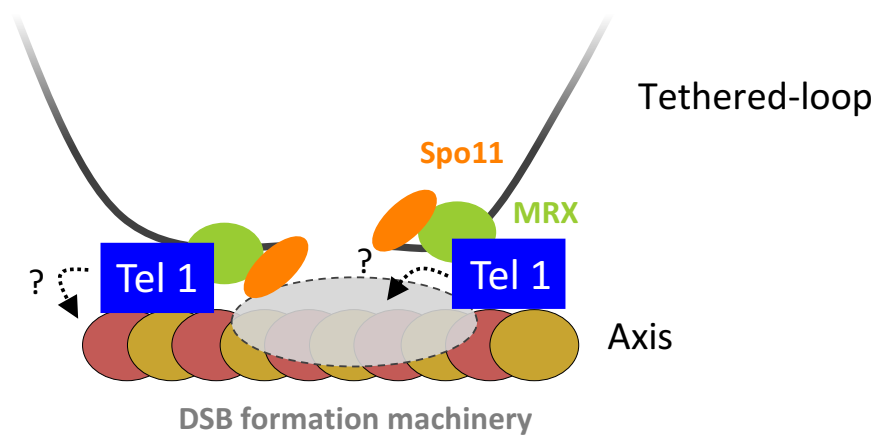


Figure 86 : Tel1 est retrouvée à proximité de l'axe

L'étude du recrutement de Tel1 a permis de mettre en évidence un enrichissement de la protéine aux sites de l'axe. Ce recrutement est dépendant de la formation des DSBs. Nos résultats suggèrent que Tel1 est recrutée aux sites de cassures et que le processus de liaison de la boucle d'ADN à l'axe, *via* Spp1 – Mer2, amène Tel1 à proximité de l'axe. Le rôle de Tel1 à l'axe n'est à ce jour pas complètement compris, et ce mode de recrutement pourrait médier à la phosphorylation de Rec114 ou Hop1 qui est dépendante de Tel1.

Afin d'appréhender le mécanisme d'interférence entre cassures double-brin méiotiques, j'ai exploré différentes pistes et testé l'effet de différents candidats, mais ceux-ci ne se sont pas révélés impliqués dans ce processus. Le mécanisme régissant l'interférence reste donc non élucidé à ce jour. Pour progresser dans la compréhension de ce mécanisme, il serait nécessaire de mettre en place une stratégie de criblage génétique qui permettrait de révéler des facteurs potentiellement impliqués dans ce processus.

J'ai également étudié le recrutement de la protéine Mre11 aux hotspots de cassures et à l'axe. Mre11 est recrutée aux sites de cassures, et ce indépendamment de leur formation. Cependant, l'enrichissement de Mre11 aux hotspots en contexte *spo11-Y135F* est fortement réduit, suggérant qu'il existe deux vagues de recrutement de Mre11 : une première vague, en amont de la formation des cassures qui participe à la génération des DSBs, et une seconde en réponse à la formation des DSBs qui participerait à la maturation et la réparation de celles-ci. De plus, il est apparu qu'en absence de Tel1 ou de son activité kinase (*tel1Δ* ou *tel1kd*) l'enrichissement de Mre11 aux sites de cassures est augmenté, suggérant que l'activité de Tel1 participe à l'éviction de Mre11 de l'ADN bien que cette augmentation puisse également résulter d'un niveau de DSBs plus élevé dans ces mutants. D'autre part, nous n'avons pas détecté d'enrichissement de Mre11 à l'axe. Or, Mre11 est essentielle à la formation des DSBs, et les complexes Spo11 et RMM, également essentiels à ce processus, se localisent à l'axe. L'absence de Mre11 à l'axe est donc inattendue, et il serait intéressant d'étudier plus en détail le rôle de Mre11 dans la génération des DSBs en comparant notamment son recrutement à l'échelle du génome avec celui des autres protéines de la machinerie de formation de cassure.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence que la dérégulation des DCs intrahotspots est causée par le recrutement de la protéine mutée Tel1kd par Xrs2 aux sites de cassures. Il est également apparu que la protéine Fun30, un remodeleur de la chromatine, participe à la dérégulation des DCs intrahotspots en contexte *tel1kd*. Ainsi, nous avons proposé que la relaxation de la chromatine induite par Fun30 favorise la formation de DSBs dans les ORFs adjacents, tandis que l'activité kinase de Tel1 est requise pour limiter leur formation, en agissant directement sur Fun30 ou sur des éléments de la machinerie de formation de DSBs (Figure 87). De plus, ces résultats ont permis de mettre en lumière un rôle de Fun30 aux DSBs méiotiques, qui reste pour l'heure inconnu.

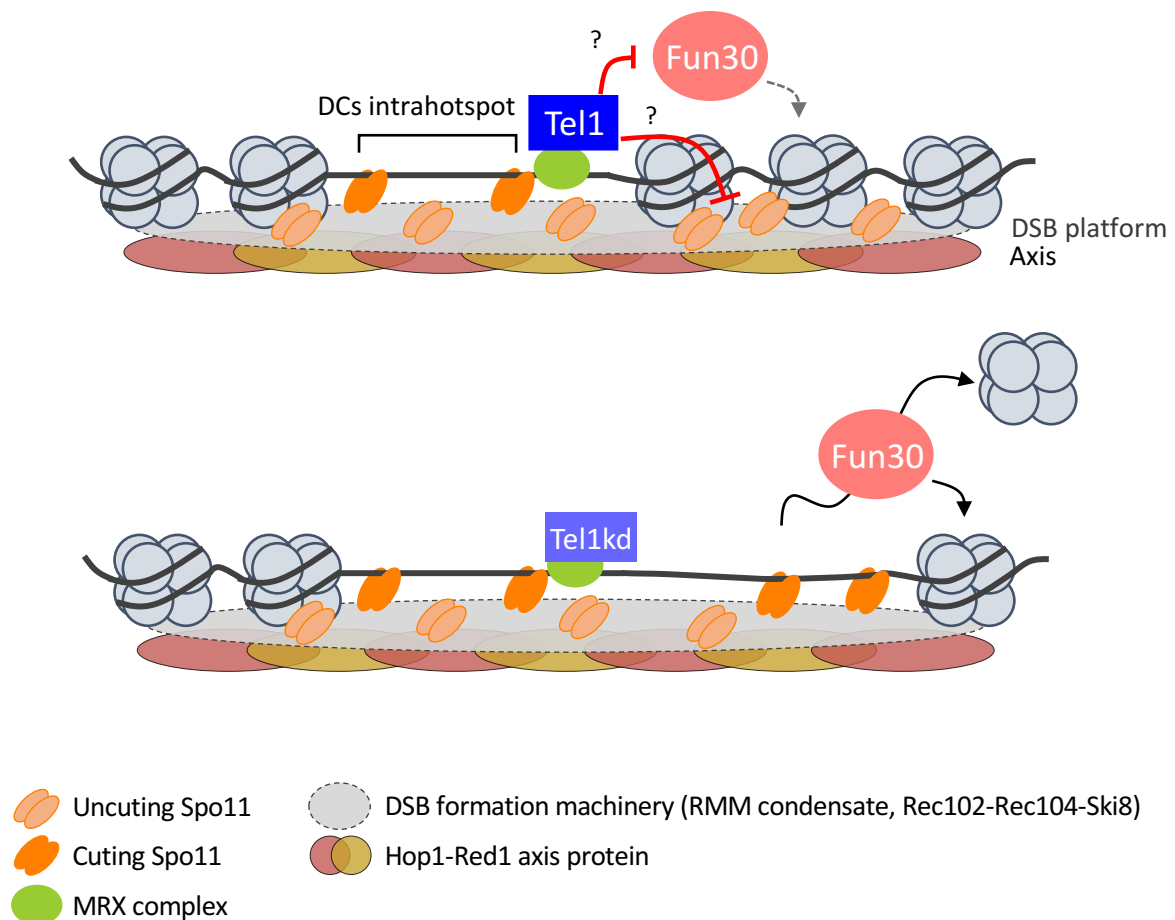


Figure 87 : L'activité kinase de Tel1 régule spatialement la formation des DCs intrahotspots

Le modèle de Johnson *et al.* propose que l'axe et les condensats de RMM forment une plateforme pour des dimères de Spo11. Lorsqu'une boucle d'ADN est amenée à proximité, un ou plusieurs dimères de Spo11 peuvent cliver l'ADN au sein du hotspot. Nos résultats ont montré que l'activité kinase de Tel1 est requise pour réguler spatialement la formation de ces multiples cassures hyperlocalisées. En présence d'une forme non active de Tel1, de larges doubles cassures intrahotspots sont formées, et leur génération se propage en 5' des ORF adjacents. Il est apparu que cette dérégulation est due au recrutement de Tel1kd par le domaine carboxy-terminal de Xrs2, et qu'elle est également dépendante du remodeleur de la chromatine Fun30. Nous proposons ainsi que le recrutement de Tel1 aux hotspots de cassures induit le recrutement de la protéine Fun30. Afin de limiter spatialement la formation de ces DCs intrahotspots, Tel1 pourrait agir directement sur les composants de la machinerie de formation de DSBs ou sur la protéine Fun30. En absence de Tel1, Fun30 ne serait plus recrutée, tandis que Tel1kd serait toujours capable de recruter Fun30 pour remodeler la chromatine sans inhiber l'activité de coupure.

Dans l'ensemble, mes travaux de thèse ont permis de mieux appréhender la dynamique de Tel1 en méiose, et son rôle dans la régulation spatiale des DSBs méiotiques, et ce au sein même des hotspots de cassures. Une meilleure compréhension du rôle de Tel1 dans la régulation spatiale de DSBs participe également à appréhender le rôle de son orthologue ATM chez les mammifères. En effet, si la perte de Tel1 et de l'interférence n'empêche pas la formation de spores viables chez *S. cerevisiae*, l'absence d'ATM conduit à la stérilité des individus chez les mammifères (cf. Chapitre III). Il est possible que cette différence entre levure et mammifères soit due au fait que, chez *S. cerevisiae*, Mec1 et Tel1 partagent de nombreuses cibles et interviennent dans de nombreuses voies communes où Mec1 joue un rôle prépondérant, tandis que chez les mammifères, les rôles de ATM et ATR sont peu redondants (cf. Chapitre III). ATM est donc essentielle à de nombreux processus méiotiques chez les mammifères. Récemment, des événements de réparation par NHEJ entre DCs intrahotspots ou interhotspots, accompagnés de délétion et d'insertion de nucléotides, ont été identifiés en absence d'ATM (Lukaszewicz et al., 2020), soulignant le rôle essentiel d'ATM dans l'intégrité du génome.

En étudiant la régulation spatiale des DCs intrahotspots, il est également apparu que la protéine mutée Tel1^{kd} induit une propagation dirigée des DCs vers le gène adjacent, un phénotype qui est observé dans une moindre proportion en absence de Tel1. Ce phénomène suggère que la présence de la protéine mutée est plus délétère pour la stabilité génomique que l'absence complète de la protéine Tel1. De manière intéressante, cette caractéristique semble également être retrouvée chez les mammifères où la mutation du domaine kinase d'ATM paraît plus toxique pour l'organisme que la perte de la protéine (cf. Chapitre III). En effet, s'il est possible de générer des souris *Atm*^{-/-}, des mutations du domaine kinase d'ATM entraînent une létalité au stade embryonnaire (Daniel et al., 2012; Yamamoto et al., 2012). De plus, dans les cancers présentant des mutations du gène *ATM*, il a été montré que des mutations du domaine kinase sont plus oncogéniques que les mutations touchant d'autres domaines ou que la perte totale de la protéine (Yamamoto et al., 2016). Ces constats suggèrent que la présence de la protéine dépourvue de son activité kinase a un effet néfaste pour les cellules, et il sera donc intéressant d'explorer plus avant l'impact de la protéine Tel1 ou ATM mutée sur la stabilité du génome.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Acquaviva, L., Székvölgyi, L., Dichtl, B., Dichtl, B.S., André, C. de L.R.S., Nicolas, A., and Géli, V. (2013). The COMPASS Subunit Spp1 Links Histone Methylation to Initiation of Meiotic Recombination. *Science* 339, 215–218. <https://doi.org/10.1126/science.1225739>.
- Acquaviva, L., Boekhout, M., Karasu, M.E., Brick, K., Pratto, F., Li, T., van Overbeek, M., Kauppi, L., Camerini-Otero, R.D., Jasin, M., et al. (2020). Ensuring meiotic DNA break formation in the mouse pseudoautosomal region. *Nature* 582, 426–431. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2327-4>.
- Adam, C., Guérois, R., Citarella, A., Verardi, L., Adolphe, F., Béneut, C., Sommermeyer, V., Ramus, C., Govin, J., Couté, Y., et al. (2018). The PHD finger protein Spp1 has distinct functions in the Set1 and the meiotic DSB formation complexes. *PLOS Genet.* 14, e1007223. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007223>.
- Ajimura, M., Leem, S.H., and Ogawa, H. (1993). Identification of new genes required for meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 133, 51–66. .
- Al Kubaisy, E., Arafat, K., De Wever, O., Hassan, A.H., and Attoub, S. (2016). SMARCAD1 knockdown uncovers its role in breast cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 1035–1043. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1195059>.
- Alani, E., Padmore, R., and Kleckner, N. (1990). Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* 61, 419–436. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90524-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90524-I).
- Albini, S.M., and Jones, G.H. (1987). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. *Chromosoma* 95, 324–338. <https://doi.org/10.1007/BF00293179>.
- Albuquerque, C.P., Smolka, M.B., Payne, S.H., Bafna, V., Eng, J., and Zhou, H. (2008). A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 7, 1389–1396. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700468-MCP200>.
- Alt, F.W., and Schwer, B. (2018). DNA double-strand breaks as drivers of neural genomic change, function, and disease. *DNA Repair* 71, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.08.019>.
- Álvarez-Quilón, A., Serrano-Benítez, A., Ariel Lieberman, J., Quintero, C., Sánchez-Gutiérrez, D., Escudero, L.M., and Cortés-Ledesma, F. (2014). ATM specifically mediates repair of double-strand breaks with blocked DNA ends. *Nat. Commun.* 5, 3347. <https://doi.org/10.1038/ncomms4347>.
- Amirifar, P., Ranjouri, M.R., Lavin, M., Abolhassani, H., Yazdani, R., and Aghamohammadi, A. (2020). Ataxia-telangiectasia: epidemiology, pathogenesis, clinical phenotype, diagnosis, prognosis and management. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 16, 859–871. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1810570>.
- Anderson, C.M., Oke, A., Yam, P., Zhuge, T., and Fung, J.C. (2015). Reduced Crossover Interference and Increased ZMM-Independent Recombination in the Absence of Tel1/ATM. *PLOS Genet.* 11, e1005478. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005478>.

- Argunhan, B., Farmer, S., Leung, W.-K., Terentyev, Y., Humphries, N., Tsubouchi, T., Toyozumi, H., and Tsubouchi, H. (2013). Direct and indirect control of the initiation of meiotic recombination by DNA damage checkpoint mechanisms in budding yeast. *PloS One* 8, e65875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065875>.
- Arora, C., Kee, K., Maleki, S., and Keeney, S. (2004). Antiviral Protein Ski8 Is a Direct Partner of Spo11 in Meiotic DNA Break Formation, Independent of Its Cytoplasmic Role in RNA Metabolism. *Mol. Cell* 13, 549–559. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00063-2).
- Auton, A., Rui Li, Y., Kidd, J., Oliveira, K., Nadel, J., Holloway, J.K., Hayward, J.J., Cohen, P.E., Greally, J.M., Wang, J., et al. (2013). Genetic recombination is targeted towards gene promoter regions in dogs. *PLoS Genet.* 9, e1003984. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003984>.
- Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *EMBO J.* 23, 4868–4875. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600469>.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>.
- Baldo, V., Testoni, V., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2008). Dominant TEL1-hy mutations compensate for Mec1 lack of functions in the DNA damage response. *Mol. Cell. Biol.* 28, 358–375. <https://doi.org/10.1128/MCB.01214-07>.
- Banin, S. (1998). Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science* 281, 1674–1677. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1674>.
- Bantele, S.C.S., and Pfander, B. (2019). Nucleosome Remodeling by Fun30SMARCAD1 in the DNA Damage Response. *Front. Mol. Biosci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00078>.
- Bantele, S.C., Ferreira, P., Gritenaite, D., Boos, D., and Pfander, B. (2017). Targeting of the Fun30 nucleosome remodeller by the Dpb11 scaffold facilitates cell cycle-regulated DNA end resection. *ELife* 6, e21687. <https://doi.org/10.7554/eLife.21687>.
- Barchi, M., Roig, I., Di Giacomo, M., de Rooij, D.G., Keeney, S., and Jasin, M. (2008). ATM promotes the obligate XY crossover and both crossover control and chromosome axis integrity on autosomes. *PLoS Genet.* 4, e1000076. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000076>.
- Baretić, D., Pollard, H.K., Fisher, D.I., Johnson, C.M., Santhanam, B., Truman, C.M., Kouba, T., Fersht, A.R., Phillips, C., and Williams, R.L. (2017). Structures of closed and open conformations of dimeric human ATM. *Sci. Adv.* 3, e1700933. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700933>.
- Barlow, C., Liyanage, M., Moens, P.B., Tarsounas, M., Nagashima, K., Brown, K., Rottinghaus, S., Jackson, S.P., Tagle, D., Ried, T., et al. (1998). Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptotema of prophase I. *Dev. Camb. Engl.* 125, 4007–4017. <https://doi.org/10.1242/dev.125.20.4007>.
- Baroni, E., Viscardi, V., Cartagena-Lirola, H., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2004). The functions of budding yeast Sae2 in the DNA damage response require Mec1- and Tel1-

- dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4151–4165. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.10.4151-4165.2004>.
- Baudat, F., and Nicolas, A. (1997). Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5213–5218. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.5213>.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G., and de Massy, B. (2010). PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* **327**, 836–840. <https://doi.org/10.1126/science.1183439>.
- Bellani, M.A., Romanienko, P.J., Cairatti, D.A., and Camerini-Otero, R.D. (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J. Cell Sci.* **118**, 3233–3245. <https://doi.org/10.1242/jcs.02466>.
- Berg, I.L., Neumann, R., Lam, K.-W.G., Sarbajna, S., Odenthal-Hesse, L., May, C.A., and Jeffreys, A.J. (2010). PRDM9 variation strongly influences recombination hot-spot activity and meiotic instability in humans. *Nat. Genet.* **42**, 859–863. <https://doi.org/10.1038/ng.658>.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P.-C., Nicolas, A., and Forterre, P. (1997). An atypical topoisomerase II from archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**, 414–417. <https://doi.org/10.1038/386414a0>.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., Gingeras, T.R., et al. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.001>.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N. (1992). DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439–456. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90446-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90446-J).
- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **66**, 801–817. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
- Blat, Y., and Kleckner, N. (1999). Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell* **98**, 249–259. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81019-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81019-3).
- Blat, Y., Protacio, R.U., Hunter, N., and Kleckner, N. (2002). Physical and Functional Interactions among Basic Chromosome Organizational Features Govern Early Steps of Meiotic Chiasma Formation. *Cell* **111**, 791–802. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01167-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01167-4).
- Blitzblau, H.G., and Hochwagen, A. (2013). ATR/Mec1 prevents lethal meiotic recombination initiation on partially replicated chromosomes in budding yeast. *ELife* **2**, e00844. <https://doi.org/10.7554/eLife.00844>.
- Blitzblau, H.G., Chan, C.S., Hochwagen, A., and Bell, S.P. (2012). Separation of DNA replication from the assembly of break-competent meiotic chromosomes. *PLoS Genet.* **8**, e1002643. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002643>.

- Boer, E. de, Stam, P., Dietrich, A.J.J., Pastink, A., and Heyting, C. (2006). Two levels of interference in mouse meiotic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 9607–9612. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600418103>.
- Bonetti, D., Villa, M., Gobbin, E., Cassani, C., Tedeschi, G., and Longhese, M.P. (2015). Escape of Sgs1 from Rad9 inhibition reduces the requirement for Sae2 and functional MRX in DNA end resection. *EMBO Rep.* *16*, 351–361. <https://doi.org/10.15252/embr.201439764>.
- Bonetti, D., Colombo, C.V., Clerici, M., and Longhese, M.P. (2018). Processing of DNA Ends in the Maintenance of Genome Stability. *Front. Genet.* *9*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00390>.
- Bonnell, E., Pasquier, E., and Wellinger, R.J. (2021). Telomere Replication: Solving Multiple End Replication Problems. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 668171. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.668171>.
- Borde, V., Goldman, A.S.H., and Lichten, M. (2000). Direct Coupling Between Meiotic DNA Replication and Recombination Initiation. *Science*.
- Borde, V., Lin, W., Novikov, E., Petrini, J.H., Lichten, M., and Nicolas, A. (2004). Association of Mre11p with Double-Strand Break Sites during Yeast Meiosis. *Mol. Cell* *13*, 389–401. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00034-6).
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Géli, V., and Nicolas, A. (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J.* *28*, 99–111. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.257>.
- Börner, G.V., Kleckner, N., and Hunter, N. (2004). Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* *117*, 29–45. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00292-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00292-2).
- Börner, G.V., Barot, A., and Kleckner, N. (2008). Yeast Pch2 promotes domainal axis organization, timely recombination progression, and arrest of defective recombinosomes during meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 3327–3332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711864105>.
- Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 225–227. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)01563-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01563-2).
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., et al. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* *312*, 596–600. <https://doi.org/10.1126/science.1125691>.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* *51*, 463–471. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90642-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90642-8).
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R.D., and Petukhova, G.V. (2012). Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* *485*, 642–645. <https://doi.org/10.1038/nature11089>.
- Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F., and Allis, C.D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth

- and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *15*, 3286–3295. <https://doi.org/10.1101/gad.940201>.
- Brown, M.S., and Bishop, D.K. (2014). DNA strand exchange and RecA homologs in meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a016659. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016659>.
- Byeon, B., Wang, W., Barski, A., Ranallo, R.T., Bao, K., Schones, D.E., Zhao, K., Wu, C., and Wu, W.-H. (2013). The ATP-dependent Chromatin Remodeling Enzyme Fun30 Represses Transcription by Sliding Promoter-proximal Nucleosomes. *J. Biol. Chem.* *288*, 23182–23193. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.471979>.
- Cahoon, C.K., and Hawley, R.S. (2016). Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 369–377. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3208>.
- Cannavo, E., and Cejka, P. (2014). Sae2 promotes dsDNA endonuclease activity within Mre11–Rad50–Xrs2 to resect DNA breaks. *Nature* *514*, 122–125. <https://doi.org/10.1038/nature13771>.
- Cannavo, E., Johnson, D., Andres, S.N., Kissling, V.M., Reinert, J.K., Garcia, V., Erie, D.A., Hess, D., Thomä, N.H., Enchev, R.I., et al. (2018). Regulatory control of DNA end resection by Sae2 phosphorylation. *Nat. Commun.* *9*, 4016. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06417-5>.
- Cannavo, E., Sanchez, A., Anand, R., Ranjha, L., Hugener, J., Adam, C., Acharya, A., Weyland, N., Aran-Guiu, X., Charbonnier, J.-B., et al. (2020). Regulation of the MLH1-MLH3 endonuclease in meiosis. *Nature* *586*, 618–622. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2592-2>.
- Cao, L., Alani, E., and Kleckner, N. (1990). A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* *61*, 1089–1101. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90072-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90072-m).
- Carballo, J.A., Johnson, A.L., Sedgwick, S.G., and Cha, R.S. (2008). Phosphorylation of the Axial Element Protein Hop1 by Mec1/Tel1 Ensures Meiotic Interhomolog Recombination. *Cell* *132*, 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.035>.
- Carballo, J.A., Panizza, S., Serrentino, M.E., Johnson, A.L., Geymonat, M., Borde, V., Klein, F., and Cha, R.S. (2013). Budding yeast ATM/ATR control meiotic double-strand break (DSB) levels by down-regulating Rec114, an essential component of the DSB-machinery. *PLoS Genet.* *9*, e1003545. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003545>.
- Cartagena-Lirola, H., Guerini, I., Viscardi, V., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2006). Budding Yeast Sae2 is an In Vivo Target of the Mec1 and Tel1 Checkpoint Kinases During Meiosis. *Cell Cycle* *5*, 1549–1559. <https://doi.org/10.4161/cc.5.14.2916>.
- Casari, E., Rinaldi, C., Marsella, A., Gnugnoli, M., Colombo, C.V., Bonetti, D., and Longhese, M.P. (2019). Processing of DNA Double-Strand Breaks by the MRX Complex in a Chromatin Context. *Front. Mol. Biosci.* *6*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00043>.
- Casolari, J.M., Brown, C.R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P.A. (2004). Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* *117*, 427–439. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00448-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00448-9).

Cassani, C., Gobbin, E., Wang, W., Niu, H., Clerici, M., Sung, P., and Longhese, M.P. (2016). Tel1 and Rif2 Regulate MRX Functions in End-Tethering and Repair of DNA Double-Strand Breaks. *PLoS Biol.* *14*, e1002387. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002387>.

Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016). Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* *26*, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>.

Cha, R.S., Weiner, B.M., Keeney, S., Dekker, J., and Kleckner, N. (2000). Progression of meiotic DNA replication is modulated by interchromosomal interaction proteins, negatively by Spo11p and positively by Rec8p. *Genes Dev.* *14*, 493–503. .

Chakraborty, S., Pandita, R.K., Hambarde, S., Mattoo, A.R., Charaka, V., Ahmed, K.M., Iyer, S.P., Hunt, C.R., and Pandita, T.K. (2018). SMARCAD1 Phosphorylation and Ubiquitination Are Required for Resection during DNA Double-Strand Break Repair. *IScience* *2*, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.03.016>.

Chang, M., Arneric, M., and Lingner, J. (2007). Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *21*, 2485–2494. <https://doi.org/10.1101/gad.1588807>.

Chaumeil, J., Micsinai, M., Ntziachristos, P., Roth, D.B., Aifantis, I., Kluger, Y., Deriano, L., and Skok, J.A. (2013). The RAG2 C-terminus and ATM protect genome integrity by controlling antigen receptor gene cleavage. *Nat. Commun.* *4*, 2231. <https://doi.org/10.1038/ncomms3231>.

Chen, R., and Wold, M.S. (2014). Replication Protein A: Single-stranded DNA's first responder : Dynamic DNA-interactions allow Replication Protein A to direct single-strand DNA intermediates into different pathways for synthesis or repair. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *36*, 1156–1161. <https://doi.org/10.1002/bies.201400107>.

Chen, C., Jomaa, A., Ortega, J., and Alani, E.E. (2014). Pch2 is a hexameric ring ATPase that remodels the chromosome axis protein Hop1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E44–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310755111>.

Chen, H., Donnianni, R.A., Handa, N., Deng, S.K., Oh, J., Timashev, L.A., Kowalczykowski, S.C., and Symington, L.S. (2015). Sae2 promotes DNA damage resistance by removing the Mre11–Rad50–Xrs2 complex from DNA and attenuating Rad53 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, E1880–E1887. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503331112>.

Chen, L., Trujillo, K.M., Van Komen, S., Roh, D.H., Krejci, L., Lewis, L.K., Resnick, M.A., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2005). Effect of amino acid substitutions in the rad50 ATP binding domain on DNA double strand break repair in yeast. *J. Biol. Chem.* *280*, 2620–2627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410192200>.

Chen, X., Cui, D., Papusha, A., Zhang, X., Chu, C.-D., Tang, J., Chen, K., Pan, X., and Ira, G. (2012). The Fun30 nucleosome remodeler promotes resection of DNA double-strand break ends. *Nature* *489*, 576–580. <https://doi.org/10.1038/nature11355>.

Chen, X., Gaglione, R., Leong, T., Bednorz, L., de Los Santos, T., Luk, E., Airola, M., and Hollingsworth, N.M. (2018). Mek1 coordinates meiotic progression with DNA break repair by

directly phosphorylating and inhibiting the yeast pachytene exit regulator Ndt80. *PLoS Genet.* *14*, e1007832. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007832>.

Chen, Y.-J., Chuang, Y.-C., Chuang, C.-N., Cheng, Y.-H., Chang, C.-R., Leng, C.-H., and Wang, T.-F. (2016). *S. cerevisiae* Mre11 recruits conjugated SUMO moieties to facilitate the assembly and function of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex. *Nucleic Acids Res.* *44*, 2199–2213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1523>.

Childs, A.J., Cowan, G., Kinnell, H.L., Anderson, R.A., and Saunders, P.T.K. (2011). Retinoic Acid signalling and the control of meiotic entry in the human fetal gonad. *PLoS One* *6*, e20249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020249>.

Chin, G.M., and Villeneuve, A.M. (2001). *C. elegans* mre-11 is required for meiotic recombination and DNA repair but is dispensable for the meiotic G(2) DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* *15*, 522–534. <https://doi.org/10.1101/gad.864101>.

Choi, M., Kipps, T., and Kurzrock, R. (2016). ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* *15*, 1781–1791. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0945>.

Chu, S., and Herskowitz, I. (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol. Cell* *1*, 685–696. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80068-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80068-4).

Chu, D.B., Gromova, T., Newman, T.A.C., and Burgess, S.M. (2017). The Nucleoporin Nup2 Contains a Meiotic-Autonomous Region that Promotes the Dynamic Chromosome Events of Meiosis. *Genetics* *206*, 1319–1337. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194555>.

Claeys Bouuaert, C., Tischfield, S.E., Pu, S., Mimitou, E.P., Arias-Palomo, E., Berger, J.M., and Keeney, S. (2021a). Structural and functional characterization of the Spo11 core complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *28*, 92–102. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00534-w>.

Claeys Bouuaert, C., Pu, S., Wang, J., Oger, C., Daccache, D., Xie, W., Patel, D.J., and Keeney, S. (2021b). DNA-driven condensation assembles the meiotic DNA break machinery. *Nature* *592*, 144–149. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03374-w>.

Clerici, M., Trovesi, C., Galbiati, A., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2014). Mec1/ATR regulates the generation of single-stranded DNA that attenuates Tel1/ATM signaling at DNA ends. *EMBO J.* *33*, 198–216. <https://doi.org/10.1002/embj.201386041>.

Cole, F., Kauppi, L., Lange, J., Roig, I., Wang, R., Keeney, S., and Jasin, M. (2012). Homeostatic control of recombination is implemented progressively in mouse meiosis. *Nat. Cell Biol.* *14*, 424–430. <https://doi.org/10.1038/ncb2451>.

Collins, I., and Newlon, C.S. (1994). Chromosomal DNA replication initiates at the same origins in meiosis and mitosis. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 3524–3534. .

Conrad, M.N., Lee, C.-Y., Chao, G., Shinohara, M., Kosaka, H., Shinohara, A., Conchello, J.-A., and Dresser, M.E. (2008). Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by NDJ1, MPS3, and CSM4 and is modulated by recombination. *Cell* *133*, 1175–1187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.047>.

- Cooper, T.J., Wardell, K., Garcia, V., and Neale, M.J. (2014). Homeostatic regulation of meiotic DSB formation by ATM/ATR. *Exp. Cell Res.* 329, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.016>.
- Cooper, T.J., Garcia, V., and Neale, M.J. (2016). Meiotic DSB patterning: A multifaceted process. *Cell Cycle* 15, 13–21. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1093709>.
- Corbett, K.D., and Berger, J.M. (2003). Emerging Roles for Plant Topoisomerase VI. *Chem. Biol.* 10, 107–111. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(03\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(03)00027-9).
- Costelloe, T., Louge, R., Tomimatsu, N., Mukherjee, B., Martini, E., Khadaroo, B., Dubois, K., Wiegant, W.W., Thierry, A., Burma, S., et al. (2012). The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodelers promote DNA end resection. *Nature* 489, 581–584. <https://doi.org/10.1038/nature11353>.
- Crawford, T.O., Skolasky, R.L., Fernandez, R., Rosquist, K.J., and Lederman, H.M. (2006). Survival probability in ataxia telangiectasia. *Arch. Dis. Child.* 91, 610–611. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.094268>.
- Cremona, C.A., and Behrens, A. (2014). ATM signalling and cancer. *Oncogene* 33, 3351–3360. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.275>.
- Cromie, G.A., Hyppa, R.W., Taylor, A.F., Zakharyevich, K., Hunter, N., and Smith, G.R. (2006). Single Holliday junctions are intermediates of meiotic recombination. *Cell* 127, 1167–1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.050>.
- D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2001). The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev.* 15, 2238. <https://doi.org/10.1101/gad.208701>.
- Daniel, J.A., Pellegrini, M., Lee, B.-S., Guo, Z., Filsuf, D., Belkina, N.V., You, Z., Paull, T.T., Sleckman, B.P., Feigenbaum, L., et al. (2012). Loss of ATM kinase activity leads to embryonic lethality in mice. *J. Cell Biol.* 198, 295–304. <https://doi.org/10.1083/jcb.201204035>.
- Daum, J.R., Potapova, T.A., Sivakumar, S., Daniel, J.J., Flynn, J.N., Rankin, S., and Gorbsky, G.J. (2011). Cohesion fatigue induces chromatid separation in cells delayed at metaphase. *Curr. Biol. CB* 21, 1018–1024. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.032>.
- Davis, L., and Smith, G.R. (2006). The meiotic bouquet promotes homolog interactions and restricts ectopic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 174, 167–177. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.059733>.
- Dernburg, A.F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M., and Villeneuve, A.M. (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94, 387–398. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81481-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81481-6).
- DeVeaux, L.C., and Smith, G.R. (1994). Region-specific activators of meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* 8, 203–210. <https://doi.org/10.1101/gad.8.2.203>.
- Di Domenico, E.G., Romano, E., Del Porto, P., and Ascenzioni, F. (2014). Multifunctional role of ATM/Tel1 kinase in genome stability: from the DNA damage response to telomere maintenance. *BioMed Res. Int.* 2014, 787404. <https://doi.org/10.1155/2014/787404>.

- Di Virgilio, M., Ying, C.Y., and Gautier, J. (2009). PIKK-dependent phosphorylation of Mre11 induces MRN complex inactivation by disassembly from chromatin. *DNA Repair* 8, 1311–1320. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.07.006>.
- Ding, D.-Q., Yamamoto, A., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2004). Dynamics of Homologous Chromosome Pairing during Meiotic Prophase in Fission Yeast. *Dev. Cell* 6, 329–341. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00059-0).
- Dirick, L., Goetsch, L., Ammerer, G., and Byers, B. (1998). Regulation of Meiotic S Phase by Ime2 and a Clb5,6-Associated Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 281, 1854–1857. <https://doi.org/10.1126/science.281.5384.1854>.
- Downs, J.A., Lowndes, N.F., and Jackson, S.P. (2000). A role for *Saccharomyces cerevisiae* histone H2A in DNA repair. *Nature* 408, 1001–1004. <https://doi.org/10.1038/35050000>.
- Dupré, A., Boyer-Chatenet, L., and Gautier, J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 451–457. <https://doi.org/10.1038/nsmb1090>.
- Eapen, V.V., Sugawara, N., Tsabar, M., Wu, W.-H., and Haber, J.E. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* Chromatin Remodeler Fun30 Regulates DNA End Resection and Checkpoint Deactivation. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4727–4740. <https://doi.org/10.1128/MCB.00566-12>.
- Engbrecht, J., Hirsch, J., and Roeder, G.S. (1990). Meiotic gene conversion and crossing over: Their relationship to each other and to chromosome synapsis and segregation. *Cell* 62, 927–937. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90267-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90267-I).
- Engbrecht, J.A., Voelkel-Meiman, K., and Roeder, G.S. (1991). Meiosis-specific RNA splicing in yeast. *Cell* 66, 1257–1268. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90047-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90047-3).
- Esposito, M.S., and Esposito, R.E. (1969). The Genetic Control of Sporulation in *Saccharomyces* I. the Isolation of Temperature-Sensitive Sporulation-Deficient Mutants. *Genetics* 61, 79–89. .
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611. <https://doi.org/10.1038/nature03442>.
- Fan, Q.Q., Xu, F., White, M.A., and Petes, T.D. (1997). Competition between Adjacent Meiotic Recombination Hotspots in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 145, 661–670. .
- Fawcett, D.W. (1956). THE FINE STRUCTURE OF CHROMOSOMES IN THE MEIOTIC PROPHASE OF VERTEBRATE SPERMATOCYTES. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 403–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.2.4.403>.
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., André, B., Baclet, M.C., Barthe, C., Baur, A., Bécam, A.M., Biteau, N., Boles, E., et al. (1994). Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J.* 13, 5795–5809. .
- Ferrari, M., Dibitetto, D., De Gregorio, G., Eapen, V.V., Rawal, C.C., Lazzaro, F., Tsabar, M., Marini, F., Haber, J.E., and Pelliccioli, A. (2015). Functional interplay between the 53BP1-ortholog Rad9 and the Mre11 complex regulates resection, end-tethering and repair of a double-strand break. *PLoS Genet.* 11, e1004928. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004928>.

- Forsburg, S.L. (2002). Only Connect: Linking Meiotic DNA Replication to Chromosome Dynamics. *Mol. Cell* 9, 703–711. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00508-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00508-7).
- Forsburg, S.L., and Hodson, J.A. (2000). Mitotic replication initiation proteins are not required for pre-meiotic S phase. *Nat. Genet.* 25, 263–268. <https://doi.org/10.1038/77015>.
- Fowler, K.R., Hyppa, R.W., Cromie, G.A., and Smith, G.R. (2018). Physical basis for long-distance communication along meiotic chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, E9333–E9342. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801920115>.
- Friederichs, J.M., Gardner, J.M., Smoyer, C.J., Whetstone, C.R., Gogol, M., Slaughter, B.D., and Jaspersen, S.L. (2012). Genetic Analysis of Mps3 SUN Domain Mutants in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals an Interaction with the SUN-Like Protein Slp1. *G3amp58 GenesGenomesGenetics* 2, 1703–1718. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004614>.
- Fudenberg, G., Abdennur, N., Imakaev, M., Goloborodko, A., and Mirny, L.A. (2017). Emerging Evidence of Chromosome Folding by Loop Extrusion. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 82, 45–55. <https://doi.org/10.1101/sqb.2017.82.034710>.
- Fukuda, T., Kugou, K., Sasanuma, H., Shibata, T., and Ohta, K. (2008). Targeted induction of meiotic double-strand breaks reveals chromosomal domain-dependent regulation of Spo11 and interactions among potential sites of meiotic recombination. *Nucleic Acids Res.* 36, 984–997. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1082>.
- Fukunaga, K., Kwon, Y., Sung, P., and Sugimoto, K. (2011). Activation of Protein Kinase Tel1 through Recognition of Protein-Bound DNA Ends. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1959–1971. <https://doi.org/10.1128/MCB.05157-11>.
- Fung, J.C., Rockmill, B., Odell, M., and Roeder, G.S. (2004). Imposition of crossover interference through the nonrandom distribution of synapsis initiation complexes. *Cell* 116, 795–802. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00249-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00249-1).
- Furuse, M., Nagase, Y., Tsubouchi, H., Murakami-Murofushi, K., Shibata, T., and Ohta, K. (1998). Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J.* 17, 6412–6425. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6412>.
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* 479, 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature10515>.
- Garcia, V., Gray, S., Allison, R.M., Cooper, T.J., and Neale, M.J. (2015). Tel1ATM-mediated interference suppresses clustered meiotic double-strand-break formation. *Nature* 520, 114–118. <https://doi.org/10.1038/nature13993>.
- Gatti, R.A., Berkel, I., Boder, E., Braedt, G., Charmley, P., Concannon, P., Ersoy, F., Foroud, T., Jaspers, N.G., and Lange, K. (1988). Localization of an ataxia-telangiectasia gene to chromosome 11q22-23. *Nature* 336, 577–580. <https://doi.org/10.1038/336577a0>.
- Gavin, A.-C., Böschke, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147. <https://doi.org/10.1038/415141a>.

- Gerton, J.L., DeRisi, J., Shroff, R., Lichten, M., Brown, P.O., and Petes, T.D. (2000). Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 11383–11390. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.21.11383>.
- Girard, C., Roelens, B., Zawadzki, K.A., and Villeneuve, A.M. (2018). Interdependent and separable functions of *Caenorhabditis elegans* MRN-C complex members couple formation and repair of meiotic DSBs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *115*, E4443–E4452. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719029115>.
- Gittens, W.H., Johnson, D.J., Allison, R.M., Cooper, T.J., Thomas, H., and Neale, M.J. (2019). A nucleotide resolution map of Top2-linked DNA breaks in the yeast and human genome. *Nat. Commun.* *10*, 4846. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12802-5>.
- Glynn, E.F., Megee, P.C., Yu, H.-G., Mistrot, C., Unal, E., Koshland, D.E., DeRisi, J.L., and Gerton, J.L. (2004). Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol.* *2*, E259. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020259>.
- Gobbini, E., Cesena, D., Galbiati, A., Lockhart, A., and Longhese, M.P. (2013). Interplays between ATM/Tel1 and ATR/Mec1 in sensing and signaling DNA double-strand breaks. *DNA Repair* *12*, 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.07.009>.
- Gobbini, E., Cassani, C., Villa, M., Bonetti, D., and Longhese, M. (2016). Functions and regulation of the MRX complex at DNA double-strand breaks. *Microb. Cell* *3*, 329–337. <https://doi.org/10.15698/mic2016.08.517>.
- Goldman, A.S., and Lichten, M. (2000). Restriction of ectopic recombination by interhomolog interactions during *Saccharomyces cerevisiae* meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 9537–9542. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.17.9537>.
- Goyon, C., and Lichten, M. (1993). Timing of molecular events in meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*: stable heteroduplex DNA is formed late in meiotic prophase. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 373–382. .
- Gray, S., and Cohen, P.E. (2016). Control of Meiotic Crossovers: From Double-Strand Break Formation to Designation. *Annu. Rev. Genet.* *50*, 175–210. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035111>.
- Gray, S., Allison, R.M., Garcia, V., Goldman, A.S.H., and Neale, M.J. (2013). Positive regulation of meiotic DNA double-strand break formation by activation of the DNA damage checkpoint kinase Mec1(ATR). *Open Biol.* *3*, 130019. <https://doi.org/10.1098/rsob.130019>.
- Greenwell, P.W., Kronmal, S.L., Porter, S.E., Gassenhuber, J., Obermaier, B., and Petes, T.D. (1995). TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* *82*, 823–829. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90479-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90479-4).
- Grey, C., and de Massy, B. (2021). Chromosome Organization in Early Meiotic Prophase. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 1397. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.688878>.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Science* *330*, 517–521. <https://doi.org/10.1126/science.1192912>.

- Haber, J.E. (1998). The Many Interfaces of Mre11. *Cell* 95, 583–586. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81626-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81626-8).
- Hailemariam, S., Kumar, S., and Burgers, P.M. (2019a). Activation of Tel1ATM kinase requires Rad50 ATPase and long nucleosome-free DNA but no DNA ends. *J. Biol. Chem.* 294, 10120–10130. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008410>.
- Hailemariam, S., De Bona, P., Galletto, R., Hohl, M., Petrini, J.H., and Burgers, P.M. (2019b). The telomere-binding protein Rif2 and ATP-bound Rad50 have opposing roles in the activation of yeast Tel1ATM kinase. *J. Biol. Chem.* 294, 18846–18852. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011077>.
- Hassold, T., and 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>.
- Hawley, R.S. (2011). Solving a Meiotic LEGO® Puzzle: Transverse Filaments and the Assembly of the Synaptonemal Complex in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 189, 405–409. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.134197>.
- Hayashi, K., Yoshida, K., and Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438, 374–378. <https://doi.org/10.1038/nature04112>.
- Hayashi, M., Chin, G.M., and Villeneuve, A.M. (2007). *C. elegans* Germ Cells Switch between Distinct Modes of Double-Strand Break Repair During Meiotic Prophase Progression. *PLoS Genet.* 3, e191. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030191>.
- Hector, R.E., Shtofman, R.L., Ray, A., Chen, B.-R., Nyun, T., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2007). Tel1p preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol. Cell* 27, 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.007>.
- Heichinger, C., Penkett, C.J., Bähler, J., and Nurse, P. (2006). Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *EMBO J.* 25, 5171–5179. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601390>.
- Henderson, K.A., and Keeney, S. (2004). Tying synaptonemal complex initiation to the formation and programmed repair of DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4519–4524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400843101>.
- Henderson, K.A., Kee, K., Maleki, S., Santini, P.A., and Keeney, S. (2006). Cyclin-dependent kinase directly regulates initiation of meiotic recombination. *Cell* 125, 1321–1332. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.039>.
- Herrup, K., Li, J., and Chen, J. (2013). The role of ATM and DNA damage in neurons: upstream and downstream connections. *DNA Repair* 12, 600–604. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.012>.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52, 536–553. .
- Hewitt, S.L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthorey, J., Salvagiotto, G., Steinel, N., Ramsey, L.B., Ghysdael, J., et al. (2009). RAG1 and ATM coordinate monoallelic recombination

and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* *10*, 655–664. <https://doi.org/10.1038/ni.1735>.

Hewitt, S.L., Wong, J.B., Lee, J.-H., Nishana, M., Chen, H., Coussens, M., Arnal, S.M., Blumenberg, L.M., Roth, D.B., Paull, T.T., et al. (2017). The Conserved ATM Kinase RAG2-S365 Phosphorylation Site Limits Cleavage Events in Individual Cells Independent of Any Repair Defect. *Cell Rep.* *21*, 979–993. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.084>.

Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Jones, G.H., and Franklin, F.Chris.H. (2005). The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev.* *19*, 2488–2500. <https://doi.org/10.1101/gad.354705>.

Higgins, J.D., Perry, R.M., Barakate, A., Ramsay, L., Waugh, R., Halpin, C., Armstrong, S.J., and Franklin, F.C.H. (2012). Spatiotemporal Asymmetry of the Meiotic Program Underlies the Predominantly Distal Distribution of Meiotic Crossovers in Barley. *Plant Cell* *24*, 4096–4109. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102483>.

Hinch, A.G., Becker, P.W., Li, T., Moralli, D., Zhang, G., Bycroft, C., Green, C., Keeney, S., Shi, Q., Davies, B., et al. (2020). The Configuration of RPA, RAD51, and DMC1 Binding in Meiosis Reveals the Nature of Critical Recombination Intermediates. *Mol. Cell* *79*, 689-701.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.015>.

Hirano, T. (2005). Condensins: Organizing and Segregating the Genome. *Curr. Biol.* *15*, R265–R275. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.037>.

Hirano, Y., Fukunaga, K., and Sugimoto, K. (2009). Rif1 and Rif2 Inhibit Localization of Tel1 to DNA Ends. *Mol. Cell* *33*, 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.027>.

Ho, H.-C., and Burgess, S.M. (2011). Pch2 Acts through Xrs2 and Tel1/ATM to Modulate Interhomolog Bias and Checkpoint Function during Meiosis. *PLoS Genet.* *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002351>.

Hollingsworth, N.M., and Brill, S.J. (2004). The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev.* *18*, 117–125. <https://doi.org/10.1101/gad.1165904>.

Hollingsworth, N.M., and Byers, B. (1989). HOP1: a yeast meiotic pairing gene. *Genetics* *121*, 445–462. <https://doi.org/10.1093/genetics/121.3.445>.

Hollingsworth, N.M., Goetsch, L., and Byers, B. (1990). The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* *61*, 73–84. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90216-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90216-2).

Hood, J.K., Casolari, J.M., and Silver, P.A. (2000). Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin- α export. *J. Cell Sci.* *113* (Pt 8), 1471–1480. .

Hopfner, K.P., Karcher, A., Craig, L., Woo, T.T., Carney, J.P., and Tainer, J.A. (2001). Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* *105*, 473–485. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00335-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00335-x).

- Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP Mediates Cell Cycle Control of DNA End Resection and Double Strand Break Repair *. *J. Biol. Chem.* *284*, 9558–9565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>.
- Huertas, P., Cortés-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* *455*, 689–692. <https://doi.org/10.1038/nature07215>.
- Ira, G., Pellicoli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., et al. (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* *431*, 1011–1017. <https://doi.org/10.1038/nature02964>.
- Jiang, X., Sun, Y., Chen, S., Roy, K., and Price, B.D. (2006). The FATC domains of PIKK proteins are functionally equivalent and participate in the Tip60-dependent activation of DNA-PKcs and ATM. *J. Biol. Chem.* *281*, 15741–15746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513172200>.
- Jiao, K., Bullard, S.A., Salem, L., and Malone, R.E. (1999). Coordination of the initiation of recombination and the reductional division in meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *152*, 117–128. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.1.117>.
- Jiao, K., Salem, L., and Malone, R. (2003). Support for a Meiotic Recombination Initiation Complex: Interactions among Rec102p, Rec104p, and Spo11p. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 5928–5938. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5928-5938.2003>.
- Johnson, D., Crawford, M., Cooper, T., Claeys Bouuaert, C., Keeney, S., Llorente, B., Garcia, V., and Neale, M.J. (2021). Concerted cutting by Spo11 illuminates meiotic DNA break mechanics. *Nature* *594*, 572–576. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03389-3>.
- Johzuka, K., and Ogawa, H. (1995). Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *139*, 1521–1532. .
- Jones, G.H., and Franklin, F.C.H. (2006). Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* *126*, 246–248. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.010>.
- Jones, M.H., Keck, J.M., Wong, C.C.L., Xu, T., Yates, J.R., and Winey, M. (2011). Cell cycle phosphorylation of mitotic exit network (MEN) proteins. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 3435–3440. <https://doi.org/10.4161/cc.10.20.17790>.
- Joshi, N., Brown, M.S., Bishop, D.K., and Börner, G.V. (2015). Gradual Implementation of the Meiotic Recombination Program via Checkpoint Pathways Controlled by Global DSB Levels. *Mol. Cell* *57*, 797–811. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.027>.
- Joyce, E.F., Pedersen, M., Tiong, S., White-Brown, S.K., Paul, A., Campbell, S.D., and McKim, K.S. (2011). *Drosophila* ATM and ATR have distinct activities in the regulation of meiotic DNA damage and repair. *J. Cell Biol.* *195*, 359–367. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104121>.
- Kaback, D.B., Barber, D., Mahon, J., Lamb, J., and You, J. (1999). Chromosome size-dependent control of meiotic reciprocal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of crossover interference. *Genetics* *152*, 1475–1486. .

- Kariyazono, R., Oda, A., Yamada, T., and Ohta, K. (2019). Conserved HORMA domain-containing protein Hop1 stabilizes interaction between proteins of meiotic DNA break hotspots and chromosome axis. *Nucleic Acids Res.* *47*, 10166–10180. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz754>.
- Kassir, Y., and Simchen, G. (1976). Regulation of Mating and Meiosis in Yeast by the Mating-Type Region. *Genetics* *82*, 187–206. .
- Kassir, Y., Granot, D., and Simchen, G. (1988). IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* *52*, 853–862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90427-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90427-8).
- Katis, V.L., Galova, M., Rabitsch, K.P., Gregan, J., and Nasmyth, K. (2004). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr. Biol.* *CB 14*, 560–572. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.03.001>.
- Kee, K., Protacio, R.U., Arora, C., and Keeney, S. (2004). Spatial organization and dynamics of the association of Rec102 and Rec104 with meiotic chromosomes. *EMBO J.* *23*, 1815–1824. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600184>.
- Keeney, S. (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Academic Press), pp. 1–53.
- Keeney, S., and Kleckner, N. (1995). Covalent protein-DNA complexes at the 5' strand termini of meiosis-specific double-strand breaks in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 11274–11278. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11274>.
- Keeney, S., Giroux, C.N., and Kleckner, N. (1997). Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. *Cell* *88*, 375–384. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81876-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81876-0).
- Kim, S.-T., Lim, D.-S., Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1999). Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *J. Biol. Chem.* *274*, 37538–37543. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37538>.
- Kim, Y., Rosenberg, S.C., Kugel, C.L., Kostow, N., Rog, O., Davydov, V., Su, T.Y., Dernburg, A.F., and Corbett, K.D. (2014). The chromosome axis controls meiotic events through a hierarchical assembly of HORMA domain proteins. *Dev. Cell* *31*, 487–502. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.013>.
- Kitajima, T.S., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* *427*, 510–517. <https://doi.org/10.1038/nature02312>.
- Klapholz, S., Waddell, C.S., and Esposito, R.E. (1985). THE ROLE OF THE SPO11 GENE IN MEIOTIC RECOMBINATION IN YEAST. *Genetics* *110*, 187–216. <https://doi.org/10.1093/genetics/110.2.187>.
- Kleckner, N. (2006). Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* *115*, 175. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0055-7>.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B.C., Michaelis, C., Nairz, K., and Nasmyth, K. (1999). A Central Role for Cohesins in Sister Chromatid Cohesion, Formation of Axial Elements,

- and Recombination during Yeast Meiosis. *Cell* 98, 91–103. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80609-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80609-1).
- Kosaka, H., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2008). Csm4-dependent telomere movement on nuclear envelope promotes meiotic recombination. *PLoS Genet.* 4, e1000196. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000196>.
- Koszul, R., and Kleckner, N. (2009). Dynamic chromosome movements during meiosis: a way to eliminate unwanted connections? *Trends Cell Biol.* 19, 716–724. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.09.007>.
- Koszul, R., Kim, K.P., Prentiss, M., Kleckner, N., and Kameoka, S. (2008). Meiotic chromosomes move by linkage to dynamic actin cables with transduction of force through the nuclear envelope. *Cell* 133, 1188–1201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.050>.
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2474–2479. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103>.
- Kristiansen, M., and Ham, J. (2014). Programmed cell death during neuronal development: the sympathetic neuron model. *Cell Death Differ.* 21, 1025–1035. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.47>.
- Kugou, K., Fukuda, T., Yamada, S., Ito, M., Sasanuma, H., Mori, S., Katou, Y., Itoh, T., Matsumoto, K., Shibata, T., et al. (2009). Rec8 Guides Canonical Spo11 Distribution along Yeast Meiotic Chromosomes. *Mol. Biol. Cell* 20, 3064–3076. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1223>.
- Kurzbauer, M.-T., Janisiw, M.P., Paulin, L.F., Prusén Mota, I., Tomanov, K., Krsicka, O., von Haeseler, A., Schubert, V., and Schlögelhofer, P. (2021). ATM controls meiotic DNA double-strand break formation and recombination and affects synaptonemal complex organization in plants. *Plant Cell* 33, 1633–1656. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab045>.
- Lam, I., and Keeney, S. (2015). Mechanism and Regulation of Meiotic Recombination Initiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a016634. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016634>.
- Lange, J., Pan, J., Cole, F., Thelen, M.P., Jasin, M., and Keeney, S. (2011). ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* 479, 237–240. <https://doi.org/10.1038/nature10508>.
- Lange, J., Yamada, S., Tischfield, S.E., Pan, J., Kim, S., Zhu, X., Socci, N.D., Jasin, M., and Keeney, S. (2016). The Landscape of Mouse Meiotic Double-Strand Break Formation, Processing, and Repair. *Cell* 167, 695-708.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.035>.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lanz, M.C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E.J., Faça, V.M., Vega, S., Joiner, A.M.N., Fromme, J.C., Yu, H., and Smolka, M.B. (2021). In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Rep.* 22, e51121. <https://doi.org/10.15252/embr.202051121>.

Larochelle, M., Bergeron, D., Arcand, B., and Bachand, F. (2019). Proximity-dependent biotinylation mediated by TurboID to identify protein-protein interaction networks in yeast. *J. Cell Sci.* *132*. <https://doi.org/10.1242/jcs.232249>.

Lavin, M.F. (2013). The appropriateness of the mouse model for ataxia-telangiectasia: Neurological defects but no neurodegeneration. *DNA Repair* *12*, 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.014>.

Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* *308*, 551–554. <https://doi.org/10.1126/science.1108297>.

Lee, Y., and McKinnon, P.J. (2000). ATM dependent apoptosis in the nervous system. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *5*, 523–529. <https://doi.org/10.1023/a:1009637512917>.

Lee, J.Y., Terakawa, T., Qi, Z., Steinfeld, J.B., Redding, S., Kwon, Y., Gaines, W.A., Zhao, W., Sung, P., and Greene, E.C. (2015). Base triplet stepping by the Rad51/RecA family of recombinases. *Science*.

Lee, M.-S., Higashide, M.T., Choi, H., Li, K., Hong, S., Lee, K., Shinohara, A., Shinohara, M., and Kim, K.P. (2021). The synaptonemal complex central region modulates crossover pathways and feedback control of meiotic double-strand break formation. *Nucleic Acids Res.* *49*, 7537–7553. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab566>.

Levy, D.L., and Blackburn, E.H. (2004). Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 10857–10867. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10857-10867.2004>.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *25*, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.

Li, J., Hooker, G.W., and Roeder, G.S. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Mer2, Mei4 and Rec114 form a complex required for meiotic double-strand break formation. *Genetics* *173*, 1969–1981. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.058768>.

Liao, M.J., and Van Dyke, T. (1999). Critical role for Atm in suppressing V(D)J recombination-driven thymic lymphoma. *Genes Dev.* *13*, 1246–1250. <https://doi.org/10.1101/gad.13.10.1246>.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *30*, 923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.

Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., Maser, R.S., Lin, J., Petrini, J.H., and Kastan, M.B. (2000). ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* *404*, 613–617. <https://doi.org/10.1038/35007091>.

Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA Damage Response: Spatiotemporal Relationships among Checkpoint and Repair Proteins. *15*.

Liu, J., Wu, T.C., and Lichten, M. (1995). The location and structure of double-strand DNA breaks induced during yeast meiosis: evidence for a covalently linked DNA-protein intermediate. *EMBO J.* *14*, 4599–4608. .

Loidl, J. (2006). *S. pombe* linear elements: the modest cousins of synaptonemal complexes. *Chromosoma* *115*, 260–271. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0047-7>.

Louis-Bar, M.D. (1941). Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confin. Neurol.* *4*. <https://doi.org/10.1159/000106149>.

Lui, D.Y., and Colaiácovo, M.P. (2013). Meiotic development in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Exp. Med. Biol.* *757*, 133–170. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_6.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* *3*, 997–1007. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.006>.

Lukaszewicz, A., Howard-Till, R.A., and Loidl, J. (2013). Mus81 nuclease and Sgs1 helicase are essential for meiotic recombination in a protist lacking a synaptonemal complex. *Nucleic Acids Res.* *41*, 9296–9309. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt703>.

Lukaszewicz, A., Lange, J., Keeney, S., and Jasin, M. (2020). De novo deletions and duplications at recombination hotspots in mouse germlines (*Molecular Biology*).

Lustig, A.J., and Petes, T.D. (1986). Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *83*, 1398–1402. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1398>.

Lustig, A.J., Kurtz, S., and Shore, D. (1990). Involvement of the silencer and UAS binding protein RAP1 in regulation of telomere length. *Science* *250*, 549–553. <https://doi.org/10.1126/science.2237406>.

Lydall, D., Nikolsky, Y., Bishop, D.K., and Weinert, T. (1996). A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes. *Nature* *383*, 840–843. <https://doi.org/10.1038/383840a0>.

Ma, Y., and Greider, C.W. (2009). Kinase-Independent Functions of TEL1 in Telomere Maintenance. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 5193–5202. <https://doi.org/10.1128/MCB.01896-08>.

MacGilvray, M.E., Shishkova, E., Place, M., Wagner, E.R., Coon, J.J., and Gasch, A.P. (2020). The phosphoproteome response to dithiothreitol reveals unique versus shared features of *Saccharomyces cerevisiae* stress responses. *J. Proteome Res.* *19*, 3405–3417. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00253>.

Maleki, S., Neale, M.J., Arora, C., Henderson, K.A., and Keeney, S. (2007). Interactions between Mei4, Rec114, and other proteins required for meiotic DNA double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chromosoma* *116*, 471–486. <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0111-y>.

Mallory, J.C., and Petes, T.D. (2000). Protein kinase activity of Tel1p and Mec1p, two *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to the human ATM protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 13749–13754. <https://doi.org/10.1073/pnas.250475697>.

- Malone, R.E., Bullard, S., Hermiston, M., Rieger, R., Cool, M., and Galbraith, A. (1991). Isolation of mutants defective in early steps of meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 128, 79–88. <https://doi.org/10.1093/genetics/128.1.79>.
- Manfrini, N., Guerini, I., Citterio, A., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2010). Processing of meiotic DNA double strand breaks requires cyclin-dependent kinase and multiple nucleases. *J. Biol. Chem.* 285, 11628–11637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.104083>.
- Mantiero, D., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2007). Dual role for *Saccharomyces cerevisiae* Tel1 in the checkpoint response to double-strand breaks. *EMBO Rep.* 8, 380–387. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400911>.
- Marcand, S., Gilson, E., and Shore, D. (1997). A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* 275, 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.275.5302.986>.
- Marcomini, I., and Gasser, S.M. (2015). Nuclear organization in DNA end processing: Telomeres vs double-strand breaks. *DNA Repair* 32, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.024>.
- Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>.
- Marsolier-Kergoat, M.-C., Khan, M.M., Schott, J., Zhu, X., and Llorente, B. (2018). Mechanistic View and Genetic Control of DNA Recombination during Meiosis. *Mol. Cell* 70, 9-20.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.032>.
- Marston, A.L., and Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 983–997. <https://doi.org/10.1038/nrm1526>.
- Martina, M., Clerici, M., Baldo, V., Bonetti, D., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2012). A Balance between Tel1 and Rif2 Activities Regulates Nucleolytic Processing and Elongation at Telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1604–1617. <https://doi.org/10.1128/MCB.06547-11>.
- Martini, E., Diaz, R.L., Hunter, N., and Keeney, S. (2006). Crossover Homeostasis in Yeast Meiosis. *Cell* 126, 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.044>.
- Martini, E., Borde, V., Legendre, M., Audic, S., Regnault, B., Soubigou, G., Dujon, B., and Llorente, B. (2011). Genome-wide analysis of heteroduplex DNA in mismatch repair-deficient yeast cells reveals novel properties of meiotic recombination pathways. *PLoS Genet.* 7, e1002305. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002305>.
- Masison, D.C., Blanc, A., Ribas, J.C., Carroll, K., Sonenberg, N., and Wickner, R.B. (1995). Decoying the cap- mRNA degradation system by a double-stranded RNA virus and poly(A)-mRNA surveillance by a yeast antiviral system. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2763–2771. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.5.2763>.
- de Massy, B. (2013). Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 47, 563–599. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155423>.

de Massy, B., Rocco, V., and Nicolas, A. (1995). The nucleotide mapping of DNA double-strand breaks at the CYS3 initiation site of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *14*, 4589–4598. .

Masui, Y., and Markert, C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* *177*, 129–145. <https://doi.org/10.1002/jez.1401770202>.

Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10389–10394. <https://doi.org/10.1073/pnas.190030497>.

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., et al. (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* *316*, 1160–1166. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>.

McKee, B.D., Yan, R., and Tsai, J.-H. (2012). Meiosis in male *Drosophila*. *Spermatogenesis* *2*, 167–184. <https://doi.org/10.4161/spmg.21800>.

McKim, K.S., Green-Marroquin, B.L., Sekelsky, J.J., Chin, G., Steinberg, C., Khodosh, R., and Hawley, R.S. (1998). Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* *279*, 876–878. <https://doi.org/10.1126/science.279.5352.876>.

McKinnon, P.J. (2012). ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 303–321. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132509>.

McMahill, M.S., Sham, C.W., and Bishop, D.K. (2007). Synthesis-Dependent Strand Annealing in Meiosis. *PLoS Biol.* *5*, e299. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050299>.

Menees, T.M., and Roeder, G.S. (1989). MEI4, a yeast gene required for meiotic recombination. *Genetics* *123*, 675–682. <https://doi.org/10.1093/genetics/123.4.675>.

Merelli, I., Guffanti, A., Fabbri, M., Cocito, A., Furia, L., Grazini, U., Bonnal, R.J., Milanesi, L., and McBlane, F. (2010). RSSsite: a reference database and prediction tool for the identification of cryptic Recombination Signal Sequences in human and murine genomes. *Nucleic Acids Res.* *38*, W262–267. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq391>.

Miao, C., Tang, D., Zhang, H., Wang, M., Li, Y., Tang, S., Yu, H., Gu, M., and Cheng, Z. (2013). CENTRAL REGION COMPONENT1, a Novel Synaptonemal Complex Component, Is Essential for Meiotic Recombination Initiation in Rice[C][W]. *Plant Cell* *25*, 2998–3009. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.113175>.

Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* *455*, 770–774. <https://doi.org/10.1038/nature07312>.

Mimitou, E.P., Yamada, S., and Keeney, S. (2017). A global view of meiotic double-strand break end resection. *Science* *355*, 40–45. <https://doi.org/10.1126/science.aak9704>.

Møens, P.B., and Pearlman, R.E. (1988). Chromatin organization at meiosis. *BioEssays* *9*, 151–153. <https://doi.org/10.1002/bies.950090503>.

- Mohibullah, N., and Keeney, S. (2017). Numerical and spatial patterning of yeast meiotic DNA breaks by Tel1. *Genome Res.* 27, 278–288. <https://doi.org/10.1101/gr.213587.116>.
- Moretto, F., Wood, N.E., Kelly, G., Doncic, A., and van Werven, F.J. (2018). A regulatory circuit of two lncRNAs and a master regulator directs cell fate in yeast. *Nat. Commun.* 9, 780. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03213-z>.
- Morgan, T.H. (1912). Complete linkage in the second chromosome of the male *Drosophila*. *Science* 36, 719–720. .
- Mori, S., and Shirahige, K. (2007). Perturbation of the Activity of Replication Origin by Meiosis-specific Transcription *. *J. Biol. Chem.* 282, 4447–4452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609671200>.
- Morrow, D.M., Tagle, D.A., Shiloh, Y., Collins, F.S., and Hieter, P. (1995). TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* 82, 831–840. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90480-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90480-8).
- Moses, M.J. (1956). Chromosomal Structures in Crayfish Spermatocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 215–218. .
- Mu, X., Murakami, H., Mohibullah, N., and Keeney, S. (2020). Chromosome-autonomous feedback down-regulates meiotic DNA break competence upon synaptonemal complex formation. *Genes Dev.* 34, 1605–1618. <https://doi.org/10.1101/gad.342873.120>.
- Muller, H.J. (1916). The Mechanism of Crossing-Over. *Am. Nat.* 50, 193–221. <https://doi.org/10.1086/279534>.
- Muller, H., Scolari, V.F., Agier, N., Piazza, A., Thierry, A., Mercy, G., Descorps-Declere, S., Lazar-Stefanita, L., Espeli, O., Llorente, B., et al. (2018). Characterizing meiotic chromosomes' structure and pairing using a designer sequence optimized for Hi-C. *Mol. Syst. Biol.* 14, e8293. <https://doi.org/10.15252/msb.20188293>.
- Murakami, H., and Keeney, S. (2014). Temporospatial Coordination of Meiotic DNA Replication and Recombination via DDK Recruitment to Replisomes. *Cell* 158, 861–873. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.028>.
- Murakami, H., and Nicolas, A. (2009). Locally, meiotic double-strand breaks targeted by Gal4BD-Spo11 occur at discrete sites with a sequence preference. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3500–3516. <https://doi.org/10.1128/MCB.00088-09>.
- Murakami, H., Borde, V., Shibata, T., Lichten, M., and Ohta, K. (2003). Correlation between premeiotic DNA replication and chromatin transition at yeast recombination initiation sites. *Nucleic Acids Res.* 31, 4085–4090. .
- Murakami, H., Lam, I., Huang, P.-C., Song, J., van Overbeek, M., and Keeney, S. (2020). Multilayered mechanisms ensure that short chromosomes recombine in meiosis. *Nature* 582, 124–128. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2248-2>.
- Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R.E., Freeman, C., MacFie, T.S., McVean, G., and Donnelly, P. (2010). Drive against hotspot motifs in primates implicates the PRDM9 gene in meiotic recombination. *Science* 327, 876–879. <https://doi.org/10.1126/science.1182363>.

- Nakada, D. (2003). ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev.* *17*, 1957–1962. <https://doi.org/10.1101/gad.1099003>.
- Nandabalan, K., and Roeder, G.S. (1995). Binding of a cell-type-specific RNA splicing factor to its target regulatory sequence. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1953–1960. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.1953>.
- Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* *436*, 1053–1057. <https://doi.org/10.1038/nature03872>.
- Nerusheva, O.O., Galander, S., Fernius, J., Kelly, D., and Marston, A.L. (2014). Tension-dependent removal of pericentromeric shugoshin is an indicator of sister chromosome biorientation. *Genes Dev.* *28*, 1291–1309. <https://doi.org/10.1101/gad.240291.114>.
- Niu, H., Wan, L., Baumgartner, B., Schaefer, D., Loidl, J., and Hollingsworth, N.M. (2005). Partner Choice during Meiosis Is Regulated by Hop1-promoted Dimerization of Mek1. *Mol. Biol. Cell* *16*, 5804–5818. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-05-0465>.
- Niu, H., Li, X., Job, E., Park, C., Moazed, D., Gygi, S.P., and Hollingsworth, N.M. (2007). Mek1 Kinase Is Regulated To Suppress Double-Strand Break Repair between Sister Chromatids during Budding Yeast Meiosis. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 5456–5467. <https://doi.org/10.1128/MCB.00416-07>.
- Ogi, H., Goto, G.H., Ghosh, A., Zencir, S., Henry, E., and Sugimoto, K. (2015). Requirement of the FATC domain of protein kinase Tel1 for localization to DNA ends and target protein recognition. *Mol. Biol. Cell* *26*, 3480–3488. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-05-0259>.
- Oh, J., Al-Zain, A., Cannavo, E., Cejka, P., and Symington, L.S. (2016). Xrs2 Dependent and Independent Functions of the Mre11-Rad50 Complex. *Mol. Cell* *64*, 405–415. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.011>.
- Ohta, K., Shibata, T., and Nicolas, A. (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *EMBO J.* *13*, 5754–5763. .
- Ohta, K., Nicolas, A., Furuse, M., Nabetani, A., Ogawa, H., and Shibata, T. (1998). Mutations in the MRE11, RAD50, XRS2, and MRE2 genes alter chromatin configuration at meiotic DNA double-stranded break sites in premeiotic and meiotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 646–651. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.646>.
- Oliver, P.L., Goodstadt, L., Bayes, J.J., Birtle, Z., Roach, K.C., Phadnis, N., Beatson, S.A., Lunter, G., Malik, H.S., and Ponting, C.P. (2009). Accelerated evolution of the Prdm9 speciation gene across diverse metazoan taxa. *PLoS Genet.* *5*, e1000753. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000753>.
- Oliver-Bonet, M., Campillo, M., Turek, P.J., Ko, E., and Martin, R.H. (2007). Analysis of replication protein A (RPA) in human spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* *13*, 837–844. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam076>.
- Ouspenski, I.I., Elledge, S.J., and Brinkley, B.R. (1999). New yeast genes important for chromosome integrity and segregation identified by dosage effects on genome stability. *Nucleic Acids Res.* *27*, 3001–3008. <https://doi.org/10.1093/nar/27.15.3001>.

Padmore, R., Cao, L., and Kleckner, N. (1991). Temporal comparison of recombination and synaptonemal complex formation during meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* *66*, 1239–1256. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90046-2).

Page, S.L. (2003). Chromosome Choreography: The Meiotic Ballet. *Science* *301*, 785–789. <https://doi.org/10.1126/science.1086605>.

Page, S.L., and Hawley, R.S. (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 525–558. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.155141>.

Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H.G., Tischfield, S.E., Zhu, X., Neale, M.J., Jasin, M., Socci, N.D., et al. (2011). A Hierarchical Combination of Factors Shapes the Genome-wide Topography of Yeast Meiotic Recombination Initiation. *Cell* *144*, 719–731. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.009>.

Panizza, S., Mendoza, M.A., Berlinger, M., Huang, L., Nicolas, A., Shirahige, K., and Klein, F. (2011). Spo11-Accessory Proteins Link Double-Strand Break Sites to the Chromosome Axis in Early Meiotic Recombination. *Cell* *146*, 372–383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.003>.

Parisi, S., McKay, M.J., Molnar, M., Thompson, M.A., van der Spek, P.J., van Drunen-Schoenmaker, E., Kanaar, R., Lehmann, E., Hoeijmakers, J.H., and Kohli, J. (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3515–3528. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3515>.

Parvanov, E.D., Petkov, P.M., and Paigen, K. (2010). Prdm9 controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* *327*, 835. <https://doi.org/10.1126/science.1181495>.

Paull, T.T. (2015). Mechanisms of ATM Activation. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034335>.

Paull, T.T., and Lee, J.-H. (2005). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 737–740. <https://doi.org/10.4161/cc.4.6.1715>.

Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., et al. (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* *122*, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.026>.

Pratto, F., Brick, K., Cheng, G., Lam, K.-W.G., Cloutier, J.M., Dahiya, D., Wellard, S.R., Jordan, P.W., and Camerini-Otero, R.D. (2021). Meiotic recombination mirrors patterns of germline replication in mice and humans. *Cell* *184*, 4251–4267.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.025>.

Prieler, S. (2005). The control of Spo11's interaction with meiotic recombination hotspots. *Genes Dev.* *19*, 255–269. <https://doi.org/10.1101/gad.321105>.

Prieler, S., Chen, D., Huang, L., Mayrhofer, E., Zsótér, S., Vesely, M., Mbogning, J., and Klein, F. (2021). Spo11 generates gaps through concerted cuts at sites of topological stress. *Nature* *594*, 577–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03632-x>.

Puizina, J., Siroky, J., Mokros, P., Schweizer, D., and Riha, K. (2004). Mre11 Deficiency in Arabidopsis Is Associated with Chromosomal Instability in Somatic Cells and Spo11-Dependent Genome Fragmentation during Meiosis. *Plant Cell* *16*, 1968–1978. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022749>.

Putti, S., Giovinazzo, A., Merolle, M., Falchetti, M.L., and Pellegrini, M. (2021). ATM Kinase Dead: From Ataxia Telangiectasia Syndrome to Cancer. *Cancers* *13*, 5498. <https://doi.org/10.3390/cancers13215498>.

Pyatnitskaya, A., Borde, V., and De Muyt, A. (2019). Crossing and zipping: molecular duties of the ZMM proteins in meiosis. *Chromosoma* *128*, 181–198. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00714-8>.

Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *26*, 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.

Raderschall, E., Golub, E.I., and Haaf, T. (1999). Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1921–1926. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.1921>.

Ramírez, F., Ryan, D.P., Grüning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S., Dündar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res.* *44*, W160-165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw257>.

Reimann, J.D., Freed, E., Hsu, J.Y., Kramer, E.R., Peters, J.M., and Jackson, P.K. (2001). Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* *105*, 645–655. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00361-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00361-0).

Ritchie, K.B., and Petes, T.D. (2000). The Mre11p/Rad50p/Xrs2p Complex and the Tel1p Function in a Single Pathway for Telomere Maintenance in Yeast. *Genetics* *155*, 475–479. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.1.475>.

Robert, T., Vrielynck, N., Mézard, C., de Massy, B., and Grelon, M. (2016). A new light on the meiotic DSB catalytic complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* *54*, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.02.025>.

Robert, T., Nore, A., Brun, C., Maffre, C., Crimi, B., and Guichard, V. The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *8* .

Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* *29*, 24–26. <https://doi.org/10.1038/nbt.1754>.

Rockmill, B., and Roeder, G.S. (1988). RED1: a yeast gene required for the segregation of chromosomes during the reductional division of meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 6057–6061. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.6057>.

Rockmill, B., Engebrecht, J.A., Scherthan, H., Loidl, J., and Roeder, G.S. (1995). The yeast MER2 gene is required for chromosome synapsis and the initiation of meiotic recombination. *Genetics* *141*, 49–59. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.1.49>.

- Roeder, G.S., and Bailis, J.M. (2000). The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* *16*, 395–403. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02080-1).
- Roguev, A., Schaft, D., Shevchenko, A., Pijnappel, W.W., Wilm, M., Aasland, R., and Stewart, A.F. (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *EMBO J.* *20*, 7137–7148. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.7137>.
- Rothblum-Oviatt, C., Wright, J., Lefton-Greif, M.A., McGrath-Morrow, S.A., Crawford, T.O., and Lederman, H.M. (2016). Ataxia telangiectasia: a review. *Orphanet J. Rare Dis.* *11*, 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0543-7>.
- Rupnik, A., Lowndes, N.F., and Grenon, M. (2010). MRN and the race to the break. *Chromosoma* *119*, 115–135. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0242-4>.
- Salim, S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *360*, 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>.
- Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B., and Elledge, S.J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* *271*, 357–360. <https://doi.org/10.1126/science.271.5247.357>.
- Sanders, J.R., and Jones, K.T. (2018). Regulation of the meiotic divisions of mammalian oocytes and eggs. *Biochem. Soc. Trans.* *46*, 797–806. <https://doi.org/10.1042/BST20170493>.
- Sasanuma, H., Murakami, H., Fukuda, T., Shibata, T., Nicolas, A., and Ohta, K. (2007). Meiotic association between Spo11 regulated by Rec102, Rec104 and Rec114. *Nucleic Acids Res.* *35*, 1119–1133. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1162>.
- Sasanuma, H., Hirota, K., Fukuda, T., Kakusho, N., Kugou, K., Kawasaki, Y., Shibata, T., Masai, H., and Ohta, K. (2008). Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes Dev.* *22*, 398–410. <https://doi.org/10.1101/gad.1626608>.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., et al. (1995). A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to P1-3 Kinase. *268*, 6. .
- Schalbetter, S.A., Fudenberg, G., Baxter, J., Pollard, K.S., and Neale, M.J. (2019). Principles of meiotic chromosome assembly revealed in *S. cerevisiae*. *Nat. Commun.* *10*, 4795. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12629-0>.
- Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 167–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552>.
- Scherthan, H. (2007). Telomeres and meiosis in health and disease: Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 117–124. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6463-2>.
- Schmekel, K., and Daneholt, B. (1995). The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol.* *5*, 239–242. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(00\)89017-0](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(00)89017-0).

- Schwacha, A., and Kleckner, N. (1997). Interhomolog Bias during Meiotic Recombination: Meiotic Functions Promote a Highly Differentiated Interhomolog-Only Pathway. *Cell* 90, 1123–1135. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80378-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80378-5).
- Schwartz, M.F., Duong, J.K., Sun, Z., Morrow, J.S., Pradhan, D., and Stern, D.F. (2002). Rad9 phosphorylation sites couple Rad53 to the *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint. *Mol. Cell* 9, 1055–1065. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00532-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00532-4).
- Scott, S.P., Bendix, R., Chen, P., Clark, R., Dork, T., and Lavin, M.F. (2002). Missense mutations but not allelic variants alter the function of ATM by dominant interference in patients with breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 925–930. <https://doi.org/10.1073/pnas.012329699>.
- Seidel, J.J., Anderson, C.M., and Blackburn, E.H. (2008). A Novel Tel1/ATM N-Terminal Motif, TAN, Is Essential for Telomere Length Maintenance and a DNA Damage Response. *Mol. Cell Biol.* 28, 5736–5746. <https://doi.org/10.1128/MCB.00326-08>.
- Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., and Greenberg, R.A. (2010). ATM-Dependent Chromatin Changes Silence Transcription In cis to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* 141, 970–981. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.038>.
- Shima, H., Suzuki, M., and Shinohara, M. (2005). Isolation and Characterization of Novel xrs2 Mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 170, 71–85. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.037580>.
- Shinohara, A., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69, 457–470. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90447-k](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90447-k).
- Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol. CB* 14, 1703–1711. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.047>.
- Simoneau, A., Robellet, X., Ladouceur, A.-M., and D'Amours, D. (2014). Cdk1-dependent regulation of the Mre11 complex couples DNA repair pathways to cell cycle progression. *Cell Cycle* 13, 1078–1090. <https://doi.org/10.4161/cc.27946>.
- Slater, M.L., Sharrow, S.O., and Gart, J.J. (1977). Cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* in populations growing at different rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3850–3854. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.9.3850>.
- Smith, A.V., and Roeder, G.S. (1997). The yeast Red1 protein localizes to the cores of meiotic chromosomes. *J. Cell Biol.* 136, 957–967. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.5.957>.
- Smith, D.L., Oke, A., Pollard, M., Anderson, C.M., Zhuge, T., Yam, P., Gromova, T., Conant, K., Chu, D.B., Patel, N.J., et al. (2019). A New Role for Telomerase in Promoting Meiotic Homolog Pairing Fidelity. *BioRxiv* 654376. <https://doi.org/10.1101/654376>.
- Smith, K.N., Penkner, A., Ohta, K., Klein, F., and Nicolas, A. (2001). B-type cyclins CLB5 and CLB6 control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis. *Curr. Biol. CB* 11, 88–97. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00026-4](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00026-4).

Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10364–10369. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701622104>.

Sollier, J., Lin, W., Soustelle, C., Suhre, K., Nicolas, A., Géli, V., and de La Roche Saint-André, C. (2004). Set1 is required for meiotic S-phase onset, double-strand break formation and middle gene expression. *EMBO J.* *23*, 1957–1967. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600204>.

Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F., and Schlenstedt, G. (2000). Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 8468–8479. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.22.8468-8479.2000>.

Sommermeier, V., Béneut, C., Chaplais, E., Serrentino, M.E., and Borde, V. (2013). Spp1, a Member of the Set1 Complex, Promotes Meiotic DSB Formation in Promoters by Tethering Histone H3K4 Methylation Sites to Chromosome Axes. *Mol. Cell* *49*, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.008>.

Storey, A.J., Wang, H.-P., Protacio, R.U., Davidson, M.K., Tackett, A.J., and Wahls, W.P. (2018). Chromatin-mediated regulators of meiotic recombination revealed by proteomics of a recombination hotspot. *Epigenetics Chromatin* *11*, 64. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0233-x>.

Subramanian, V.V., and Hochwagen, A. (2014). The Meiotic Checkpoint Network: Step-by-Step through Meiotic Prophase. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a016675. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016675>.

Subramanian, V.V., Zhu, X., Markowitz, T.E., Vale-Silva, L.A., San-Segundo, P.A., Hollingsworth, N.M., Keeney, S., and Hochwagen, A. (2019). Persistent DNA-break potential near telomeres increases initiation of meiotic recombination on short chromosomes. *Nat. Commun.* *10*, 970. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08875-x>.

Sugawara, N., Goldfarb, T., Studamire, B., Alani, E., and Haber, J.E. (2004). Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9315–9320. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305749101>.

Sun, H., Treco, D., and Szostak, J.W. (1991). Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. *Cell* *64*, 1155–1161. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90270-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90270-9).

Sun, X., Huang, L., Markowitz, T.E., Blitzblau, H.G., Chen, D., Klein, F., and Hochwagen, A. (2015). Transcription dynamically patterns the meiotic chromosome-axis interface. *ELife* *4*, e07424. <https://doi.org/10.7554/eLife.07424>.

Swift, M., Morrell, D., Cromartie, E., Chamberlin, A.R., Skolnick, M.H., and Bishop, D.T. (1986). The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum. Genet.* *39*, 573–583. .

Syllaba, L., and Henner, K. (1926). Contribution a l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. *Rev. Neurol. (Paris)* *1*, 541–560. .

- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F.R., Bauer, C., and Gasser, S.M. (2004). Separation of silencing from perinuclear anchoring functions in yeast Ku80, Sir4 and Esc1 proteins. *EMBO J.* 23, 1301–1312. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600144>.
- Tannous, E.A., and Burgers, P.M. (2021). Novel insights into the mechanism of cell cycle kinases Mec1(ATR) and Tel1(ATM). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 56, 441–454. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1925218>.
- Taylor, A.M.R., Groom, A., and Byrd, P.J. (2004). Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair* 3, 1219–1225. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.04.009>.
- Taylor, A.M.R., Rothblum-Oviatt, C., Ellis, N.A., Hickson, I.D., Meyer, S., Crawford, T.O., Smogorzewska, A., Pietrucha, B., Weemaes, C., and Stewart, G.S. (2019). Chromosome instability syndromes. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5, 64. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0113-0>.
- Tease, C., and Jones, G.H. (1978). Analysis of Exchanges in Differentially Stained Meiotic Chromosomes of *Locusta migratoria* After BrdU-Substitution and FPG Staining. 16. .
- Telatar, M., Teraoka, S., Wang, Z., Chun, H.H., Liang, T., Castellvi-Bel, S., Udar, N., Borresen-Dale, A.L., Chessa, L., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., et al. (1998). Ataxia-telangiectasia: identification and detection of founder-effect mutations in the ATM gene in ethnic populations. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 86–97. <https://doi.org/10.1086/301673>.
- Thacker, D., Mohibullah, N., Zhu, X., and Keeney, S. (2014). Homologue engagement controls meiotic DNA break number and distribution. *Nature* 510, 241–246. <https://doi.org/10.1038/nature13120>.
- Thomas, J.H., Emerson, R.O., and Shendure, J. (2009). Extraordinary molecular evolution in the PRDM9 fertility gene. *PloS One* 4, e8505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008505>.
- Thomas, S.E., Soltani-Bejnood, M., Roth, P., Dorn, R., Logsdon, J.M., and McKee, B.D. (2005). Identification of two proteins required for conjunction and regular segregation of achiasmate homologs in *Drosophila* male meiosis. *Cell* 123, 555–568. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.043>.
- Tisi, R., Vertemara, J., Zampella, G., and Longhese, M.P. (2020). Functional and structural insights into the MRX/MRN complex, a key player in recognition and repair of DNA double-strand breaks. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18, 1137–1152. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.013>.
- Tittel-Elmer, M., Alabert, C., Pasero, P., and Cobb, J.A. (2009). The MRX complex stabilizes the replisome independently of the S phase checkpoint during replication stress. *EMBO J.* 28, 1142–1156. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.60>.
- Tran, P.T., Erdeniz, N., Dudley, S., and Liskay, R.M. (2002). Characterization of nuclease-dependent functions of Exo1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 1, 895–912. [https://doi.org/10.1016/s1568-7864\(02\)00114-3](https://doi.org/10.1016/s1568-7864(02)00114-3).

- Trelles-Sticken, E., Loidl, J., and Scherthan, H. (1999). Bouquet formation in budding yeast: initiation of recombination is not required for meiotic telomere clustering. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 5), 651–658. .
- Trelles-Sticken, E., Dresser, M.E., and Scherthan, H. (2000). Meiotic Telomere Protein Ndj1p Is Required for Meiosis-Specific Telomere Distribution, Bouquet Formation and Efficient Homologue Pairing. *J. Cell Biol.* *151*, 95–106. .
- Tsukamoto, Y., Mitsuoka, C., Terasawa, M., Ogawa, H., and Ogawa, T. (2005). Xrs2p Regulates Mre11p Translocation to the Nucleus and Plays a Role in Telomere Elongation and Meiotic Recombination□D. *Mol. Biol. Cell* *16*, 12. .
- Tsukuda, T., Fleming, A.B., Nickoloff, J.A., and Ann Osley, M. (2005). Chromatin Remodeling at a DNA Double-Strand Break Site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *438*, 379–383. <https://doi.org/10.1038/nature04148>.
- Tung, K.S., and Roeder, G.S. (1998). Meiotic chromosome morphology and behavior in zip1 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *149*, 817–832. .
- Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* *425*, 859–864. <https://doi.org/10.1038/nature02062>.
- Usui, T., Ohta, T., Oshiumi, H., Tomizawa, J., Ogawa, H., and Ogawa, T. (1998). Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* *95*, 705–716. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81640-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81640-2).
- Usui, T., Ogawa, H., and Petrini, J.H.J. (2001). A DNA Damage Response Pathway Controlled by Tel1 and the Mre11 Complex. *Mol. Cell* *7*, 1255–1266. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00270-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00270-2).
- Vialard, J.E., Gilbert, C.S., Green, C.M., and Lowndes, N.F. (1998). The budding yeast Rad9 checkpoint protein is subjected to Mec1/Tel1-dependent hyperphosphorylation and interacts with Rad53 after DNA damage. *EMBO J.* *17*, 5679–5688. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5679>.
- Viscardi, V., Bonetti, D., Cartagena-Lirola, H., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2007). MRX-dependent DNA damage response to short telomeres. *Mol. Biol. Cell* *18*, 3047–3058. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0285>.
- Volpe, J.M., and Kepler, T.B. (2008). Large-scale analysis of human heavy chain V(D)J recombination patterns. *Immunome Res.* *4*, 3. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-4-3>.
- Vrielynck, N., Chambon, A., Vezon, D., Pereira, L., Chelysheva, L., Muyt, A.D., Mézard, C., Mayer, C., and Grelon, M. (2016). A DNA topoisomerase VI-like complex initiates meiotic recombination. *Science* *351*, 939–943. <https://doi.org/10.1126/science.aad5196>.
- Wanat, J.J., Kim, K.P., Koszul, R., Zanders, S., Weiner, B., Kleckner, N., and Alani, E. (2008). Csm4, in collaboration with Ndj1, mediates telomere-led chromosome dynamics and recombination during yeast meiosis. *PLoS Genet.* *4*, e1000188. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000188>.

- Wang, S., Zickler, D., Kleckner, N., and Zhang, L. (2015). Meiotic crossover patterns: Obligatory crossover, interference and homeostasis in a single process. *Cell Cycle* *14*, 305–314. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.991185>.
- Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* *400*, 461–464. <https://doi.org/10.1038/22774>.
- Waterman, D.P., Haber, J.E., and Smolka, M.B. (2020). Checkpoint Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Annu. Rev. Biochem.* *89*, annurev-biochem-011520-104722. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-104722>.
- Wells, D.J. (2020). Delineation of meiotic gene expression in male mice. <http://purl.org/dc/dcmitype/Text>. University of Oxford.
- Wendorff, T.J., and Berger, J.M. (2018). Topoisomerase VI senses and exploits both DNA crossings and bends to facilitate strand passage. *ELife* *7*, e31724. <https://doi.org/10.7554/eLife.31724>.
- van Werven, F.J., Neuert, G., Hendrick, N., Lardenois, A., Buratowski, S., van Oudenaarden, A., Primig, M., and Amon, A. (2012). Transcription of two long noncoding RNAs mediates mating-type control of gametogenesis in budding yeast. *Cell* *150*, 1170–1181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.049>.
- 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 al. (2019). A conserved filamentous assembly underlies the structure of the meiotic chromosome axis. *ELife* *8*, e40372. <https://doi.org/10.7554/eLife.40372>.
- West, A.M.V., Komives, E.A., and Corbett, K.D. (2018). Conformational dynamics of the Hop1 HORMA domain reveal a common mechanism with the spindle checkpoint protein Mad2. *Nucleic Acids Res.* *46*, 279–292. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1196>.
- Williamson, D.H., Johnston, L.H., Fennell, D.J., and Simchen, G. (1983). The timing of the S phase and other nuclear events in yeast meiosis. *Exp. Cell Res.* *145*, 209–217. [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(83\)80022-6](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(83)80022-6).
- Wiltzius, J.J.W., Hohl, M., Fleming, J.C., and Petrini, J.H.J. (2005). The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 403–407. <https://doi.org/10.1038/nsmb928>.
- Wojtasz, L., Daniel, K., Roig, I., Bolcun-Filas, E., Xu, H., Boonsanay, V., Eckmann, C.R., Cooke, H.J., Jasin, M., Keeney, S., et al. (2009). Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet.* *5*, e1000702. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000702>.
- Wotton, D., and Shore, D. (1997). A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *11*, 748–760. <https://doi.org/10.1101/gad.11.6.748>.
- Wu, T.C., and Lichten, M. (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* *263*, 515–518. <https://doi.org/10.1126/science.8290959>.

- Wu, T.C., and Lichten, M. (1995). Factors That Affect the Location and Frequency of Meiosis-Induced Double-Strand Breaks in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* *140*, 55–66. .
- Wu, H.-Y., Ho, H.-C., and Burgess, S.M. (2010). Mek1 kinase governs outcomes of meiotic recombination and the checkpoint response. *Curr. Biol.* *CB* *20*, 1707–1716. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.016>.
- Wu, Y., Xiao, S., and Zhu, X.-D. (2007). MRE11-RAD50-NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 832–840. <https://doi.org/10.1038/nsmb1286>.
- Xiao, J., Rao, Q., and Xu, Y. (2021). The activation mechanisms of master kinases in the DNA damage response. *Genome Instab. Dis.* *2*, 211–224. <https://doi.org/10.1007/s42764-021-00045-y>.
- Xin, J., Xu, Z., Wang, X., Tian, Y., Zhang, Z., and Cai, G. (2019). Structural basis of allosteric regulation of Tel1/ATM kinase. *Cell Res.* <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0176-1>.
- Xu, L., and Kleckner, N. (1995). Sequence non-specific double-strand breaks and interhomolog interactions prior to double-strand break formation at a meiotic recombination hot spot in yeast. *EMBO J.* *14*, 5115–5128. .
- Xu, L., Ajimura, M., Padmore, R., Klein, C., and Kleckner, N. (1995). NDT80, a meiosis-specific gene required for exit from pachytene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 6572–6581. .
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* *10*, 2411–2422. <https://doi.org/10.1101/gad.10.19.2411>.
- Yadav, V.K., and Claeys Bouuaert, C. (2021). Mechanism and Control of Meiotic DNA Double-Strand Break Formation in *S. cerevisiae*. *Front. Cell Dev. Biol.* *0*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.642737>.
- Yamamoto, K., Wang, Y., Jiang, W., Liu, X., Dubois, R.L., Lin, C.-S., Ludwig, T., Bakkenist, C.J., and Zha, S. (2012). Kinase-dead ATM protein causes genomic instability and early embryonic lethality in mice. *J. Cell Biol.* *198*, 305–313. <https://doi.org/10.1083/jcb.201204098>.
- Yamamoto, K., Wang, J., Sprinzen, L., Xu, J., Haddock, C.J., Li, C., Lee, B.J., Loredan, D.G., Jiang, W., Vindigni, A., et al. (2016). Kinase-dead ATM protein is highly oncogenic and can be preferentially targeted by Topo-isomerase I inhibitors. *ELife* *5*. <https://doi.org/10.7554/eLife.14709>.
- Yamashita, K., Shinohara, M., and Shinohara, A. (2004). Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 11380–11385. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400078101>.
- Yates, L.A., Williams, R.M., Hailemariam, S., Ayala, R., Burgers, P., and Zhang, X. (2020). Cryo-EM Structure of Nucleotide-Bound Tel1/ATM Unravels the Molecular Basis of Inhibition and Structural Rationale for Disease-Associated Mutations. *Struct. England* *28*, 96-104.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.10.012>.

Yatskevich, S., Rhodes, J., and Nasmyth, K. (2019). Organization of Chromosomal DNA by SMC Complexes. *Annu. Rev. Genet.* *53*, 445–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043633>.

You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5363–5379. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.13.5363-5379.2005>.

Young, J.A., Hyppa, R.W., and Smith, G.R. (2004). Conserved and nonconserved proteins for meiotic DNA breakage and repair in yeasts. *Genetics* *167*, 593–605. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.023762>.

Yu, T.-Y., Kimble, M.T., and Symington, L.S. (2018). Sae2 antagonizes Rad9 accumulation at DNA double-strand breaks to attenuate checkpoint signaling and facilitate end resection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E11961–E11969. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816539115>.

Zakharyevich, K., Ma, Y., Tang, S., Hwang, P.Y.-H., Boiteux, S., and Hunter, N. (2010). Temporally and biochemically distinct activities of Exo1 during meiosis: double-strand break resection and resolution of double Holliday junctions. *Mol. Cell* *40*, 1001–1015. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.11.032>.

Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y., and Hunter, N. (2012). Delineation of Joint Molecule Resolution Pathways in Meiosis Identifies a Crossover-Specific Resolvase. *Cell* *149*, 334–347. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.023>.

Zhang, L., Kim, K.P., Kleckner, N.E., and Storlazzi, A. (2011). Meiotic double-strand breaks occur once per pair of (sister) chromatids and, via Mec1/ATR and Tel1/ATM, once per quartet of chromatids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 20036–20041. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117937108>.

Zhang, L.-L., Wu, Z., and Zhou, J.-Q. (2018). Tel1 and Rif2 oppositely regulate telomere protection at uncapped telomeres in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* *45*, 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2018.09.001>.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* *9*, R137. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>.

Zhu, Z., Chung, W.-H., Shim, E.Y., Lee, S.E., and Ira, G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* *134*, 981–994. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037>.

Zickler, D., and Kleckner, N. (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a016626. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626>.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Construction des souches

Les souches réalisées et utilisées sont toutes en fond SK1. Le génotype des souches est répertorié dans la Table des souches.

FLAG-Tel1

Afin de générer la souche étiquetée *3xFLAG-TEL1* en fond SK1, nous avons amplifié la région 5' de la souche 12182A (BY4741) *3xFLAG-TEL1* générée par l'équipe de Seidel *et al.* (Seidel *et al.*, 2008). Le fragment PCR contenant l'étiquette et la région 5' de *TEL1* a ensuite été transformé dans une souche SK1 contenant une cassette *URA3* en amont du gène *TEL1*. Les clones ont été sélectionnés sur 5-FOA et l'insertion de l'étiquette a été vérifiée par PCR. Les différentes souches étiquetées *FLAG-TEL1* ont ensuite été générées par croisement avec les souches mutées préétablies.

Phosphomutants de Mre11

Le gène *MRE11* est cloné dans un plasmide pFA6-3HA-KAN::MX6. Les mutations ponctuelles permettant la génération des phosphomutants de Mre11 sont introduites par PCR mutagenèse selon le kit « Quick Change Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis » (Agilent Technologies) avec les amorces répertoriées dans la Table des amorces. Le fragment *mre11-4A-3HA-KAN::MX6* est généré par amplification PCR et transformé dans notre souche de référence VG737. Les clones obtenus sont vérifiés par séquençage puis croisés avec une souche *sae2Δ*. Afin de générer des phosphomutants Mre11 sans étiquette HA, le gène *mre11-4A* précédemment généré est amplifié par PCR avec des amorces longues contenant un codon STOP (*cf.* Table des amorces), puis cloné dans le plasmide pFA6-hph::NT1. Le fragment *mre11-4A-hph-NT1* généré par amplification PCR est transformé dans la souche de référence 737. Les clones obtenus sont vérifiés par séquençage puis croisés avec une souche *sae2Δ*.

Phosphomutants Fun30 et Fun30-K603R

Les ARN guides permettant de générer les mutations *S383A*, *T976A*, *T1000A* et *K603R* sont clonés dans le plasmide pRS425-Cas9-2xSapI (*cf.* Table des amorces). Les fragments de réparations sont générés par hybridation d'amorces contenant les mutations ponctuelles à introduire (*cf.* Table des amorces). Les plasmides Cas9 et les fragments de réparation sont ensuite co-transformés dans la souche de référence (VG737) et les clones obtenus sont vérifiés par séquençage.

Cinétique méiotique

8 – 10 colonnies isolées sont mises en culture dans 10mL de YPD supplémenté en AU (Yeast Extract 1%, Peptone 2%, Glucose 2%, Adenine and Uracil 0,0137%) 30h à 30°C avec une agitation à 210rpm. 0.2OD/mL de cellules sont ensuite incubées dans 200mL de milieu de présporulation SPS (Yeast Extract 0.5%, Peptone 1%, Yeast Nitrogen Base 0.17%, Potassium Acetate 1%, Sulphate d'Ammonium 0,5%, Potassium Hydrogen phthalate 0.05M, Antifoam

0.001%) pendant 14h à 30°C avec une agitation à 250rpm. Les cellules sont ensuite lavées deux fois à l'eau et placées dans 200mL de milieu de sporulation à 30°C, agitation 250rpm. Des échantillons sont ensuite récoltés à différents temps et selon différents protocoles en fonction des expériences suivantes.

Test en goutte

Des colonies isolées sont mises en pré-culture sur la nuit, puis en culture YPD à 0,2OD/ml. En phase exponentielle (~0,8OD/ml), les cellules sont diluées en séries (dilution par 4). Une goutte de chaque dilution est ensuite placée sur YPD ou en présence d'agents génotoxiques : HU 10mM, 50mM, 100mM ; MMS 0,02% ; CPT 10µM, 20µM.

Analyse par FACS

Des échantillons de cultures récoltés au cours de cinétiques méiotiques sont fixés à l'éthanol 70%. Après lavage en Tris-HCl 50mM pH7,5, le contenu en ARN des cellules est digéré par ajout de Tris-HCl 50mM pH7,5 et RNase A (stock 10mg/ml). Les cellules sont soniquées brièvement (3x10''ON/10''OFF) puis incubées 2 à 3 heures à 42°C. Après centrifugation, les cellules sont re-suspendues en Tris-HCl 50mM pH7,5 et protéinase K (stock 20mg/ml), puis incubées 30min à 50°C. Les cellules sont lavées et re-suspendues dans ~200µl de Tris-HCl 50mM pH7,5. Le contenu en ADN des cellules est marqué par Sytox Green (1µM final).

Progression méiotique au DAPI

Au cours de cinétique méiotique, des échantillons de cellules sont fixés à l'éthanol 70%. La progression méiotique est suivie par marquage des cellules au DAPI (stock 1mg/ml). Au microscope à fluorescence, le nombre de noyaux par cellules est compté (1, 2 ou 4 noyaux). Pour chaque échantillon, 200 cellules sont comptées.

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Les immunoprécipitations de la chromatine (ChIP) ont été réalisées sur $2 \cdot 10^8$ cellules fixées au paraformaldéhyde (1% final) pendant 30min pour un ChIP de la protéine FLAG-Tel1 et 15min pour les protéines FLAG-Spo11 et Mre11. La réaction est arrêtée par ajout de Glycine 125mM final. La lyse des cellules se fait par ajout de tampon de lyse (50mM HEPES-KOH pH7,5, 140mM NaCl, 1mM EDTA pH8, 1% Triton X-100, 0,1% Sodium Deoxycholate) complété en inhibiteur de protéase (Roche), PMSF 1mM final, pepstatine (0,1mM final) et leupeptine (1mM final). L'ADN est fragmenté à 500 – 1000pb par sonication (30sec ON/30sec OFF, 6 cycles, Diagenode Bioruptor Pico). La chromatine est immunoprécipitée via l'ajout de 2µl d'anti-FLAG (M2 monoclonal, Sigma, référence F1804), ou 1µl d'anti Mre11 (polyclonal, Abcam, ab12159) pendant 2h à 4°C. Les billes magnétiques, Pan-IgG Mouse et Protéine G respectivement, sont ajoutées aux échantillons pour 2hrs à 4°C. Après lavages au tampon de lyse, tampon 500 (50mM HEPES-KOH pH7,5, 500mM NaCl, 1mM EDTA pH8, 1% Triton X-100, 0,1% Sodium Deoxycholate), tampon LiCl (10mM Tris-HCl pH8, 0,25LiCl, 1mM EDTA pH8, 0,5% Triton X-100, 0,5% Sodium Deoxycholate), et TE 1X, les complexes protéines-ADN sont élués

par TE 1X + 0,5% SDS à 65°C pendant 10min. Les protéines sont dissociées de l'ADN par incubation à 65°C sur la nuit.

Les échantillons sont ensuite traités à la RNase A (20µg total) 15min à 37°C et la Protéinase K (100µg total) 1hr à 42°C, avant d'être purifié sur colonne (Qiagen DNA Purification kit).

PCR quantitative

L'enrichissement des protéines aux loci d'intérêts a été mesuré par PCR quantitative (qPCR). L'ADN est amplifié en utilisant le TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus), et des oligonucléotides spécifiques, répertorié dans le Tableau des amorces pour qPCR. Pour chaque échantillon le %IP est calculé en normalisant la quantité d'ADN finale (IP) sur la quantité d'ADN totale (INPUT) : $IP/INPUT \times 100$. L'enrichissement relatif aux loci *ARE1*, *ATF2*, *GAT1*, *YBP1* et *GRR1* a été calculé par rapport au site contrôle *CDC39* comme suivant : $\%IP_{ARE1}/\%IP_{CDC39}$.

Analyse des résultats de ChIP-qPCR via R studio

```
#Chargement des librairies nécessaires
```

```
library(ggplot2)
```

```
library(ggpubr)
```

```
#Script pour le chargement des données et la génération des dot plots
```

```
#Les données doivent être en amont classées par colonne de telle sorte : Souche - Site ou Hotspot - Hours - FE ou IP
```

```
#Un fichier .csv est ensuite généré
```

```
#La génération du graphique du Fold Enrichement sur FLAG-Tell en fond WT a été pris en exemple ici
```

```
#Chargement Data
```

```
WT<-read.csv2("ChIP_Tell_WT_FE.csv", h=T) #chargement des données et attribution d'un nom d'appel
```

```
head(WT) #visualisation des premières lignes de données
```

```
#Dot plot
```

```
WT_FE<-ggdotplot(WT, x="Hours", y="FE", #génération du dot plot à partir du jeu de données
```

```
fill = "Hotspot", palette="jco", size=0.5, binwidth = 0.000015, ylim=c(0,3.5), #paramètre du graphique - couleur des points, taille des points, maximum en ordonnée
```

```
facet.by="Hotspot", panel.labs.background = list(fill="white", color = "white"), #génération de différents panneaux pour chaque sites testés
```

```
add="mean_sd", add.param=list(color="red") )+ #calcul et ajout de la moyenne et de l'écart-type au graphique scale_fill_manual(values=c("#2E86C1", "#7CAE00", "#D01C8B"))+ #coloration des points en fonction du site testé
```

```
#Mise en en forme du graphique - légendes des axes, nombre de répétition, taille et position du texte
```

```

labs(title= "FLAG-Tel1", x="Hours in SPM",y="Fold Enrichement (DSB
site vs Control site)", caption= "(n=7)")+
theme(plot.title = element_text(hjust= "0.5", face="bold"),
      legend.title = element_text(face="bold"),
      legend.position= "right",
      axis.title = element_text(face="bold"),
      strip.text.x = element_text(size=9)
)+
#Calcul et affichage de la p-valeur apr•s T-Test
stat_compare_means(method = "t.test", paired=TRUE,
label="p.format", label.y = 3.5)
#Affichage du graphique
WT_FE

```

ChIP suivi d'un séquençage (ChIP-seq)

Les ChIP suivi d'un séquençage ont été réalisées sur 2.10^8 cellules fixées au paraformaldéhyde (1% final) pendant 30min les protéines étiquetées FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11. La réaction est arrêtée par ajout de Glycine 125mM final. Les billes magnétiques couplé à des protéines G sont lavées (0,1M NaP, 0,01% Tween20, pH 8,2) et pré-incubées en tampon de saturation (0,1NaP, 0,01% Tween20, 5mg/ml BSA) pendant 3h à 4°C avec rotation. Les anticorps anti-FLAG (M2 monoclonal, Sigma) sont pré-incubés avec les billes magnétiques à 4°C pendant 4h avec rotation. Les cellules sont lysées par ajout du tampon de lyse (50mM HEPES-KOH pH7,5, 140mM NaCl, 1mM EDTA pH8, 1% Triton X-100, 0,1% Sodium Deoxycholate) supplémenté en PMSF (1mM final), pepstatine (0,1mM final), leupeptine (1mM final) et tablette d'inhibiteur de protéase (Compleat Mini EDTA, Roche) et lyse mécanique *via* FastPrep (4 cycles de 30sec à 6,5M/s). L'ADN est fragmenté par sonication en grand volume (tube Diagenode 15mL) par ajout de billes (900 – 1000mg, Diagenode) avec un programme de 70cycles 30''ON/30''OFF (Diagenode Bioruptor Pico) à 4°C. Les protéines d'intérêts associées à la chromatine sont immunoprécipitées par incubation sur la nuit à 4°C avec rotation avec des anticorps anti-FLAG, pré-associés avec des billes magnétiques. Après lavages au tampon de lyse, tampon 500 (50mM HEPES-KOH pH7,5, 500mM NaCl, 1mM EDTA pH8, 1% Triton X-100, 0,1% Sodium Deoxycholate), tampon LiCl (10mM Tris-HCl pH8, 0,25LiCl, 1mM EDTA pH8, 0,5% NP-40, 0,5% Sodium Deoxycholate), et TE 1X, l'ADN est élué à l'aide du kit IPure v2 Diagenode. La quantité d'ADN est mesurée par QuBit. La qualité de la fragmentation de l'ADN est contrôlée par puce Agilent (Bio-analyser).

Le séquençage a été réalisé avec un NovaSeq (Illumina) selon la procédure TruSeq (protocole « paired-end » de 100nt), *via* la plateforme de séquençage de l'Institut Curie (Paris, France).

Analyse Bioinformatique du ChIP-seq

L'alignement des séquences et les analyses bioinformatiques présentés dans ce manuscrit ont été réalisés par Julien Vernerey (plateforme Cibi, CRCM, Marseille, France). Les méthodes d'analyses ont été rédigées en anglais et ne seront pas traduites.

Alignment

Sequencing quality control was determined using FastQC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and aggregated across samples using MultiQC (version, REF). Reads with Phred quality score less than 30 were filtered out. For ChIP-seq, paired-end reads were mapped to *Saed2Dh4L2* *saccharomyces cerevisiae* reference genome using Bowtie2 (v2.3.4.3) (Langmead and Salzberg, 2012) with default parameters. Only mapped reads were filtered in using samtools (v1.9) (Li et al., 2009) (*view; --exclude-flags 4*). Duplicate tags were removed using Picard Tools (v2.20.2) (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) (*MarkDuplicates; REMOVE_DUPLICATES=true*) and mapped tags were processed for further analysis. It is important to note that for all subsequent analyses, mitochondrial genome, plasmid genome, and ribosomal DNA (rDNA) loci were blacklisted and removed.

Peak calling

High confidence binding sites were determined using MACS2 *callpeak* (v2.1.2) (Zhang et al., 2008) in broad mode (*--broad; --broad-cutoff 0.005; --qvalue 0.01*). Each sample's fragment size was previously computed by deepTools (*bamPEFragmentSize*) and used through the *--extsize* option. Inputs were used as controls.

Bigwig

For visualization purpose, mapped tags were converted into BigWig - normalized by their library size - using the deepTools (v3.2.1) (Ramírez et al., 2016) (*bamCoverage*). All sequencing data were visualized using the Integrative Genomics Viewer (IGV; v2.5.2) (Robinson et al., 2011).

Peak profiles

Profiles of ChIPseq signals were obtained by processing normalized bigwig files through the deepTools (*computeMatrix; --referencePoint center; --binSize=50*) and then using custom R scripts for visualization.

Chromosome profiles

Saed2DH4L2 mapped tags were counted within 1000 bp bins (*bedtools makewindows -w 1000*) throughout the genome using featureCounts (v1.6.4) (Liao et al., 2014). Signal values were then normalized by library size, smoothed by applying Hann function with different window sizes (2.5, 5, 10, 25 and 50kb), and displayed using homemade R scripts.

Centromere – Telomere plot profiles

Saed2DH4L2 mapped tags were counted across 1000bp binned (*bedtools makewindows -w 1000*) genomic regions using featureCounts. Signal values were normalized by library size, averaged according to their absolute distance to the feature of interest (e.g. centromere or telomere), and smoothed using ggplot2 (v3.1.1) (<https://ggplot2.tidyverse.org>) (*geom_smooth; method = 'loess'*).

Venn diagrams

Venn diagrams analyses were performed from peak coordinates bed files obtained from macs2 peak caller and using python matplotlib_venn package (v0.11.5) (<https://github.com/konstantint/matplotlib-venn>) for visualization. Peaks were intersected using bedtools *intersect* (v2.28.0) (Quinlan and Hall, 2010) with a minimum overlap of 1-base. Overlaps significance was determined by hypergeometric test (see Statistics section).

Since a peak is not a single entity and can intersect with multiple peaks, it is worth noting that during intersect processes; we needed to merge peaks for comparison. This can lead to some small variations where, a same dataset can have different total peak number, according to the considered intersection.

Correlation analysis

Replicates concurrency was verified using deepTools correlation heatmaps (*plotCorrelation --whatToPlot heatmap*) and by computing homemade scatter plots. Briefly, read counting were applied between replicates on "between-replicates" merged peak sets using featureCounts. Replicates counts were then normalized by library size and plot together using custom R scripts. Coefficient of determination (R^2) and associated p-value were determined using linear model fitting function (*lm*). Dots were colored according to their distance to the linear model (*i.e.* residual values).

For cross-mark correlation analysis (*e.g.* Tel1 versus Spo11), replicate counts from the same mark were merged together. In analysis involving Spo11 oligos (*e.g.* Tel1 versus Spo11 oligos), read counts were performed on Spo11 oligos hotspots coordinates only.

Statistic

Concerning Venn diagram analysis, overlap significances were computed by hypergeometric tests (*phyper; lower.tail = false*).

Extraction d'ADN génomique

Des sphéroplastes de cellules sont préparés par ajout de tampon (1M Sorbitol, 100mM NaH₂PO₄ pH7,2, 100mM EDTA, 1% 2-mercaptoethanol, 0,25mg/ml zymo 100T) et incubation 30min à 37°C. La lyse des sphéroplastes s'effectue ensuite par ajout de 3% SDS, 0,1M EDTA et de 1mg/ml Protéinase K, 1h à 60°C. Un traitement au phénol/chloroforme permet la précipitation des protéines, et la phase supérieure est récupérée. L'ADN est précipité par ajout de 3M NaAc pH5,2 et éthanol (50% puis 70% final). L'ARN est éliminé par traitement RNase A (1mg/ml). Après traitement à la RNase, l'ADN est à nouveau précipité à l'éthanol.

Analyse de la formation de cassure de l'ADN par Southern Blot

Pour visualiser et mesurer les DSBs formées à différents loci (voir Table des sondes), l'ADN est digéré avec l'enzyme de restriction appropriée. Après migration sur gel d'agarose en TBE 1X ~15h et fragmentation des grands fragments d'ADN par irradiation aux UVs (1800J/m²), l'ADN est transféré sur membrane de nylon (Hybond XL ou Zetaprobe) en condition dénaturante

(NaOH 0,4M) et fixé via irradiation aux UVs (1200J/m²). Les membranes sont ensuite hybridées avec la sonde marquée radioactivement (P³²dCTPs) souhaitée.

La visualisation et la mesure des fréquences de double-cassures se fait par la migration d'ADN non digéré, selon le même protocole.

Extraction de protéines et Western Blot

Les protéines sont purifiées par lyse des cellules en TCA 10%. Les protéines sont séparées par migration en gel SDS-PAGE 6,5%, pour la détection de FLAG-Tel1, et 8% pour la détection de Mre11, puis transférées sur membrane de nitrocellulose 0,45µm. Après une étape de saturation en BSA 5%-PBST, les anticorps primaires anti-FLAG (M2 monoclonal Sigma, référence F1804) ou anti-Mre11 (Abcam, ab12159) sont ajoutés sur la nuit. Les membranes sont incubées 2hrs en présence d'anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP, anti-souris et anti-lapin respectivement, avant révélation par kit HCL (ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham™).

Gel d'électrophorèse en champs pulsé (PFGE)

Les cellules sont lysées dans la solution 1 (1M Sorbitol, 0.1M Citrate de Sodium, 50mM EDTA, 2% β-mercaptoethanol, 1mg/ml de zymolyase 100T) directement en plug d'agarose (1% LMP). Après solidification des plugs à 4°C pendant 30min, les plugs sont incubés en solution 2 (20mM Tris-HCl pH8, 45mM EDTA, 1% β-mercaptoethanol et 10µg/ml RNase final) pendant 2 heures à 37°C, puis en solution 3 (20mM Tris-HCl pH8, 25mM EDTA, 1% Sodium de Sarcosine et 1mg/ml protéinase K) sur la nuit à 55°C. Après lavage en 50mM EDTA, les plugs sont stockés dans un tampon de stockage (50mM EDTA, 50% glycerol).

Le système CHEF-DRII PFGE system (Biorad) a été utilisé pour fragmenter les chromosomes. Les plugs sont scellés dans un gel d'agarose 1%, 0.5X TBE. La migration est réalisée en suivant le programme suivant :

Block 1 → Initial Switch Time 30sec ; Final Switch Time 30sec ; Voltage 6V/cm ; Angle 120° ; Run Time 3hrs

Block 2 → Initial Switch Time 3sec ; Final Switch Time 6sec ; Voltage 6V/cm ; Angle 120° ; Run Time 20hrs

Après migration, l'ADN est fragmenté par irradiation au UV (1800J/m²) et transféré sur membrane de nylon (Hybond XL). La membrane est ensuite hybridée avec la sonde *FRM2* marquée radioactivement (P³²dCTPs).

Tableau 3 : Table des amorces qPCR

Locus	Localisation	Site	Amorce Sens	Amorce Anti-Sens	Taille du fragment
<i>CDC39</i>	ChrIII	Contrôle	CDC39_F@+3863 CGCTCCACCGATGACTCAA	CDC39_R@+4014 CGACTGGGATGGCTGATTCA	151pb
<i>ARE1</i>	ChrIII	Hotspot	ARE1_F@-58 TCACGCAGGTGGTTGTTGAG	ARE1_R@+63 GGAATTGAGGCTGCGGATCTTA	121pb
<i>ATF2</i>	ChrVII	Hotspot	ATF2@F+1548 GAATGGGAATCGTTCTGCAAGC	ATF2@R+1671 CACTGCTTGCCTTTGTACGAG	123pb
<i>GAT1</i>	ChrVI	Hotspot	GAT1@F+25 CGCCCTTCCCCTGTTCTG	GAT1@R+165 AAATCAAGTCCGGGTCGAGG	138pb
<i>YBP1</i>	ChrII	Axe	YBP1_F@+1811 GGCAGATGCCAAGAAGAGTG	YBP1_R@+1962 CGGAAGTTTATCAGTTGACTG	151pb
<i>GRR1</i>	ChrX	Axe	GRR1_F@+3435 GCGTTCCTGATGCTTCATCC	GRR1_R@+3302 CCTGACCAGATGAGGAATCTCC	133pb

Tableau 4 : Table des sondes

Sonde	Chromosome	Oligonucléotides	Digestion	Commentaires
<i>MRX2</i>	Chr III	HIS4_F@+5170 CGTGAAGTGGAAACGATGCC HIS4_R@+5493 GCAACTGTTTCCAGCCTTCACC	PstI-HF	Mesure du niveau de cassures au locus <i>HIS4::LEU2</i> , Sonde droite
<i>LEU2</i>	Chr III	LEU2_F ATATACCATTCTAATGTCTGC LEU2_R AAGGATTTTCTTAATTCTTCGGCG	ND	Mesure du niveau de double-cassures au locus <i>HIS4::LEU2</i> , Sonde centrale
<i>ERG25</i>	Chr VII	Erg25_F@+734 GAACAAGATCATGCCATTCTGG Erg25_R@+936 CTTCTCTTAGTTAGTCTTCTTTGAGC	BglIII	Visualisation des cassures au locus <i>ERG25</i>
<i>ADE6</i>	Chr VII	ADE6_F@+2090 GTGACAGATCCGTCACAGGTC ADE6_R@+2656 CAGAGGCACCTAGTACTTAGTC	EcoRI	Visualisation des cassures au locus <i>ERG25</i>
<i>GAT1</i>	Chr VI	CCT6_F@+20 TCCGAAGGCTGAATCGTTGAG CCT6_R@+1025 CTTCCACAGAGTTCTGAGCTTC	PstI-HF	Visualisation des cassures au locus <i>GAT1</i>
<i>TAF2</i>	Chr III	TAF2_F@+23 CCACTCCTAGAGCCATTGTTAG TAF2_R@+693 TCATCAAGCAAATCGACACATGG	Asel	Mesure du niveau de cassure au locus <i>BUD23/ARE1</i> , Sonde gauche
<i>BUD23</i>	Chr III	BUD23_F@+1 ATGTCACGTCCTGAGGAGTTGG BUD23_R@+800 GTGAACTTGGAGTCCTTCGCAAC	ND	Mesure du niveau de double-cassures au locus <i>BUD23/ARE1</i> , Sonde centrale
<i>FRM2</i>	Chr III	FRM2_F@+27 GCTATTACAAACCGTCGTACCATC FRM2_R@+645 CATCGCTGAGGTATCATTACTTCAT	ND	Mesure du niveau de double-cassures entre les locus <i>leu2::hisG</i> et <i>HIS4::LEU2</i> , Sonde centrale

Tableau 5 : Table des amorces

Nom	Amorce	Commentaire
Mre11-S94A-F	GAGCGATCCCGCACAAAGTTTTTCAC	
Mre11-T377A-F	GTGCACCCTCCAATGCACAATCC	Génération des phosphomutants de Mre11 par PCR mutagénèse
Mre11-T564A-F	GATCTCCAGACATTGCCCAATCACATG	
Mre11-S578A-F	CAAGAATAACCCATATTGCTCAAGCGGAAAGCAG	
Mre11-5'anchor-BsiWI/Sall	ATTCGCGTACGGTTCGACATGGACTATCCTGATCCAGACAC	
Mre11-3'anchor-Aval/Pacl	CTAAGCCCGGGTTAATTAATTTCTTTTCTTAGCAAGGAGAC	Clonage du gène <i>MRE11</i> dans le plasmide pFA6-3HA-KAN::MX6 – délétion du codon STOP
Mre11-STOP-R-Aval/Pacl	CTAAGCCCGGGTTAATTAATTTCTTTTCTTAGCAAGGAGAC	Clonage du phosphomutant <i>mre11-4A</i> dans le plasmide pFA6-hphNT1 avec insertion du codon stop
Fun30-S383A_guideF	GAAGAAATGGGGTGTGCAAG	ARN guide pour mutation du résidu S383 de Fun30 par CRISPR
Fun30-S383A_guideR	CTTGACACCCCATTTCTTC	
Fun30-T976A_guideF	ATCTTCCTTATTCACTCAAGTCC	ARN guide pour mutation du résidu T976 et T1000 de Fun30 par CRISPR
Fun30-T976A_guideR	AACGGACTTGAGTGAATAAGGAA	
Fun30-K603R_guideF	ATCAAACGAACCGGGTCTCACT	ARN guide pour mutation du résidu K603 de Fun30 par CRISPR
Fun30-K603R_guideR	AACAGTGAGGACCCGGTTCGTTT AAGAGGTTACAATGCAATTGAGTCTGTGATCAAGAAATGTTCTTCCTAC	
Fun30-S383A_Repair_F	GGTGATTTGGTCACTGCGCAAATGAAGAAATGGGGTGTGCAAGTAGA AGGC	Fragment de réparation contenant la mutation S383A et la mutation de la séquence PAM
Fun30-S383A_Repair_R	TCATCATTGTCGTCGTCATCGTCTTCCCAAGGTTTCATCAGGTCCAAGTCA AGAGTTATCGCCTTCTACTTGCACACCCCATTTCTTCATTTGCGCAGTGA	
Fun30-T976A_Repair_F_2	TATTCGCTCAAGTCTAGATATTCTAGAGATGGTTTTGTCCACCTTAGAT TATAAATTTTAAAGATTAGATGGTTCGCGCAAGTGAATGATAGACAAC T	Fragment de réparation contenant les mutations T976A et T1000A ainsi que la mutation de la séquence PAM
Fun30-T976A_Repair_R	AGTTGTCTATCATTCACTTGCAGGAAACCATCTAATCTTAAAAATTTATAA TCTAAGGTGGACAAAACCATCTCTAGAATATCTAGGACTTGAGCGAATA	
Fun30-K603R-Repair-F-2	GCAGACGACATGGGTCTAGGTAGAACATGTCAAGTCATTTCAATTTTTCG CATATTTGAAACAAATAAACGAACCGGGTCTCACTTGATTGTTGTGCC	Fragment de réparation contenant la mutation K603R et la mutation de la séquence PAM
Fun30-K603R-Repair-R-2	GGCACAACAATCAAGTGAGGACCCGGTTCGTTTATTTGTTTCAAATATG CGAAAATGAAATGACTTGACATGTTCTACCTAGACCCATGTCGTCGTC	

Tableau 6 : Table des Souches

Souche	Mating type	Génotype	Origine
VG402	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', sae2Δ::KanMX4/'', tel1Δ::HphMX4/''</i>	Garcia et al 2015
VG495	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, sae2Δ::KanMX6</i>	Garcia et al 2015
VG496	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, sae2Δ::KanMX6</i>	Garcia et al 2015
VG499	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	Garcia et al 2015
VG603	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, URA3::TEL1</i>	Lab
VG662	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1</i>	Lab
VG733	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6</i>	VG496xVG662
VG734	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6</i>	VG496xVG662
VG735	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1</i>	VG496xVG662
VG736	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1</i>	VG496xVG662
VG737	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2</i>	VG496xVG662
VG738	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2</i>	VG496xVG662
VG739	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/''</i>	VG737xVG738
VG740	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-TEL1'', sae2Δ::KanMX6''</i>	VG733xVG734
VG741	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-TEL1''</i>	VG735xVG736
VG607	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, xrs2CterΔ</i>	Lab
VG609	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, xrs2CterΔ, sae2Δ::KanMX6</i>	VG496xVG607
VG610	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, xrs2CterΔ, sae2Δ::KanMX6</i>	VG496xVG607
VG613	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', xrs2CterΔ/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	VG609xVG610
VG605	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, xrs2 K846A/F847A::KANMX6</i>	Lab
VG615	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, xrs2 K846A/F847A::KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG605xVG496
VG616	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, xrs2 K846A/F847A::KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG605xVG496
VG619	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', xrs2 K846A/F847A::KANMX6/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	VG615xVG616
VG727	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, spo11(Y135F)::KanMX4</i>	Laboratoire de Matt Neale
VG742	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, spo11(Y135F)::KanMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	VG727xVG733

VG743	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, spo11(Y135F)::KanMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	VG727xVG733
VG749	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-TEL1/'', spo11(Y135F)::KanMX4/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	VG742xVG743
VG751	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2CterΔ::KanMX6</i>	VG733xVG607
VG753	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2CterΔ::KanMX6</i>	VG733xVG607
VG764	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-TEL1/'', sae2Δ::KanMX6/'', xrs2CterΔ::KanMX6/''</i>	VG751xVG753
VG834	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2 K846A/F847A::KANMX6</i>	VG733xVG605
VG835	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2 K846A/F847A::KANMX6</i>	VG733xVG605
VG838	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-TEL1/'', sae2Δ::KanMX6/'', xrs2 K846A/F847A::KANMX6/''</i>	VG834xVG835
VG312	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', spo11(Y135F)-His6-FLAG3-loxP-KanMX-loxP/''</i>	Laboratoire de Matt Neale
VG906	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/3, leu2::hisG/'', nuc1::LEU2, SPO11-His6-flag3-loxP-HphMX-loxP/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	Laboratoire de Scott Keeney
VG80	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, Mre11-myc::URA3</i>	SKY827
VG429	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, sae2Δ::KanMX6, tel1-D2612A, N2617A, D2631A</i>	Lab
VG430	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, sae2Δ::KanMX6, tel1-D2612A, N2617A, D2631A</i>	Lab
VG431	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', sae2Δ::KanMX6/'', tel1-D2612A, N2617A, D2631A/''</i>	VG429xVG430
VG645	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, Mre11-myc::URA3 sae2Δ::KanMX6</i>	VG80xVG429
VG648	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, leu2::hisG, Mre11-myc::URA3 sae2Δ::KanMX6</i>	VG80xVG429
VG670	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', leu2::hisG/'', Mre11-myc::URA3/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	VG645xVG648
VG827	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-D2612A, N2617A, D2631A</i>	VG736 transformée avec <i>FLAG-tel1kd</i>
VG828	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-D2612A, N2617A, D2631A</i>	VG827xVG496
VG830	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-D2612A, N2617A, D2631A, sae2Δ::KanMX6</i>	VG827xVG496
VG831	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-D2612A, N2617A, D2631A, sae2Δ::KanMX6</i>	VG827xVG496
VG832	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-tel1-D2612A, N2617A, D2631A/'', sae2Δ::KanMX6/''</i>	VG830xVG831
VG1116	a/α	<i>ho::LYS2/'', lys2/'', ura3/'', arg4-nsp/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2/'', FLAG-tel1-D2612A, N2617A, D2631A/''</i>	VG827xVG828
VG1114	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, MRE11-3HA-KANMX6</i>	VG737 transformée avec <i>MRE11-3HA-KAN</i>

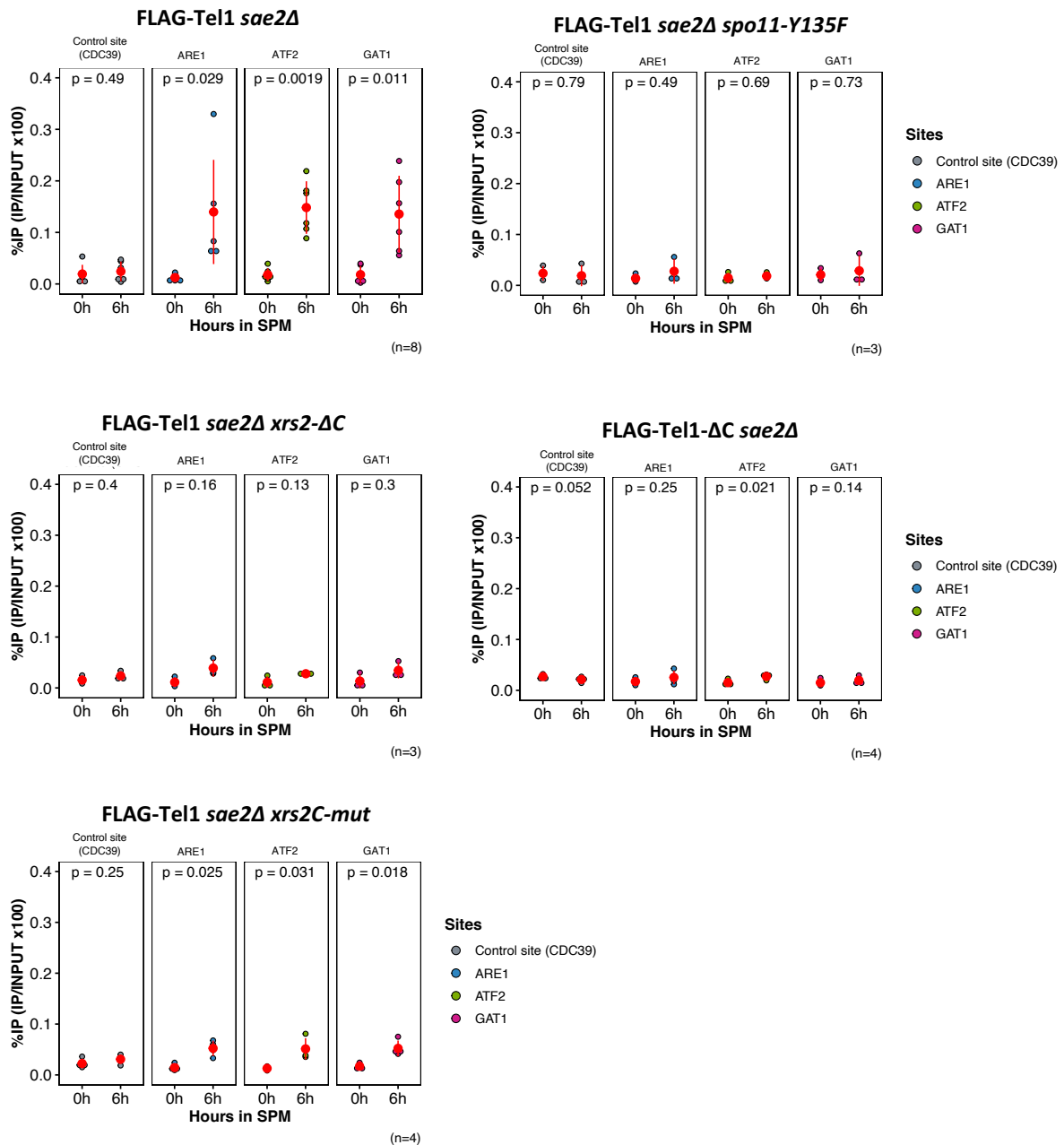
VG1146	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1114xVG495
VG1147	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1114xVG495
VG1145	a/α	<i>ho::LYS2/" , lys2/" , ura3/" , arg4-nsp/" , leu2::hisG/" , his4X::LEU2/" , nuc1::LEU2/" , Mre11-3HA-KANMX6/" , sae2Δ::KanMX6/"</i>	VG1146xVG1147
VG1115	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T564A-S578A-3HA-KANMX6</i>	VG737 transformée avec <i>mre11-2A-3HA-KAN</i>
VG1150	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T564A-S578A-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1115xVG495
VG1151	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T564A-S578A-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1115xVG495
VG1142	a/α	<i>ho::LYS2/" , lys2/" , ura3/" , arg4-nsp/" , leu2::hisG/" , his4X::LEU2/" , nuc1::LEU2/" , mre11-T564A-S578A-3HA-KANMX6/" , sae2Δ::KanMX6/"</i>	VG1150xVG1151
VG1139	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6</i>	VG737 transformée avec <i>mre11-3A-3HA-KAN</i>
VG1152	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1139xVG495
VG1153	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1139xVG495
VG1143	a/α	<i>ho::LYS2/" , lys2/" , ura3/" , arg4-nsp/" , leu2::hisG/" , his4X::LEU2/" , nuc1::LEU2/" , mre11-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6/" , sae2Δ::KanMX6/"</i>	VG1153xVG1152
VG1140	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6</i>	VG737 transformée avec <i>mre11-4A-3HA-KAN</i>
VG1154	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1140xVG495
VG1155	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1140xVG495
VG1144	a/α	<i>ho::LYS2/" , lys2/" , ura3/" , arg4-nsp/" , leu2::hisG/" , his4X::LEU2/" , nuc1::LEU2/" , mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-3HA-KANMX6/" , sae2Δ::KanMX6/"</i>	VG1154xVG1155
VG1156	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-P110L-NatMX4</i>	VG737 transformé avec <i>mre11-P110L-NAT</i>
VG1157	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-P110L-NatMX4, tel1-D2612A, N2617A, D2631A, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1156xVG430
VG1158	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-P110L-NatMX4, tel1-D2612A, N2617A, D2631A, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1156xVG430
VG1162	a/α	<i>ho::LYS2/" , lys2/" , ura3/" , arg4-nsp/" , leu2::hisG/" , his4X::LEU2/" , nuc1::LEU2/" , mre11-P110L-NatMX4/" , tel1-D2612A, N2617A, D2631A/" , sae2Δ::KanMX6/"</i>	VG1157xVG1158
VG1160	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-P110L-NatMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1156xVG430
VG1161	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-P110L-NatMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1156xVG430

VG1159	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, mre11-P110L-NatMX4"/, sae2Δ::KanMX6/"</i>	VG1160xVG1161
VG1213	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-HPH</i>	VG737 transformée avec <i>Mre11-HPH</i>
VG1214	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH</i>	VG737 transformée avec <i>mre11- S94A-T377A-T564A-S578A-HPH</i>
VG1215	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH</i>	VG737 transformée avec <i>mre11- S94A-T377A-T564A-S578A-HPH</i>
VG1218	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG1213xVG495
VG1219	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG1213xVG495
VG1220	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, Mre11-HPH"/, sae2Δ::KanMX4/"</i>	VG1218xVG1219
VG1221	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-HPH</i>	VG1213xVG495
VG1222	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, Mre11-HPH</i>	VG1213xVG495
VG1223	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2/3, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, Mre11-HPH/"</i>	VG1221xVG1222
VG1224	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG1214xVG495
VG1225	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG1214xVG495
VG1226	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH"/, sae2Δ::KanMX4/"</i>	VG1224xVG1225
VG1227	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH</i>	VG1214xVG495
VG1228	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH</i>	VG1214xVG495
VG1229	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, mre11-T377A-T564A-S578A-HPH/"</i>	VG1228xVG1227
VG1230	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG1215xVG495
VG1231	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG1215xVG495
VG1232	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH"/, sae2Δ::KanMX4/"</i>	VG1230xVG1231
VG1233	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH</i>	VG1215xVG495
VG1234	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH</i>	VG1215xVG495
VG1235	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, mre11-S94A-T377A-T564A-S578A-HPH/"</i>	VG1233xVG1234
VG1137	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, esc1Δ::HphMX4</i>	VG737 transformée avec <i>esc1::HPH</i>
VG1148	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, esc1Δ::HphMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1137xVG495

VG1149	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, esc1Δ::HphMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	VG1137xVG495
VG1141	a/α	<i>ho::LYS2/"', lys2/"', ura3/"', arg4-nsp/"', leu2::hisG/"', his4X::LEU2/"', nuc1::LEU2/"', esc1Δ::HphMX4/"', sae2Δ::KanMX6/"'</i>	VG1149xVG1148
VG801	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, rif2Δ::HYG</i>	VG737 transformée avec <i>rif2::HPH</i>
VG803	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, rif2Δ::HYG, sae2Δ::KanMX6</i>	VG801xVG495
VG804	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, rif2Δ::HYG, sae2Δ::KanMX6</i>	VG801xVG495
VG813	a/α	<i>ho::LYS2/"', lys2/"', ura3/"', arg4-nsp/"', leu2::hisG/"', his4X::LEU2/"', nuc1::LEU2/"', rif2Δ::HYG/"', sae2Δ::KanMX6/"'</i>	VG803xVG804
VG1073	a	<i>ho::hisG leu2::hisG ura3(ΔSma-Pst) HIS4::LEU2 rif1Δ</i>	SBY3947 Burgess Lab
VG1111	a	<i>ho::LYS2 ou hisG ?, lys2 ?, ura3, arg4-nsp ?, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2 ?, sae2Δ::KanMX6, rif1Δ::KANMX6</i>	VG1073xVG496
VG1112	α	<i>ho::LYS2 ou hisG ?, lys2 ?, ura3, arg4-nsp ?, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2 ?, sae2Δ::KanMX6, rif1Δ::KANMX6</i>	VG1073xVG496
VG1113	a/α	<i>ho::LYS2 ou hisG ?/'', lys2 ?/'', ura3/'', arg4-nsp ?/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2 ?/'', sae2Δ::KanMX6/'', rif1Δ::KANMX6/''</i>	VG1111xVG1112
VG1069	a	<i>ho::hisG leu2::hisG ura3(ΔSma-Pst) HIS4::LEU2 nup2Δ</i>	SBY3944 Burgess Lab
VG1105	a	<i>ho::LYS2 ou hisG ?, lys2 ?, ura3, arg4-nsp ?, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2 ?, sae2Δ::KanMX6, nup2Δ::KANMX6</i>	VG1069xVG496
VG1106	α	<i>ho::LYS2 ou hisG ?, lys2 ?, ura3, arg4-nsp ?, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2 ?, sae2Δ::KanMX6, nup2Δ::KANMX6</i>	VG1069xVG496
VG1107	a/α	<i>ho::LYS2 ou hisG ?/'', lys2 ?/'', ura3/'', arg4-nsp ?/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2 ?/'', sae2Δ::KanMX6/'', nup2Δ::KANMX6/''</i>	VG1105xVG1106
VG1071	a	<i>ho::hisG leu2::hisG ura3(ΔSma-Pst) HIS4::LEU2 ndj1Δ</i>	SBY1902 Burgess Lab
VG1108	a	<i>ho::LYS2 ou hisG ?, lys2 ?, ura3, arg4-nsp ?, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2 ?, sae2Δ::KanMX6, ndj1Δ::KANMX6</i>	VG1071xVG496
VG1109	α	<i>ho::LYS2 ou hisG ?, lys2 ?, ura3, arg4-nsp ?, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2 ?, sae2Δ::KanMX6, ndj1Δ::KANMX6</i>	VG1071xVG496
VG1110	a/α	<i>ho::LYS2 ou hisG ?/'', lys2 ?/'', ura3/'', arg4-nsp ?/'', leu2::hisG/'', his4X::LEU2/'', nuc1::LEU2 ?/'', sae2Δ::KanMX6/'', ndj1Δ::KANMX6/''</i>	VG1108xVG1109
VG378	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, dmc1Δ::HphMX4, exo1Δ::KanMX4</i>	SG341 x MJ720 (Matt Neale)
VG807	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAGTEL1, dmc1Δ::HphMX4</i>	VG378xVG737
VG811	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAGTEL1, dmc1Δ::HphMX4</i>	VG378xVG737
VG825	a/α	<i>ho::LYS2/"', lys2/"', ura3/"', arg4-nsp/"', leu2::hisG/"', his4X::LEU2/"', nuc1::LEU2/"', FLAGTEL1/"', dmc1Δ::HphMX4/"'</i>	VG807xVG811
VG917	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-ΔC::NatMX6</i>	VG736 transformée avec <i>tel1-ΔC::NatMX6</i>
VG932	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-ΔC::NatMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG917xVG496
VG933	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-tel1-ΔC::NatMX6, sae2Δ::KanMX6</i>	VG917xVG496
VG948	a/α	<i>ho::LYS2/"', lys2/"', ura3/"', arg4-nsp/"', leu2::hisG/"', his4X::LEU2/"', nuc1::LEU2/"', FLAG-tel1-ΔC::NatMX6/"', sae2Δ::KanMX6/"'</i>	VG932xVG932
VG427	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, sae2Δ::KanMX6, tel1-D2612A, N2617A, D2631A</i>	Lab
VG1123	a	<i>ho::LYS2, lys2(?), ura3 (?), arg4-nsp (?), leu2::hisG (?), his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FUN30::HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG427xBLY127 (B. Llorente)
VG1124	α	<i>ho::LYS2, lys2(?), ura3 (?), arg4-nsp (?), leu2::hisG (?), his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FUN30::HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG427xBLY127 (B. Llorente)

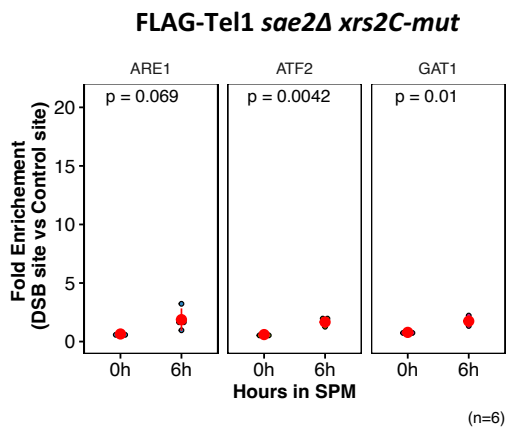
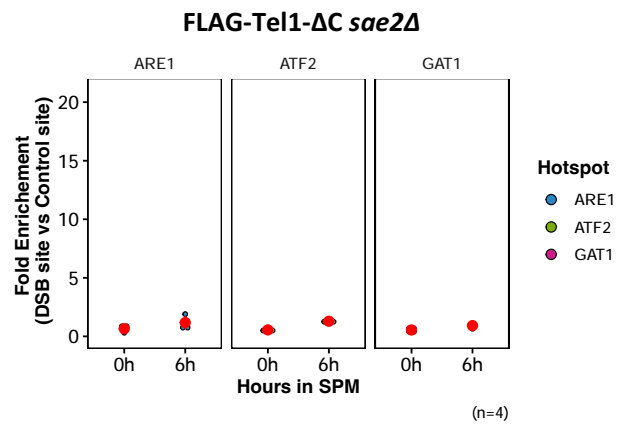
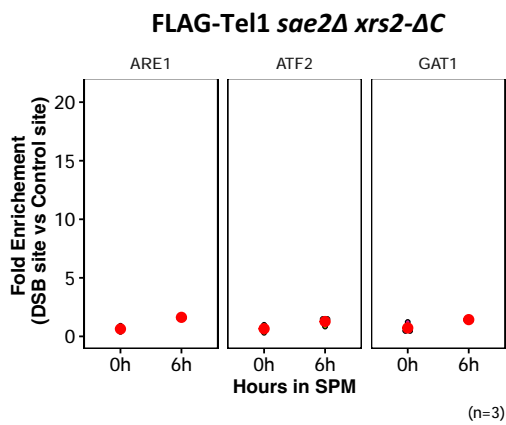
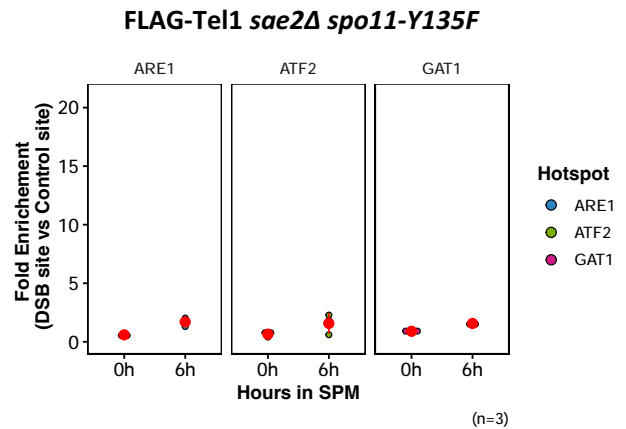
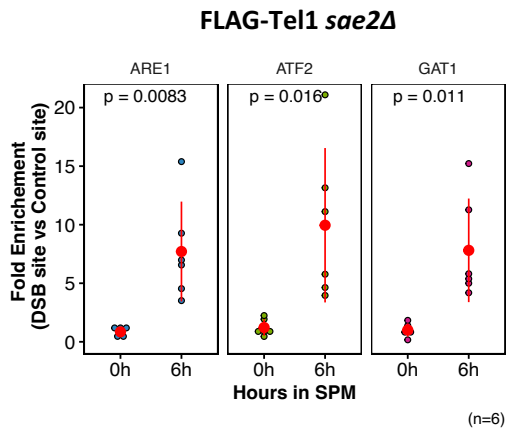
VG1134	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2(?)/", ura3 (?)/", arg4-nsp (?)/", leu2::hisG (?)/", his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, FUN30::HPH"/, sae2Δ::KanMX4/"</i>	VG1123xVG1124
VG1125	α	<i>ho::LYS2, lys2(?), ura3 (?), arg4-nsp (?), leu2::hisG (?), nuc1::LEU2, tel1-D2612A, N2617A, D2631A, FUN30::HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG427xBLY127 (B. Llorente)
VG1169	a	<i>ho::LYS2, lys2(?), ura3 (?), arg4-nsp (?), leu2::hisG (?), nuc1::LEU2 (?), his4X::LEU2(?), tel1-D2612A, N2617A, D2631A, FUN30::HPH, sae2Δ::KanMX4</i>	VG427xBLY127 (B. Llorente)
VG1170	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2(?)/", ura3 (?)/", arg4-nsp (?)/", leu2::hisG (?)/", nuc1::LEU2"/, nuc1::LEU2 (?)/", tel1-D2612A, N2617A, D2631A"/, FUN30::HPH"/, sae2Δ::KanMX4/"</i>	VG1125xVG1169
VG755	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, xrs2CterΔ::KanMX6</i>	VG735xVG607
VG421	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his3::hisG, his4X::LEU2, (nuc1::LEU2?), tel1Δ::HphMX4, ndt80::HphMX</i>	MJ593xVG283 (Lab)
VG1027	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, (his3::hisG?), his4X::LEU2, (nuc1::LEU2?), ndt80::HphMX</i>	VG496xVG421
-	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, xrs2CterΔ::KanMX6, ndt80::HphMX</i>	VG755xVG1027 Tétrade 2A – pas dans la collection
VG751	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2CterΔ::KanMX6</i>	VG733xVG607
VG1210	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2CterΔ::KanMX6, ndt80::HphMX</i>	Tétrade2A xVG751
VG1211	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, xrs2CterΔ::KanMX6, ndt80::HphMX</i>	Tétrade2A xVG751
VG1212	a/α	<i>ho::LYS2', lys2', ura3', arg4-nsp', leu2::hisG', his4X::LEU2', nuc1::LEU2', FLAG-TEL1', sae2Δ::KanMX6', xrs2CterΔ::KanMX6', ndt80::HphMX'</i>	VG1210xVG1211
VG1239	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, ndt80::HphMX</i>	VG755xVG1027
VG1240	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, ndt80::HphMX</i>	VG755xVG1027
VG1236	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, ndt80::HphMX</i>	VG734xVG1239
VG1237	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, FLAG-TEL1, sae2Δ::KanMX6, ndt80::HphMX</i>	VG734xVG1239
VG1238	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp"/, leu2::hisG"/, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, FLAG-TEL1"/, sae2Δ::KanMX6"/, ndt80::HphMX/"</i>	VG1236xVG1237
VG729	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, spo11(Y135F)::KanMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	MJ468 (Matt Neale)
VG730	a	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, arg4-nsp, leu2::hisG, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, spo11(Y135F)::KanMX4, sae2Δ::KanMX6</i>	MJ469 (Matt Neale)
VG1030	a/α	<i>ho::LYS2', lys2', ura3', arg4-nsp', leu2::hisG', his4X::LEU2', nuc1::LEU2', spo11(Y135F)::KanMX4', sae2Δ::KanMX6'</i>	VG729xVG730
VG818	α	<i>ho::LYS2, lys2, ura3, leu2-?, his4X::LEU2, nuc1::LEU2, spo11Δ::hisG-URA3-hisG</i>	MJ967 (Matt Neale)
VG1025	a/α	<i>ho::LYS2"/, lys2"/, ura3"/, arg4-nsp/?, leu2::hisG/?, his4X::LEU2"/, nuc1::LEU2"/, sae2Δ::KanMX6"/, spo11Δ::hisG-URA3-hisG/"</i>	VG495xVG818

ANNEXES



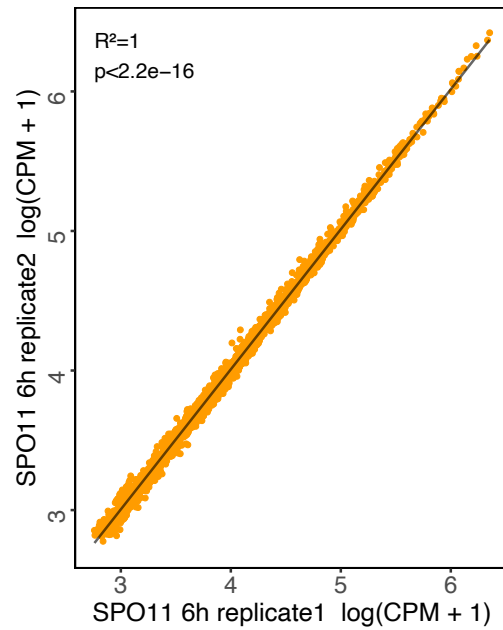
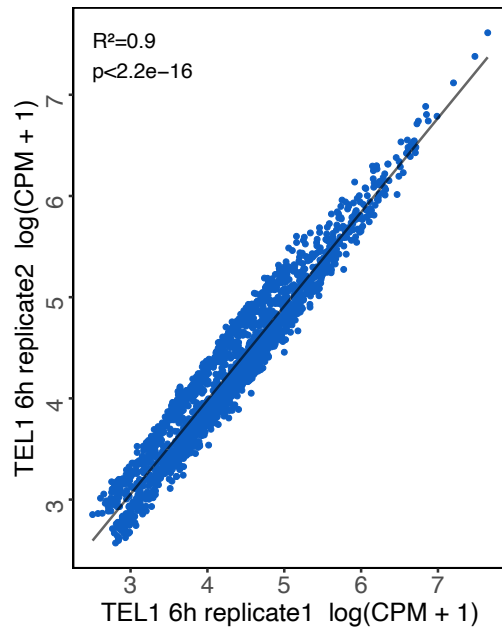
Annexe 1 : Recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures (%IP)

%IP de FLAG-Tel1 par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 0 et 6h post induction méiotique. Cette annexe regroupe les %IP des ChIP de FLAG-Tel1 en condition *sae2Δ*, *sae2Δ spo11-Y135F*, *sae2Δ xrs2Δ*, *sae2Δ xrs2C-mut* et de FLAG-Tel1-ΔC *sae2Δ*.



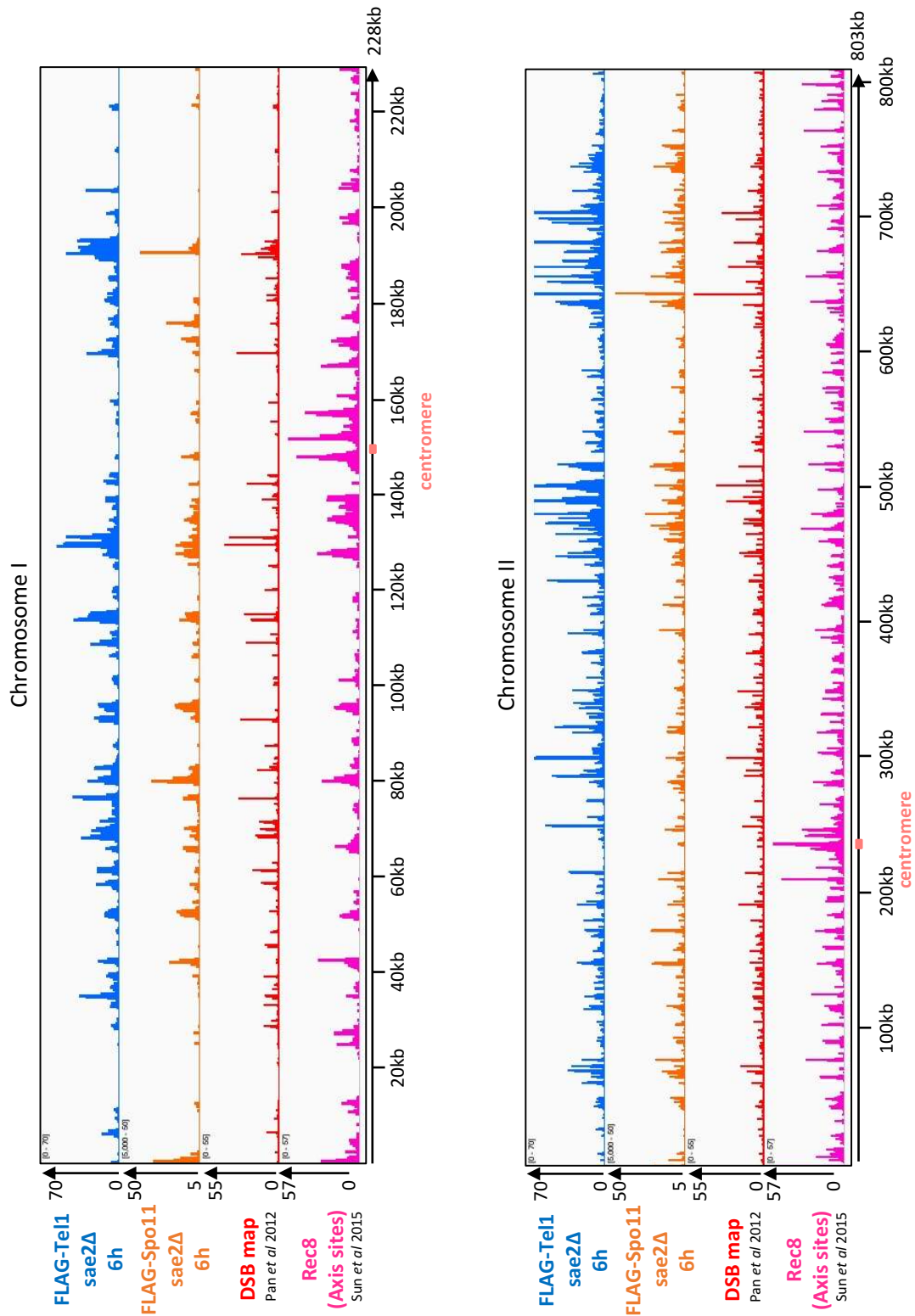
Annexe 2 : Recrutement de la protéine Tel1 aux sites de cassures (FE)

Enrichissement de FLAG-Tel1 par ChIP-qPCR aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* à 0 et 6h post induction méiotique. Cette annexe regroupe les FE des ChIPs de FLAG-Tel1 en condition *sae2Δ*, *sae2Δ spo11-Y135F*, *sae2Δ xrs2Δ*, *sae2Δ xrs2C-mut* et de FLAG-Tel1-ΔC *sae2Δ*.



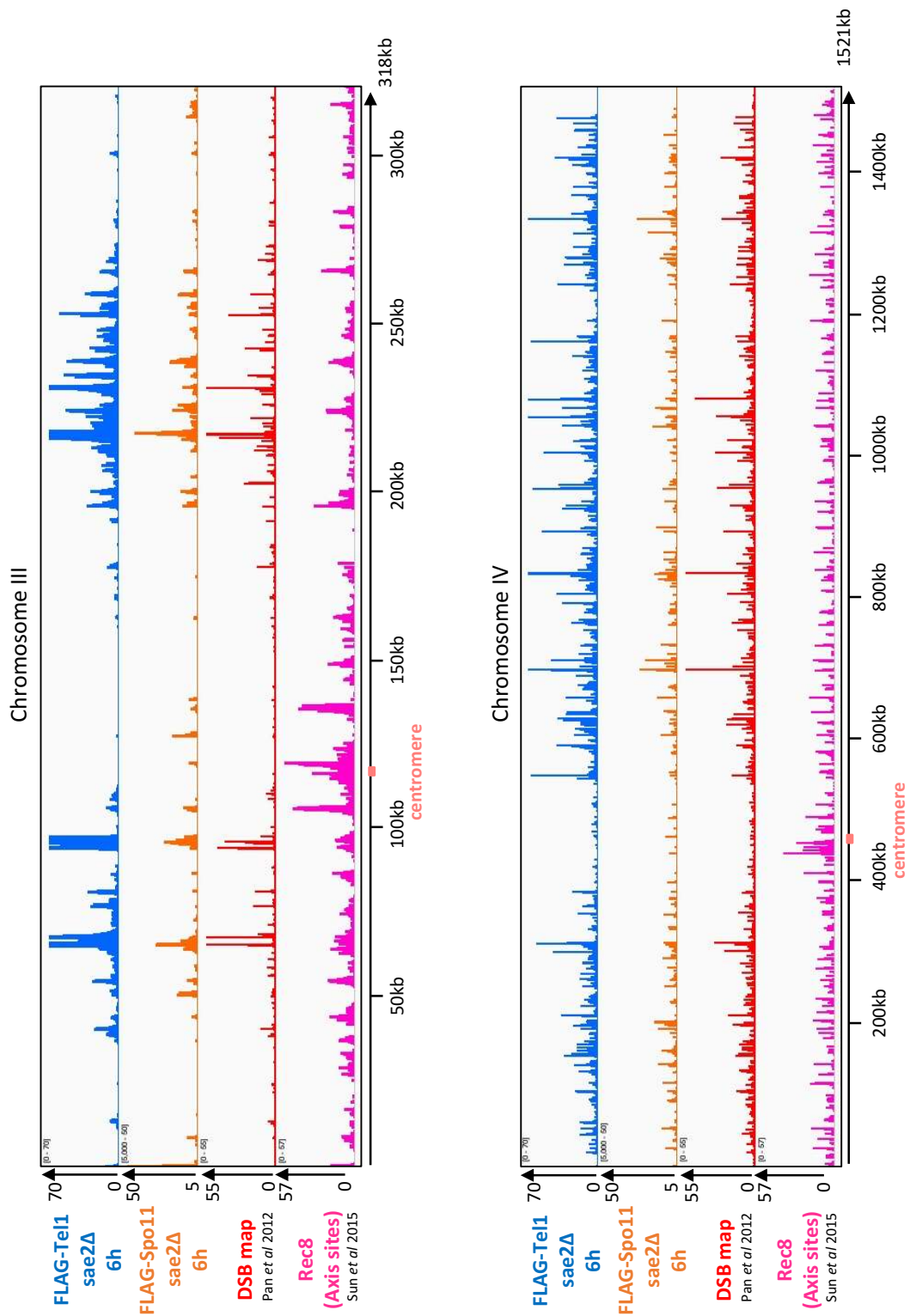
Annexe 3 : Corrélation des réplicats de ChIP-seq

Graphique de corrélation entre les deux réplicats de Tel1 à 6h (gauche) ou Spo11 à 6h (droite). Les signaux sont exprimés en CPM (« count per million reads mapped ») et transformés par une fonction logarithmique. R^2 : coefficient de corrélation



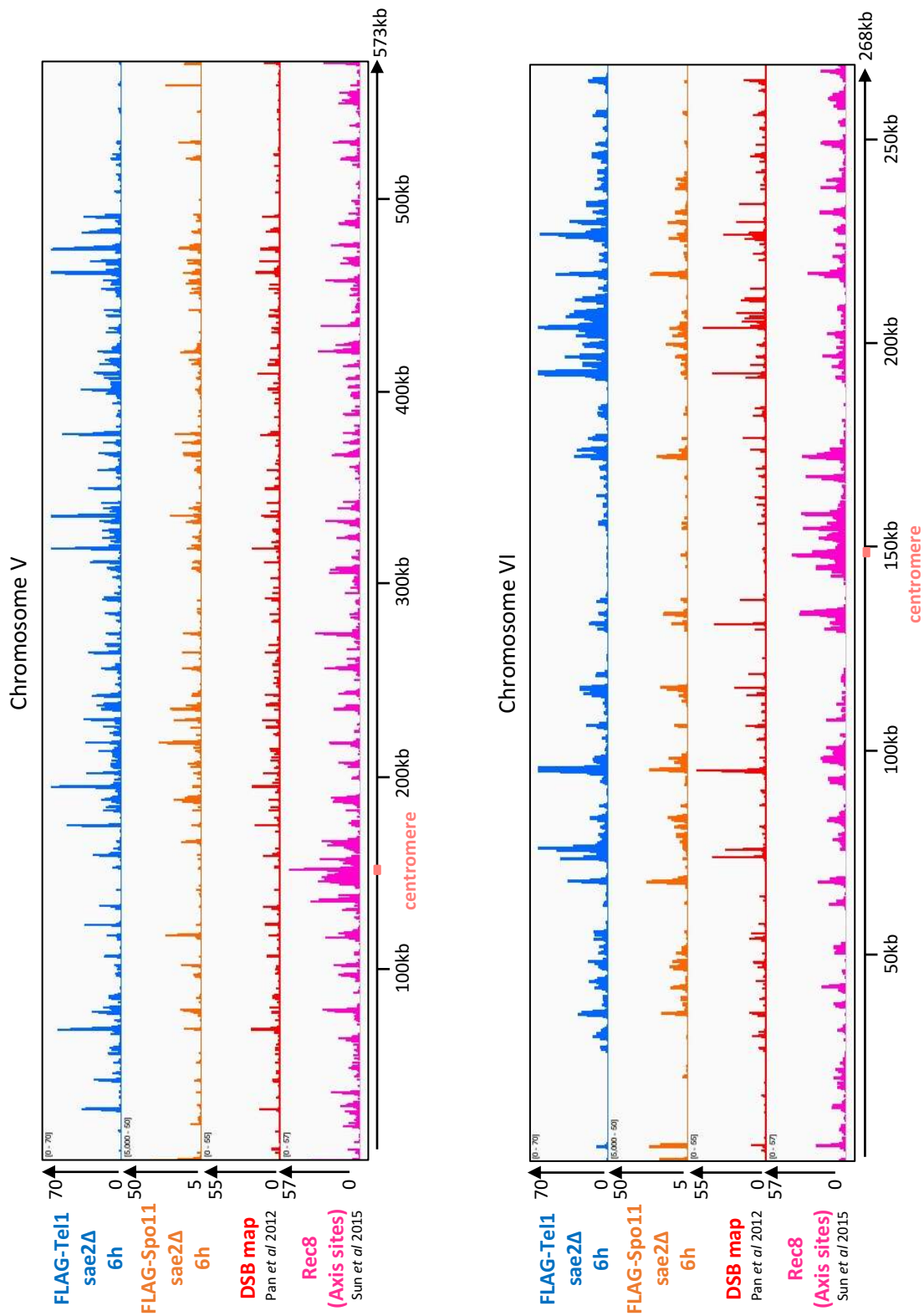
Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



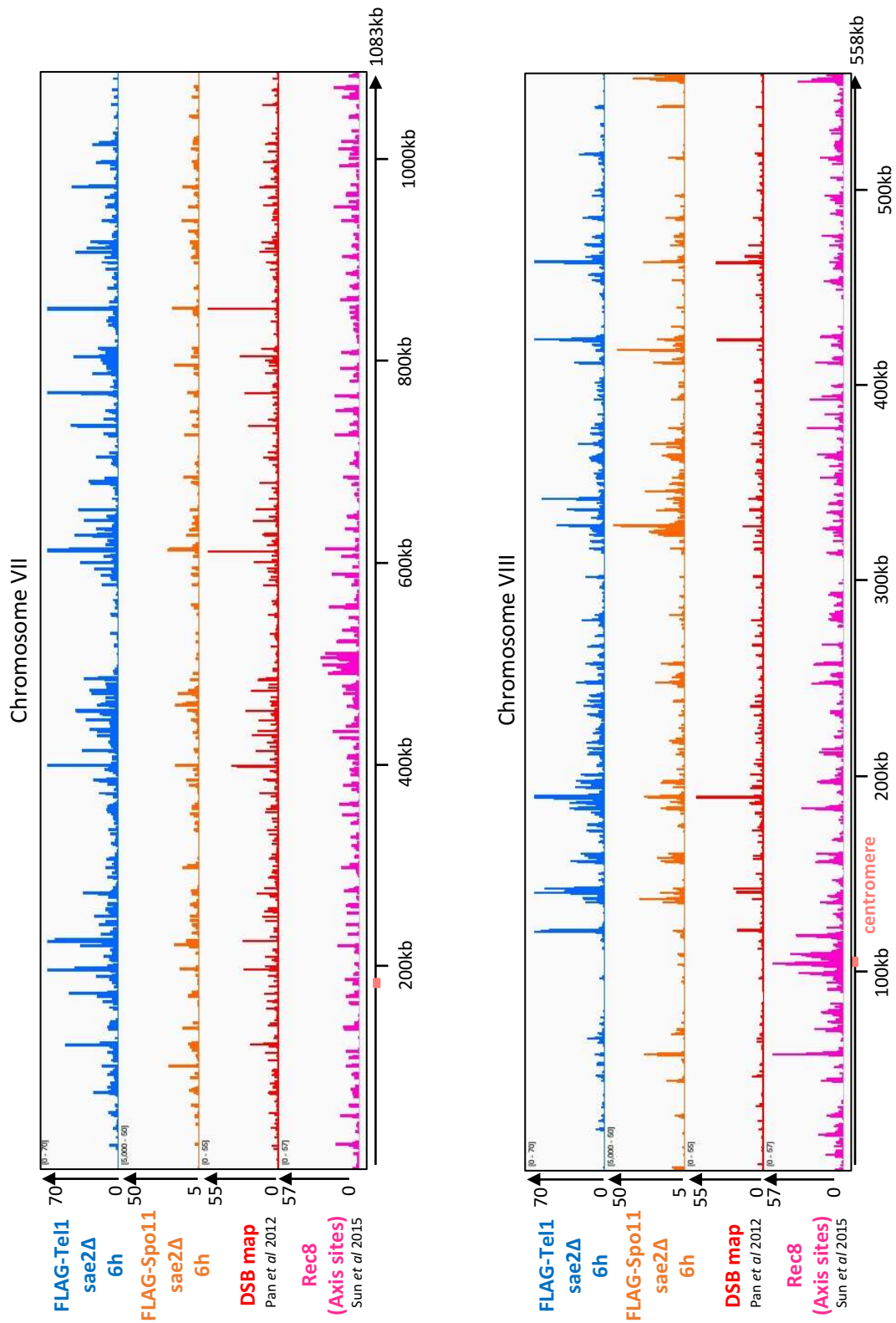
Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



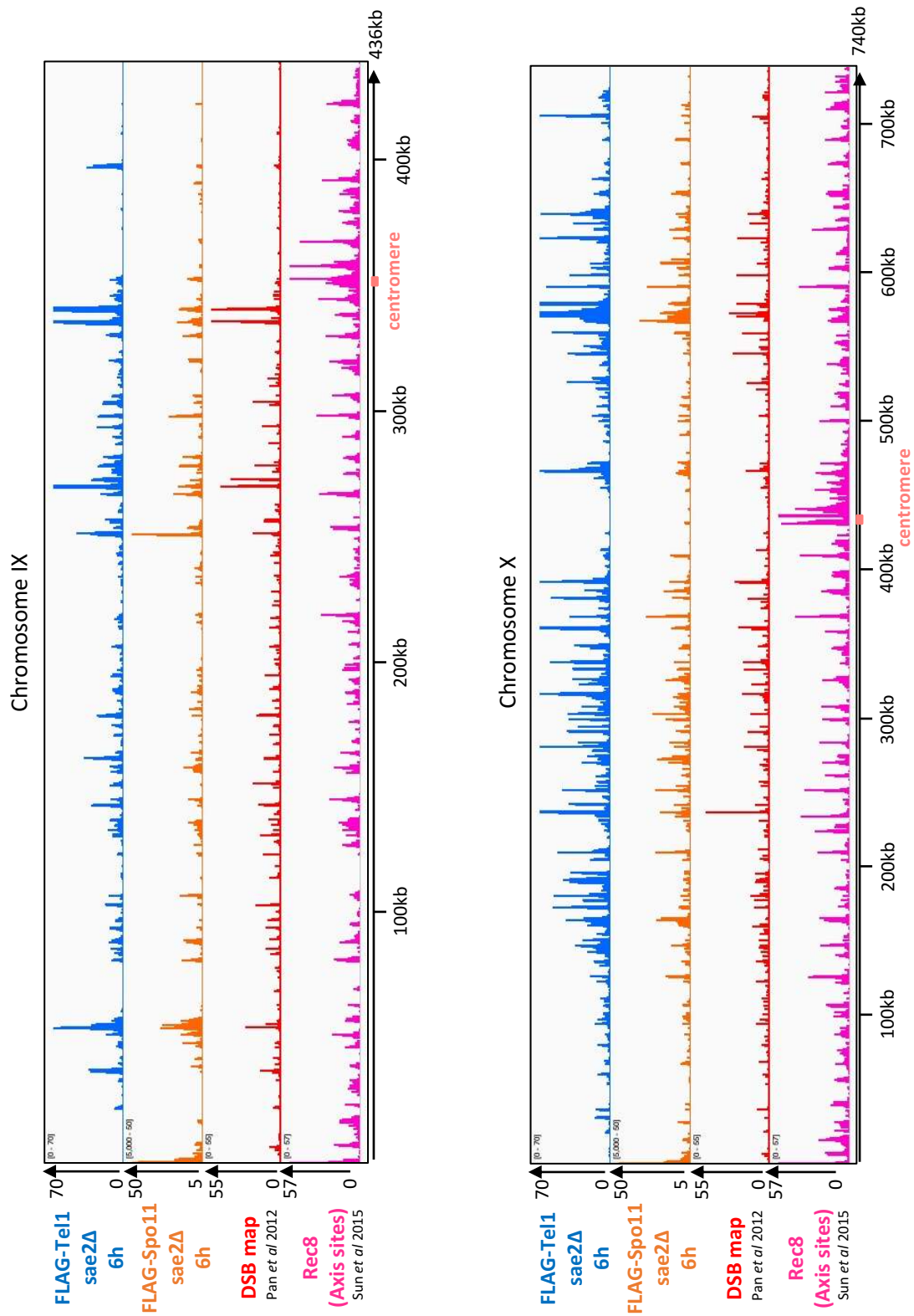
Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



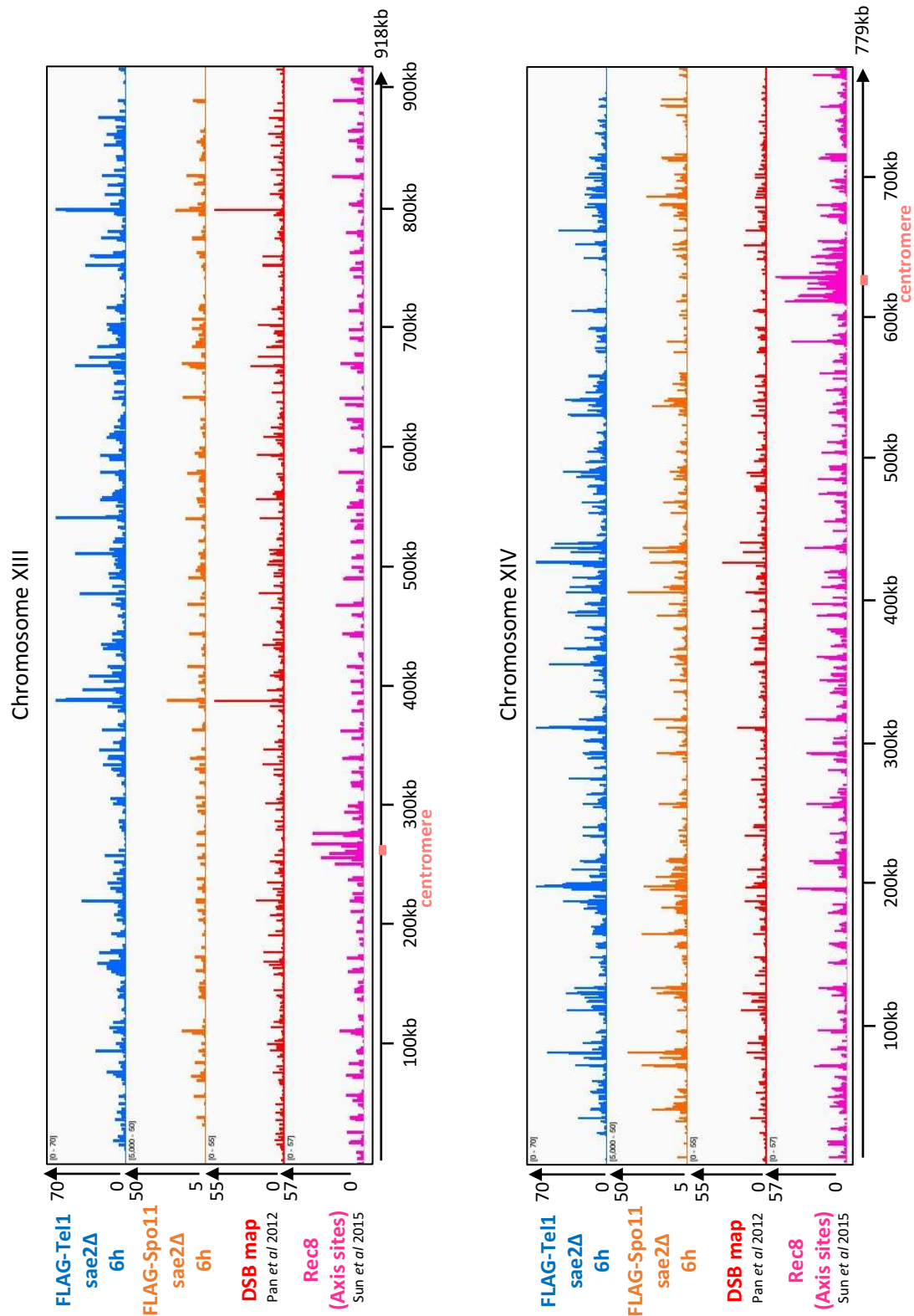
Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



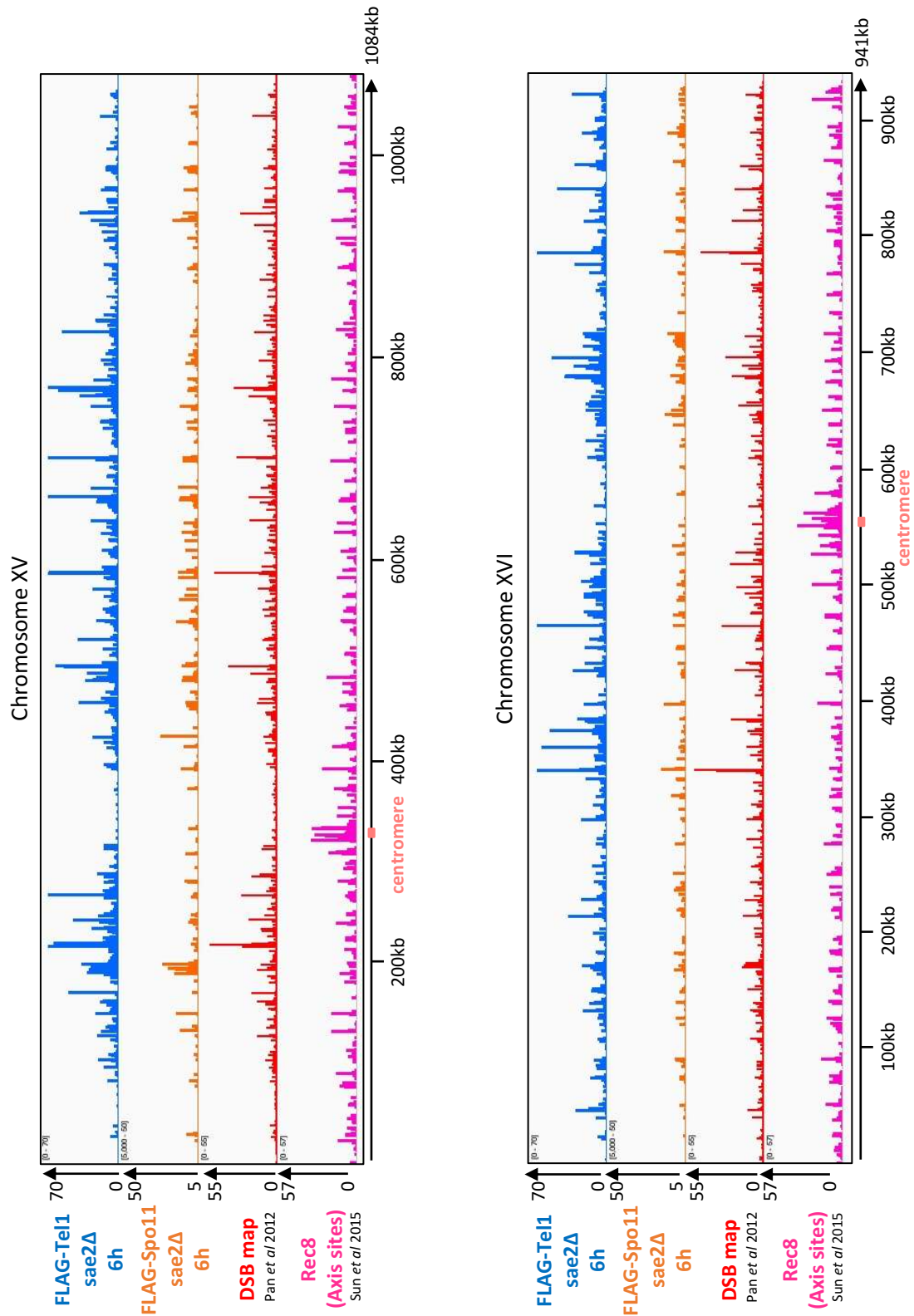
Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



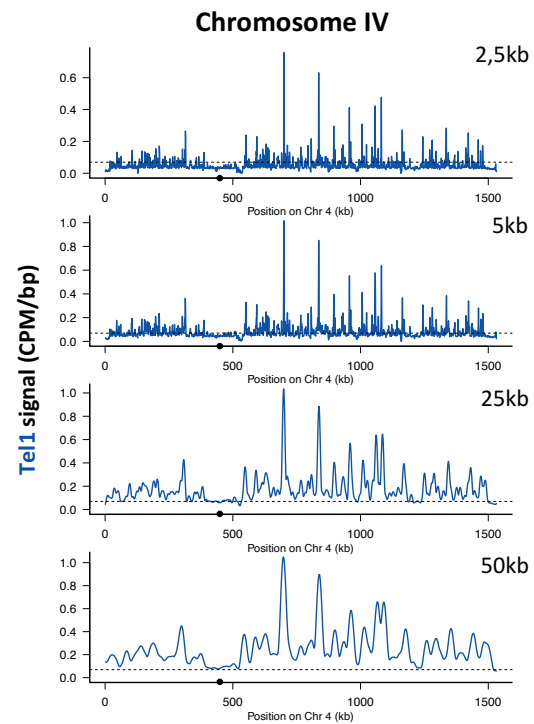
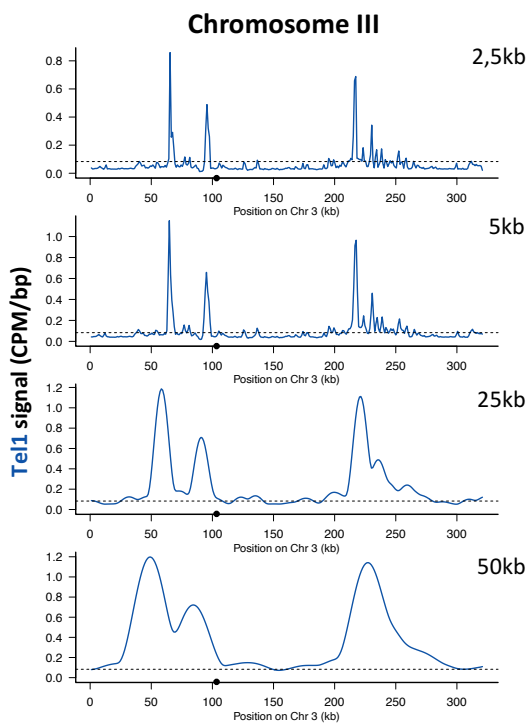
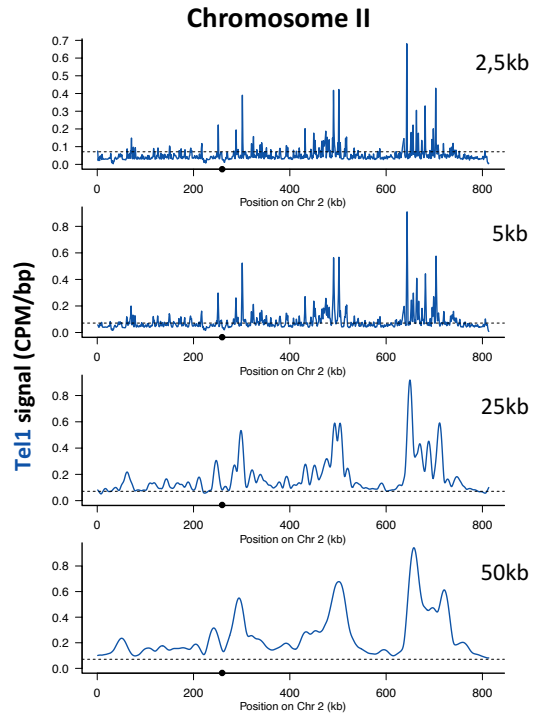
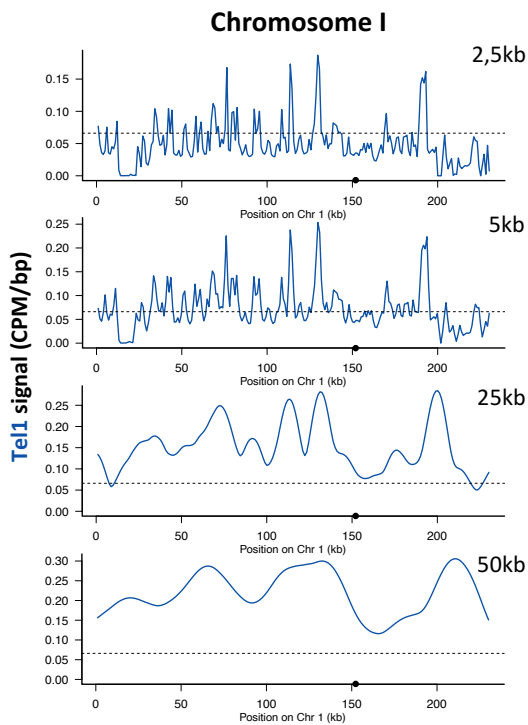
Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



Annexe 4 : Vue chromosomique des enrichissements de Tel1 et Spo11 sur chaque chromosome

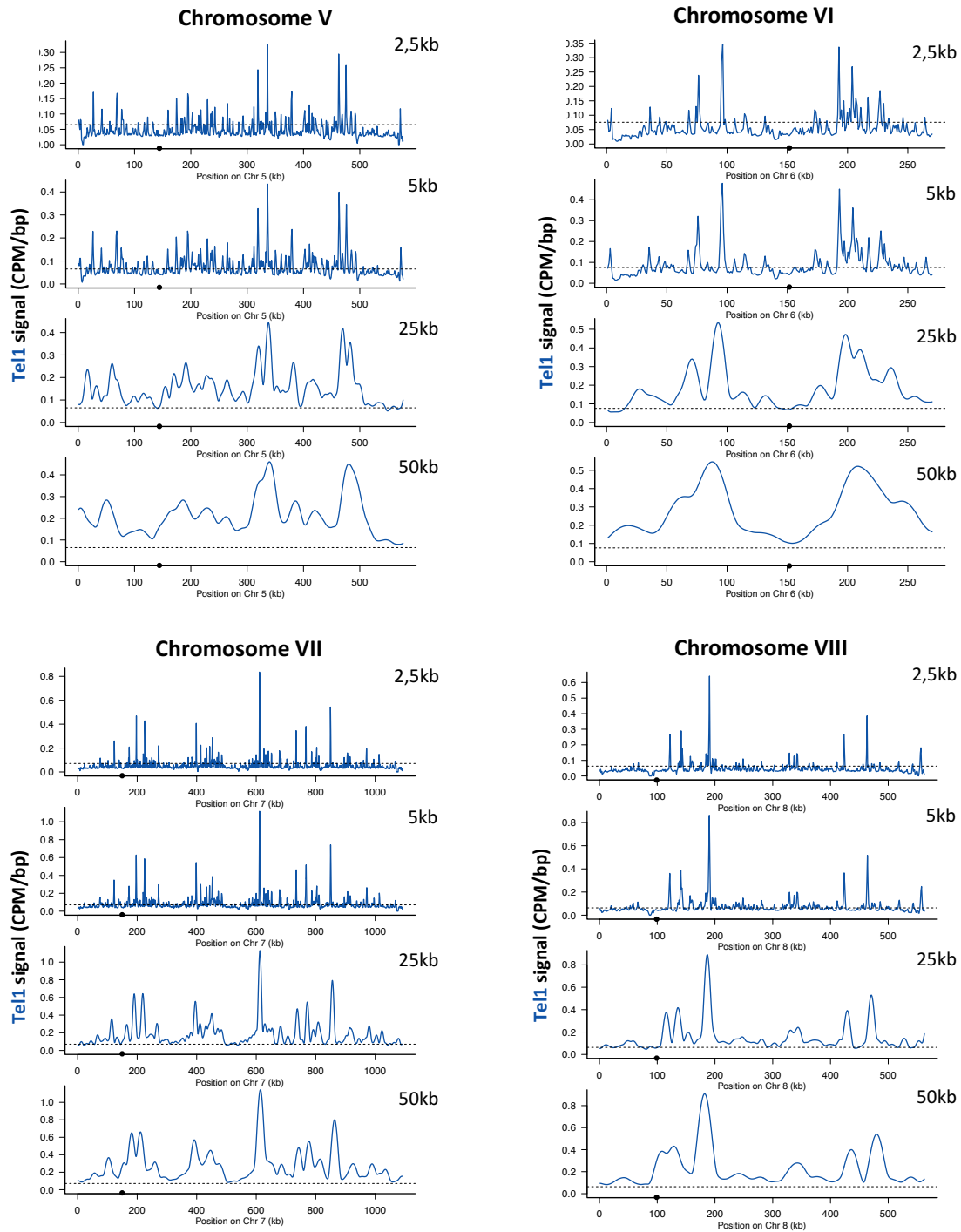
Vue globale de l'enrichissement en FLAG-Tel1 et FLAG-Spo11 sur chaque chromosome. L'enrichissement en Tel1 et Spo11 est comparé à la carte des DSBs (Pan *et al.*) et à l'enrichissement de Rec8 (Sun *et al.*). Une échelle d'enrichissement commune a été fixée afin de visualiser au mieux l'ensemble des pics.



• centromere

Annexe 5 : Enrichissement chromosomique de Tel1 sur fenêtres glissantes

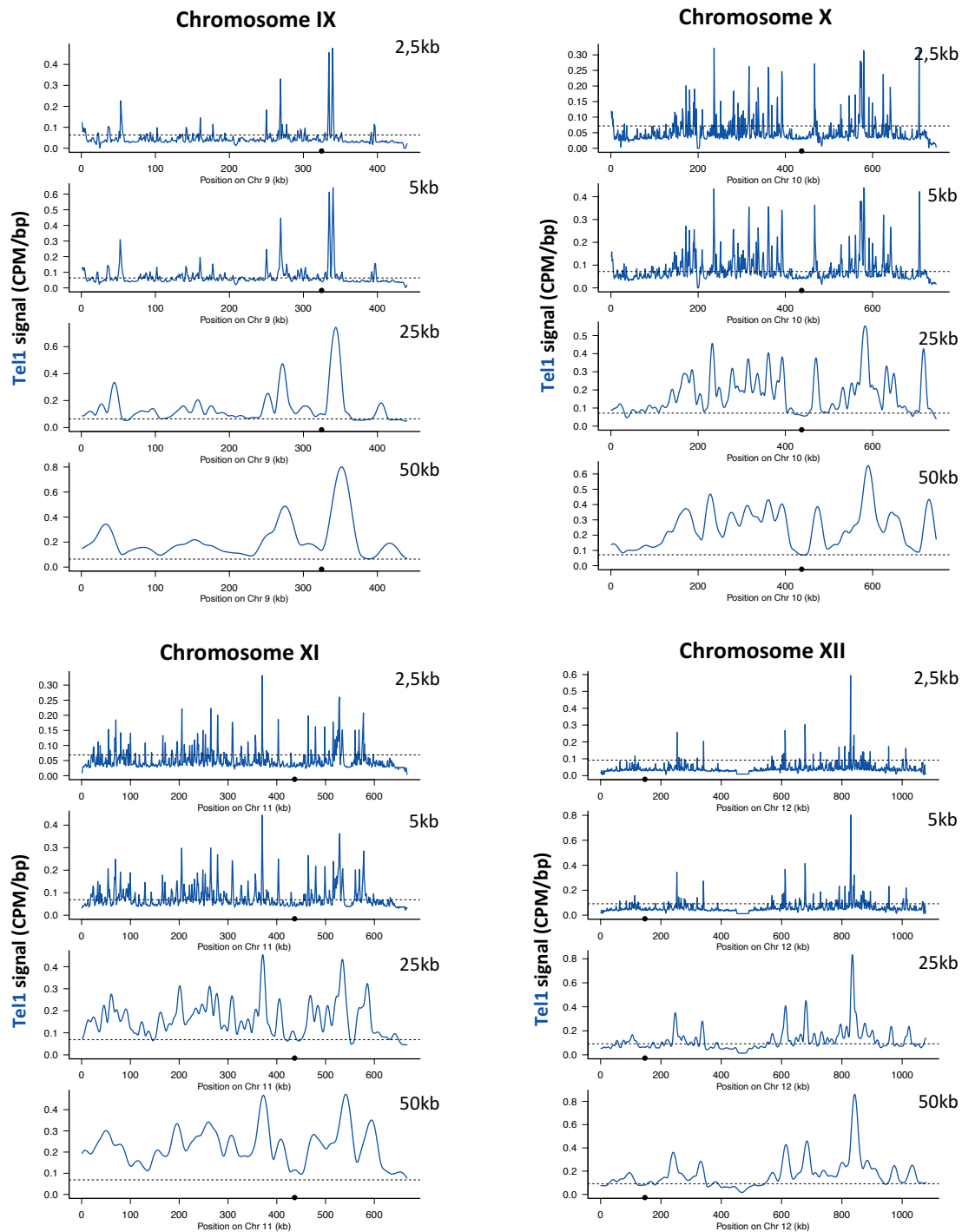
Les données brutes de CHIP-seq ont été lissées à l'aide de la fonction de Hann sur différentes tailles de fenêtre (2,5kb, 5kb, 25kb et 50kb). Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage.



• centromere

Annexe 5 : Enrichissement chromosomique de Tel1 sur fenêtres glissantes

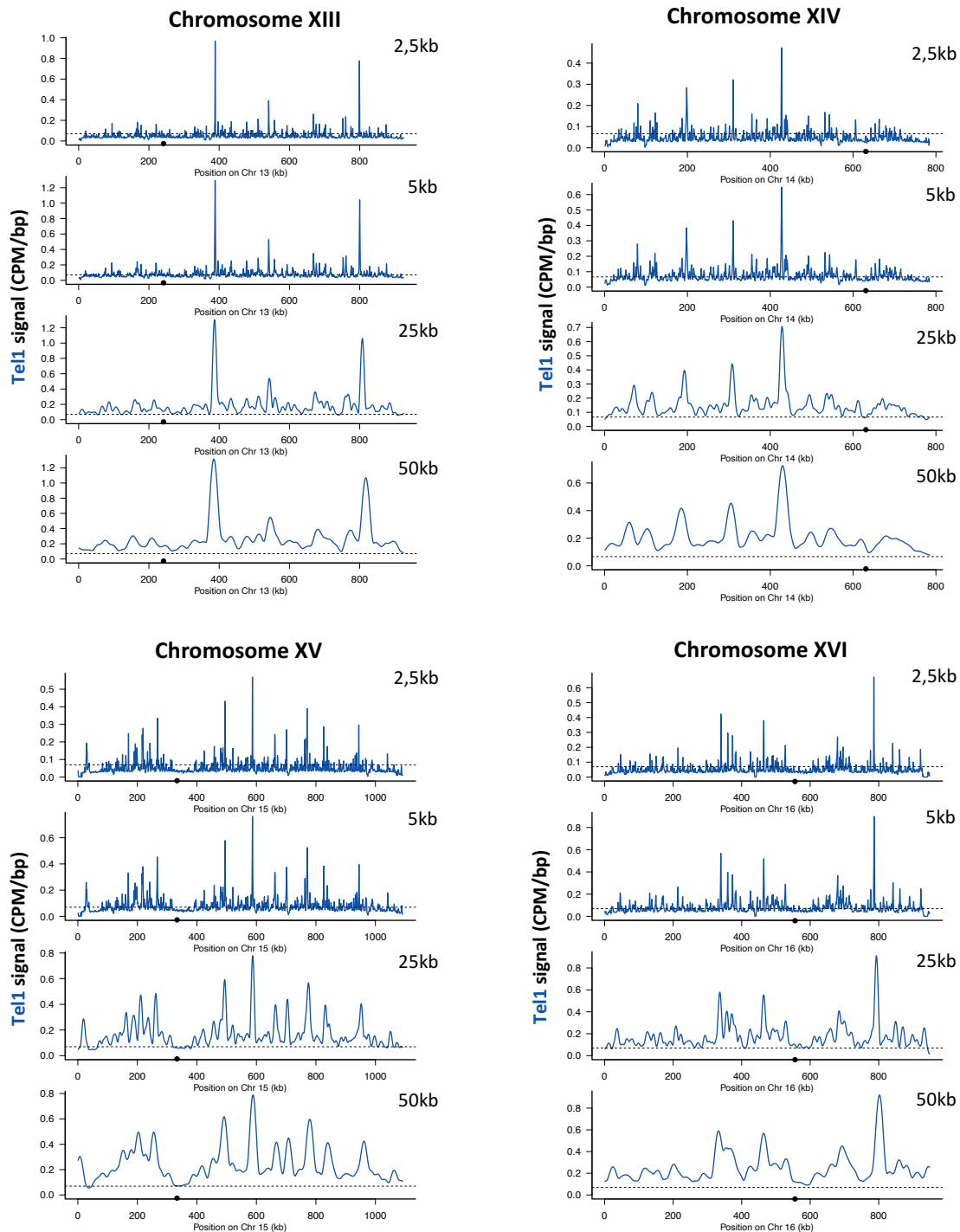
Les données brutes de CHIP-seq ont été lissées à l'aide de la fonction de Hann sur différentes tailles de fenêtre (2,5kb, 5kb, 25kb et 50kb). Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage.



- centromere

Annexe 5 : Enrichissement chromosomique de Tel1 sur fenêtres glissantes

Les données brutes de CHIP-seq ont été lissées à l'aide de la fonction de Hann sur différentes tailles de fenêtre (2,5kb, 5kb, 25kb et 50kb). Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage.

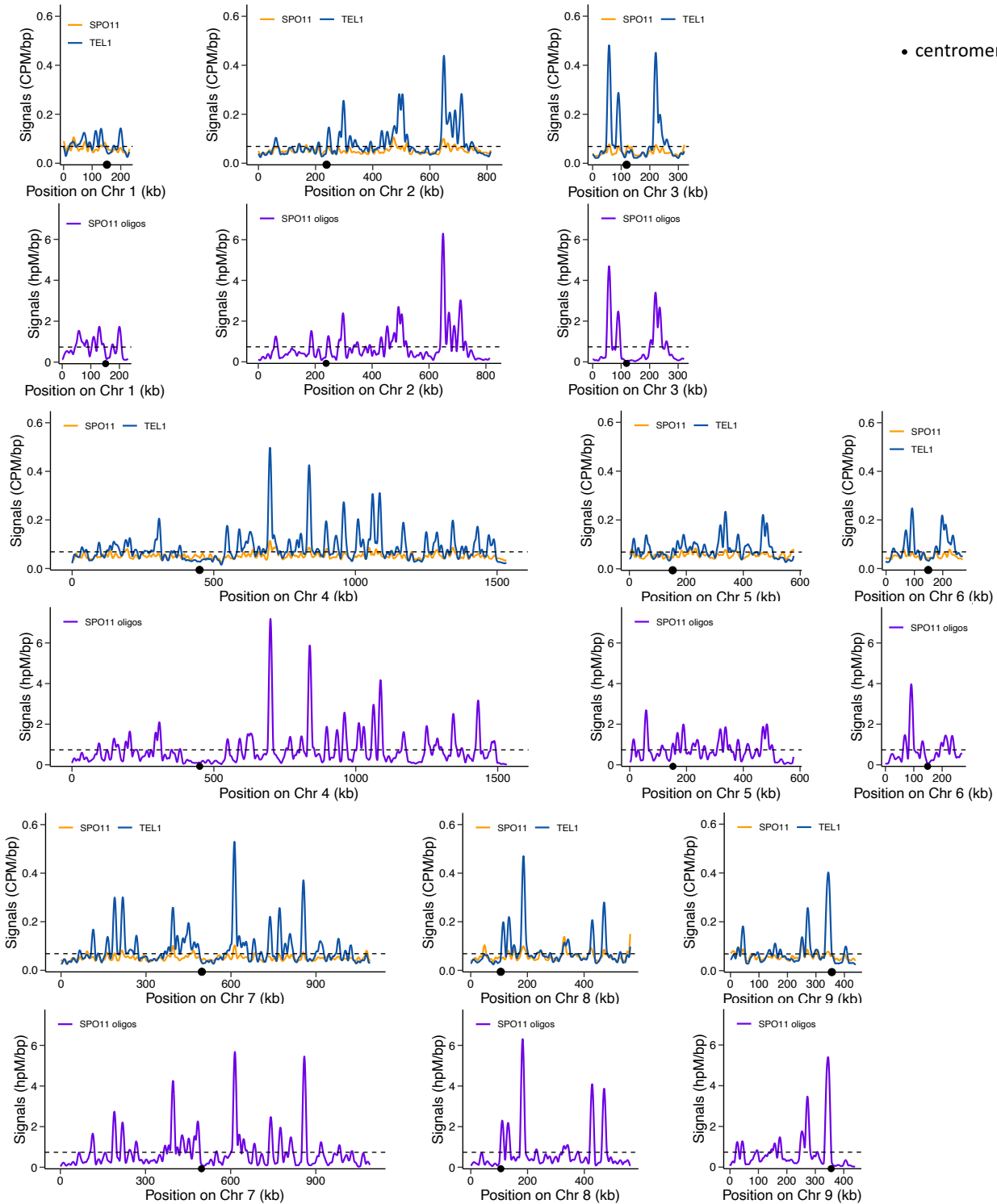


- centromere

Annexe 5 : Enrichissement chromosomique de Tel1 sur fenêtres glissantes

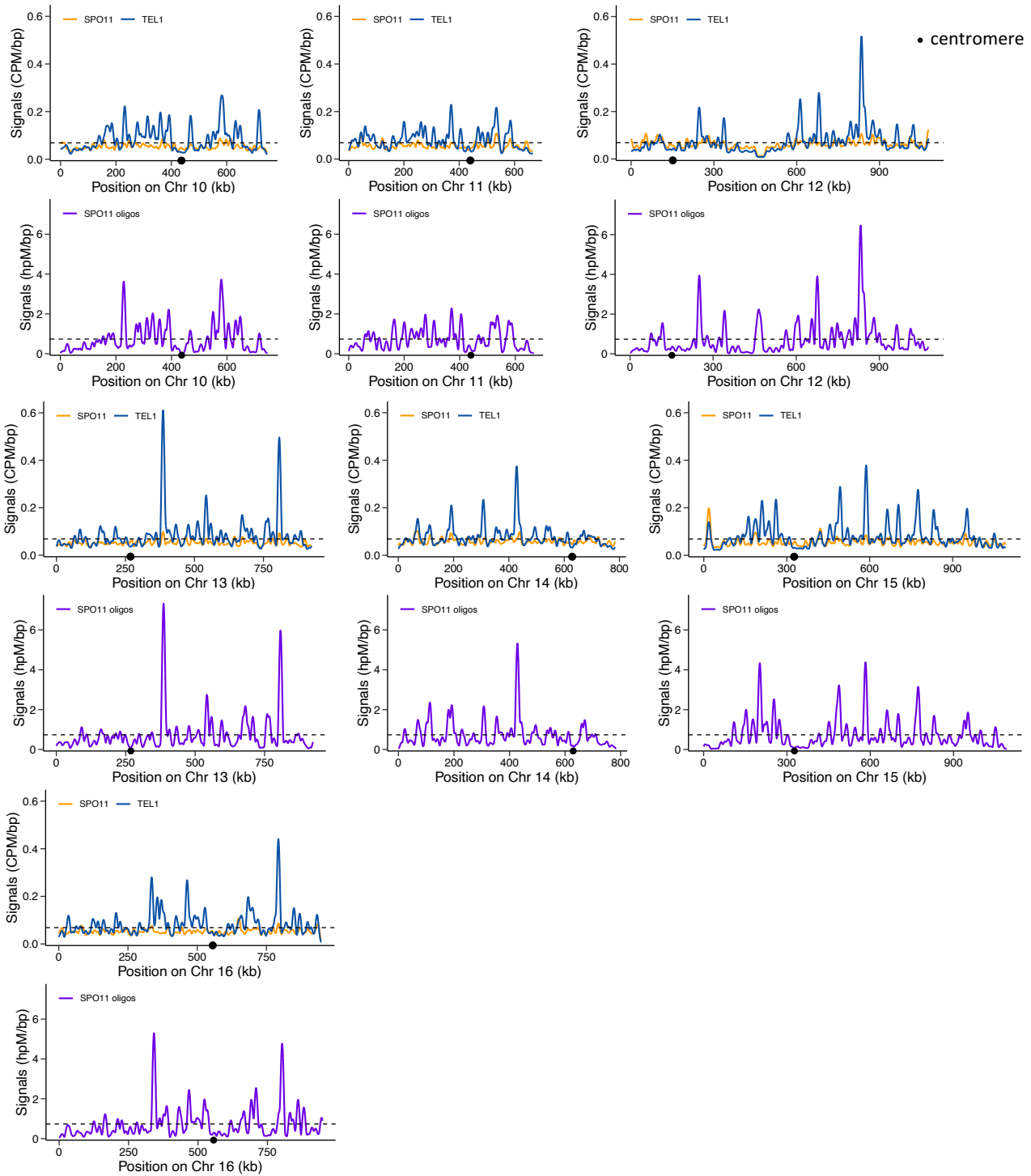
Les données brutes de ChIP-seq ont été lissées à l'aide de la fonction de Hann sur différentes tailles de fenêtre (2,5kb, 5kb, 25kb et 50kb). Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage.

• centromere



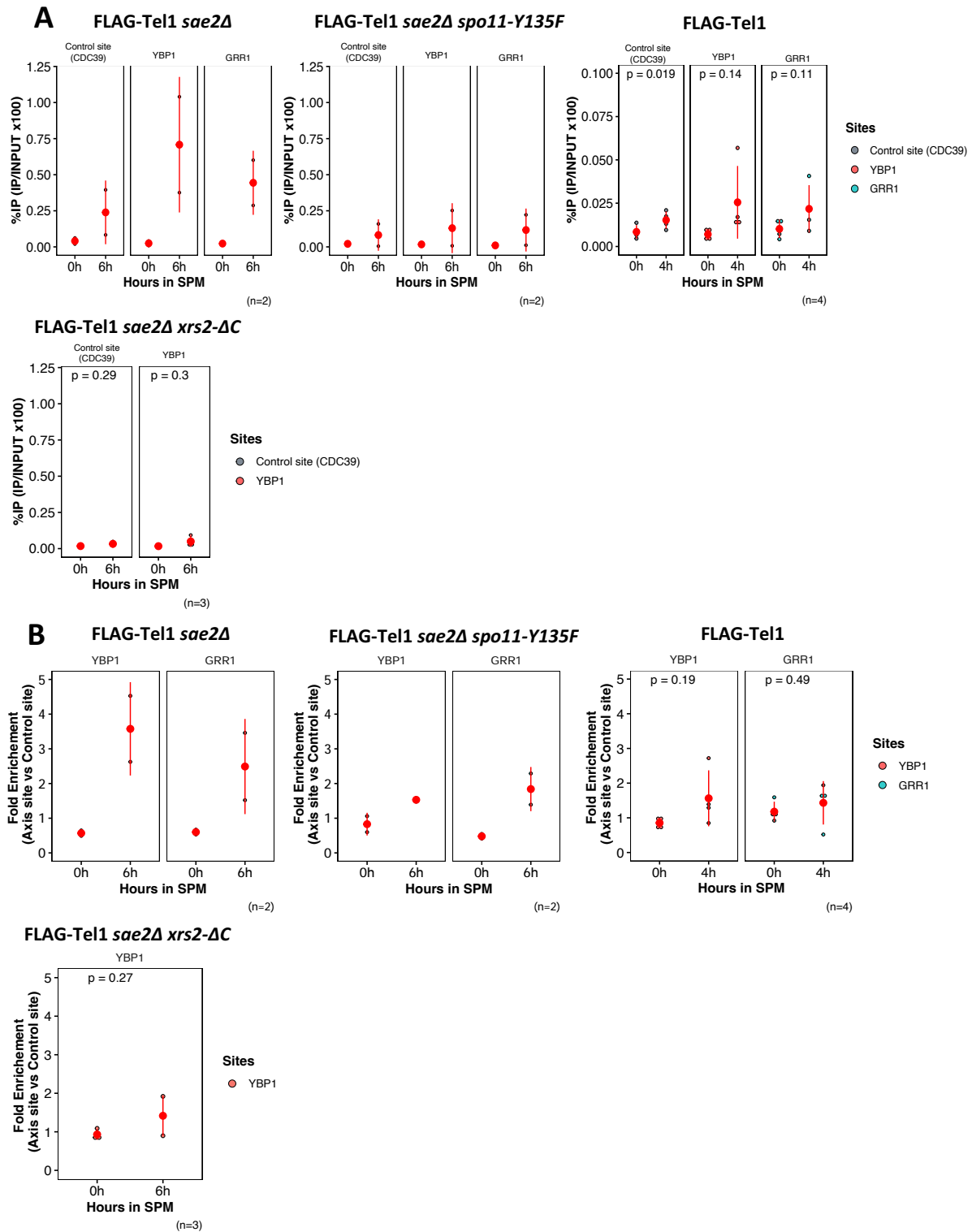
Annexe 6 : Comparaison des signaux d'enrichissement de Tel1 et Spo11 aux signaux de DSBs après lissage du signal à 25kb

Les données brutes de ChIP-seq et de CC-seq (Gitten et al) ont été lissées sur fenêtre glissante de 25kb, et tous les chromosomes sont représentés à la même échelle. L'enrichissement en Tel1 correspond à la courbe bleue, et Spo11 à la courbe orange. L'enrichissement en Spo11-oligos obtenu par CC-seq est correspond à la courbe violette. Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage.



Annexe 6 : Comparaison des signaux d'enrichissement de Tel1 et Spo11 aux signaux de DSBs après lissage du signal à 25kb

Les données brutes de CHIP-seq et de CC-seq (Gitten et al) ont été lissées sur fenêtre glissante de 25kb, et tous les chromosomes sont représentés à la même échelle. L'enrichissement en Tel1 correspond à la courbe bleue, et Spo11 à la courbe orange. L'enrichissement en Spo11-oligos obtenu par CC-seq est correspond à la courbe violette. Les pointillés indiquent l'enrichissement génomique moyen sans lissage.



Annexe 7 : Recrutement de la protéine Tel1 aux sites de l'axe (%IP)

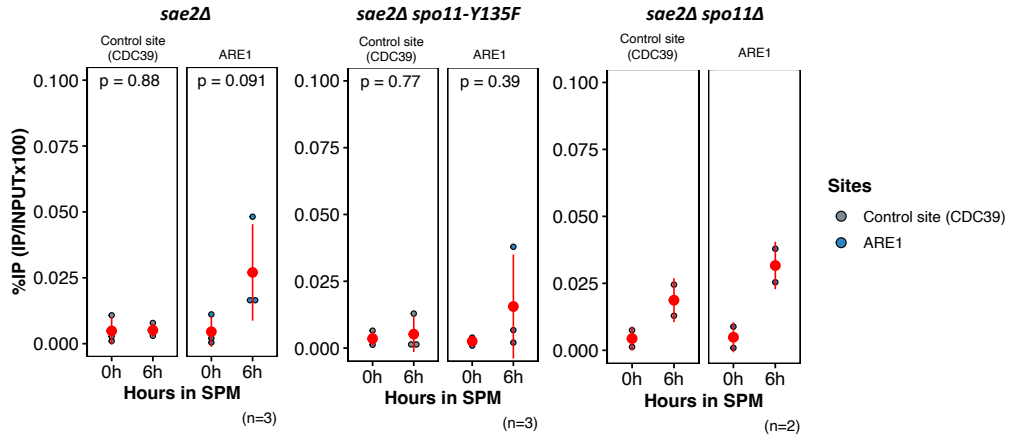
Cette annexe regroupe les %IP et FE des ChIPs de FLAG-Tel1 en condition *SAE2* WT, *sae2Δ*, *sae2Δ spo11-Y135F*, *sae2Δ xrs2-ΔC*. Tous les graphiques ont été générés à la même échelle (excepté en condition *SAE2* WT).

(A) %IP de FLAG-Tel1 par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et aux sites de l'axe *YBP1* et *GRR1* à 0 et 6h post induction méiotique.

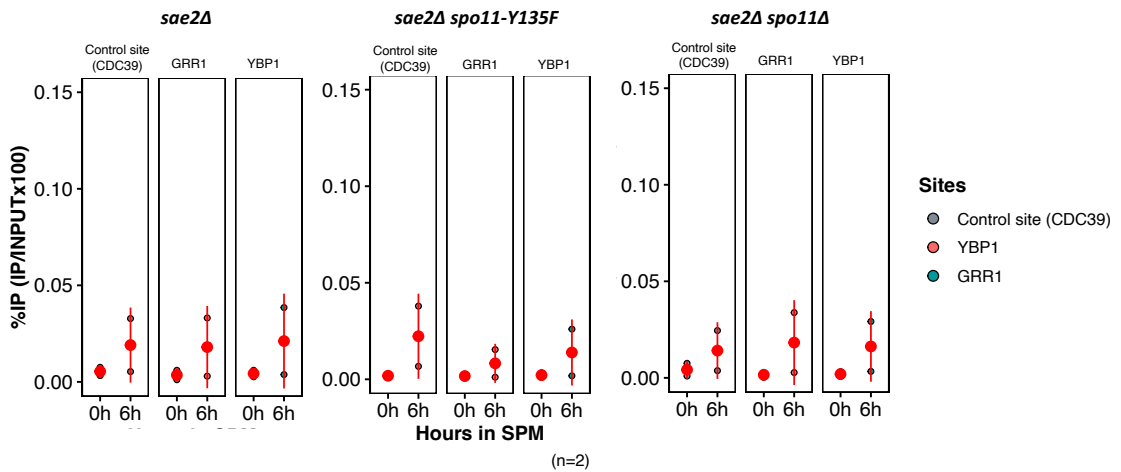
(B) Enrichissement en FLAG-Tel1 aux sites de l'axe *YBP1* et *GRR1* normalisé au site contrôle à 0 et 6h post induction méiotique.

Les *p*-valeurs ont été calculées par T-test.

Mre11 ChIP

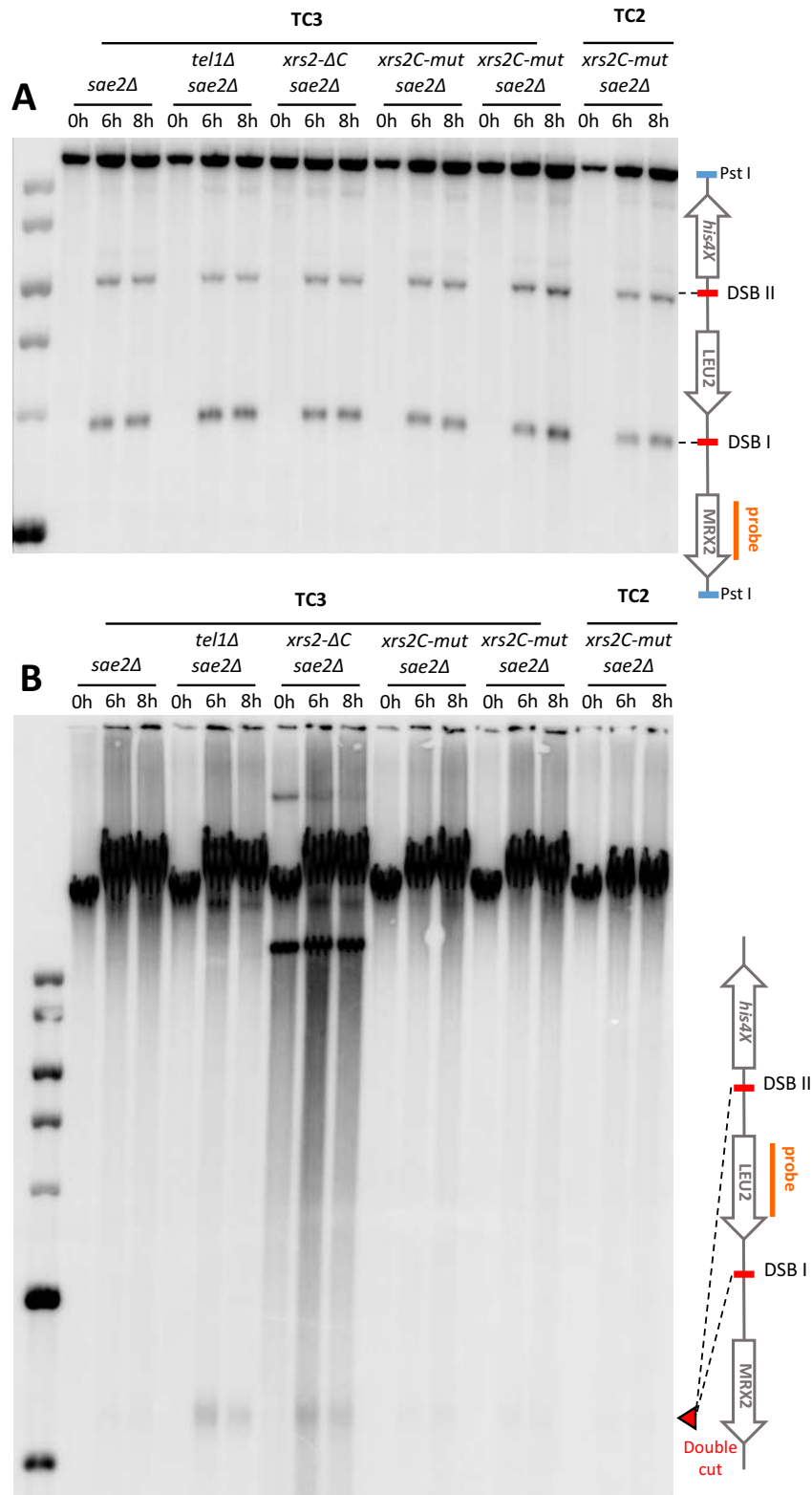


Mre11 ChIP



Annexe 8 : Recrutement de Mre11 aux sites de cassures et à l'axe

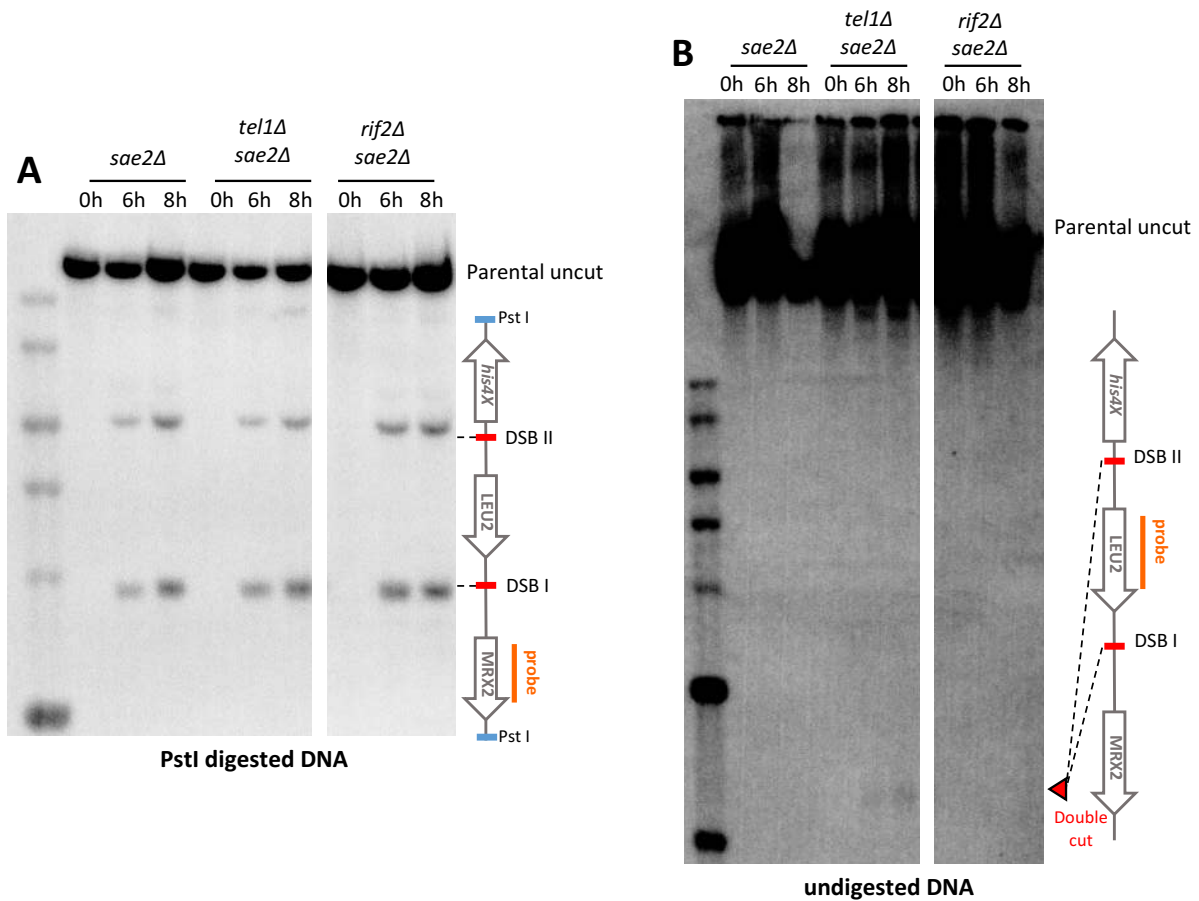
%IP de Mre11 par ChIP-qPCR au site contrôle *CDC39*, aux hotspots de cassures *ARE1*, *ATF2* et *GAT1* et aux sites de l'axe *GRR1* et *YBP1* à 0 et 6h post induction méiotique. Cette annexe regroupe les %IP des ChIP de Mre11 en condition *sae2Δ*, *sae2Δ spo11-Y135F* et *sae2Δ spo11Δ*.



Annexe 9 : Détection des DSBs au locus *HIS4::LEU2* en contexte *xrs2C-mut sae2Δ*

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ*, *sae2Δ xrs2-ΔC* et *sae2Δ xrs2C-mut*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot.

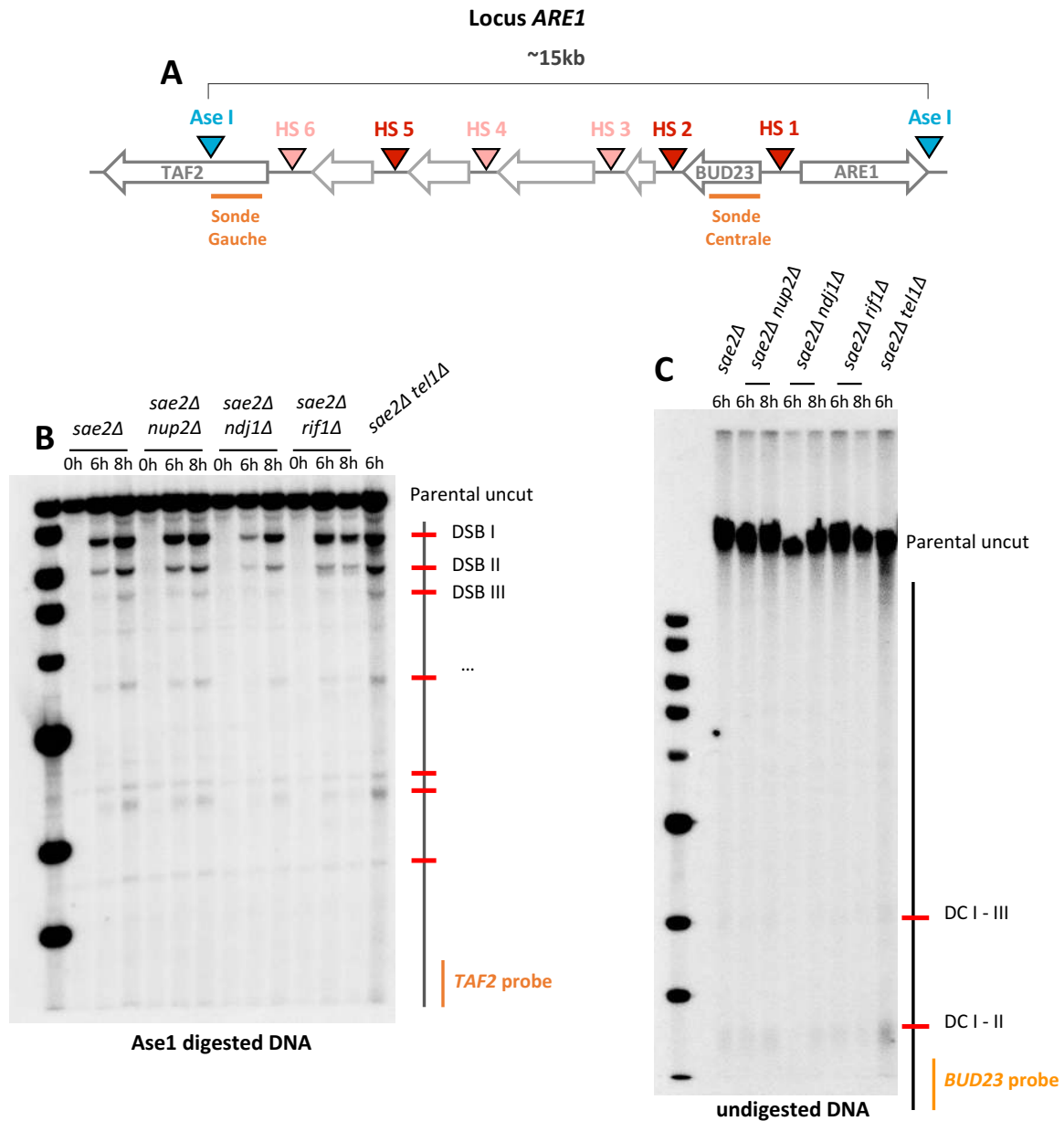
(B) Détection des DCs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ*, *sae2Δ xrs2-ΔC* et *sae2Δ xrs2C-mut*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *LEU2* par Southern blot.



Annexe 10 : Mesure de l'interférence à *HIS4::LEU2* en absence de Rif2

(A) Détection des DSBs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ rif2Δ*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *MRX2* par Southern blot.

(B) Détection des DCs formées au locus *HIS4::LEU2* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ tel1Δ* et *sae2Δ rif2Δ*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *LEU2* par Southern blot.

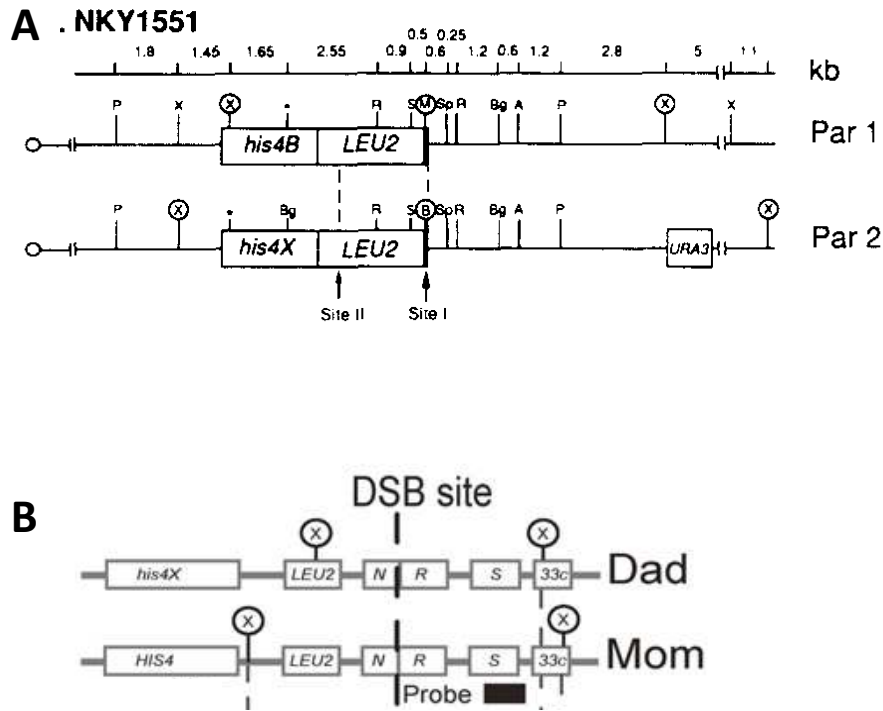


Annexe 11 : Mesure de l'interférence à ARE1 en absence de Nup2, Ndl1 ou Rif1

(A) Schématisation du locus *ARE1*

(B) Détection des DSBs formées au locus *ARE1* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Les DSBs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *TAF2* par Southern blot.

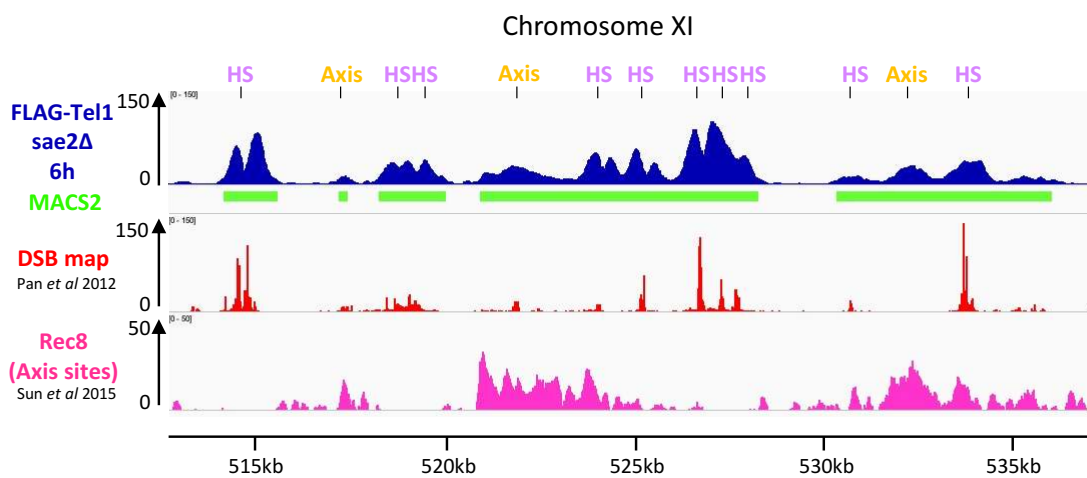
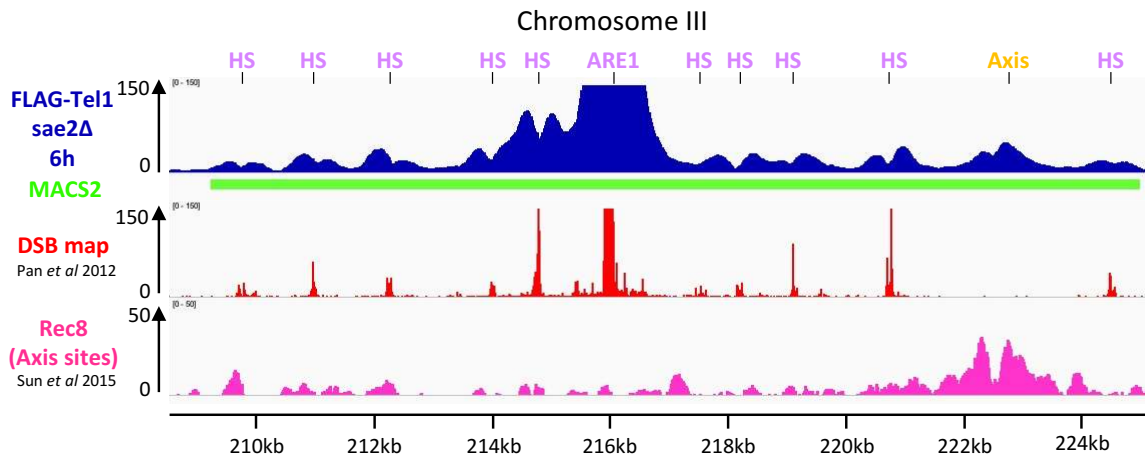
(C) Détection des DCs formées au locus *ARE1* dans les souches *sae2Δ*, *sae2Δ nup2Δ*, *sae2Δ ndj1Δ* et *sae2Δ rif1Δ*. Les DCs sont détectées à l'aide de la sonde radiomarquée *BUD23* par Southern blot.



Annexe 12 : Différentes constructions HIS4::LEU2

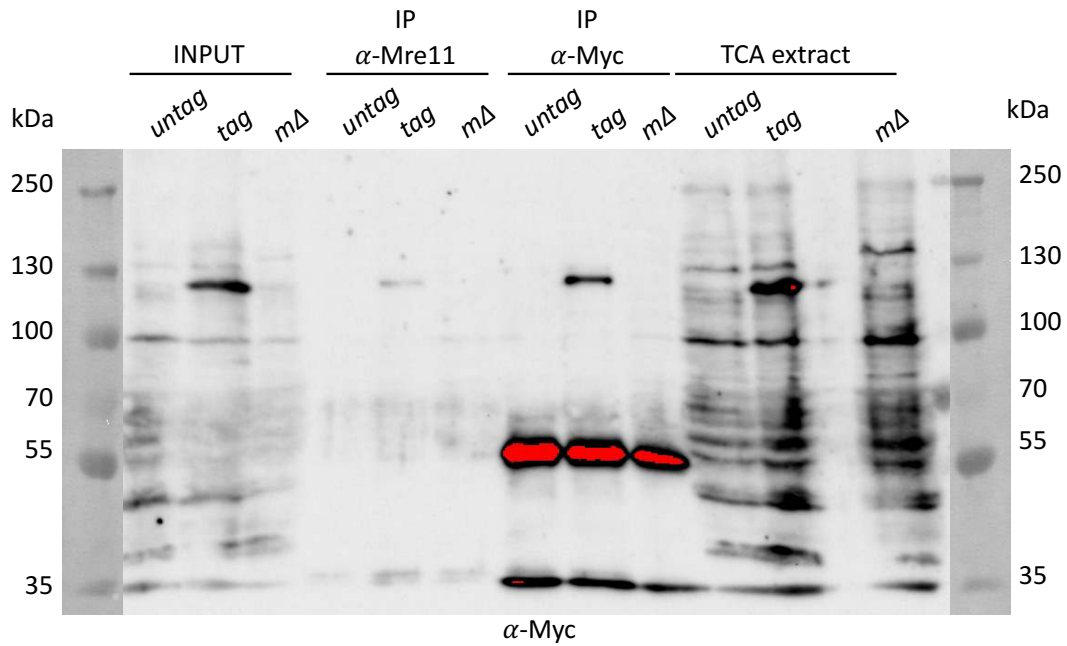
(A) Système *HIS4::LEU2* utilisé au laboratoire. Ce système a été réalisé et utilisé par Schwacha et Kleckner, 1994, Cell. Le locus contient deux sites de cassures (Site I et Site II) de part et d'autre de *LEU2*. De nombreux sites de restriction sont répartis sur ce locus : PstI, XhoI, BamHI, BglII, MluI, EcoRI, Sall, SphI. Les souches utilisées au laboratoire contiennent l'allèle *his4X::LEU2* (Par2) sans le marqueur *URA3*.

(B) Système *HIS4::LEU2* utilisé par Chu *et al.* Ce système a été mis au point par Hunter et Kleckner, 2001 et dérive du système mis au point par Schwacha et Kleckner, 1994. Bien qu'ils ne soient pas représentés, cette construction contient également deux sites de DSBs. Des sites de restrictions ont été modifiés sur cette construction.



Annexe 13 : Détection des pics Tel1 par MACS2

Visualisation sur IGV de l'enrichissement en Tel1 (bleu), des pics Tel1 détectés par MACS2 (vert), des sites de cassures (rouge) et des sites d'enrichissement en Rec8 (rose). Visualisation d'une portion du chromosome III (locus *ARE1*) et d'une portion du chromosome XI.



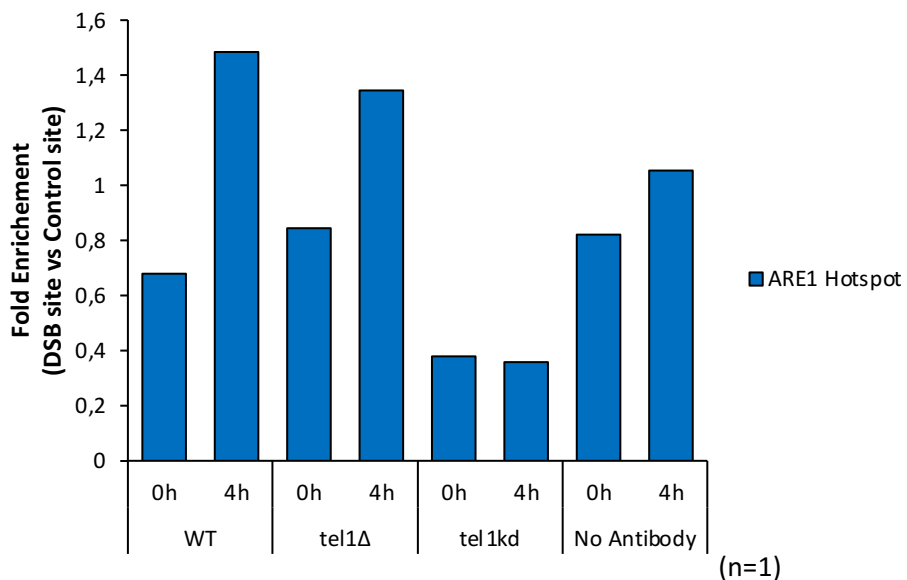
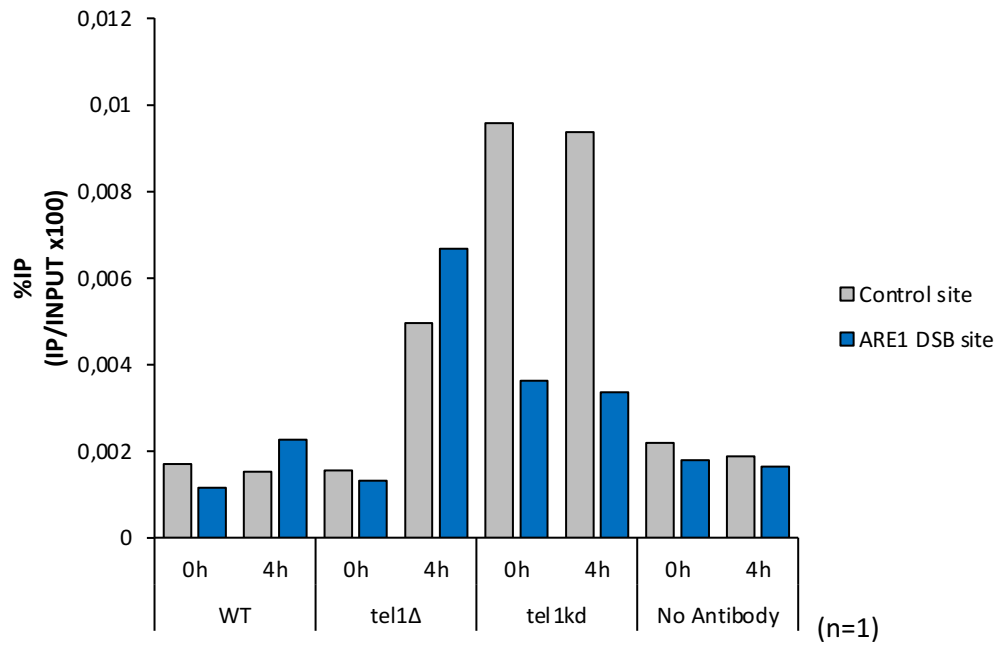
untag : *sae2Δ*

tag : *sae2Δ MRE11-myc*

mΔ : *mre11Δ*

Annexe 14 : Test de l'anticorps anti-Mre11 par immunoprécipitation de la chromatine de Mre11-myc

Western blot révélé avec un anticorps anti-myc, réalisé sur une immunoprécipitation de la protéine Mre11 (étiquetée ou non) à l'aide d'un anticorps directement dirigé contre la protéine. En contrôle, une immunoprécipitation anti-myc a été réalisée. Les deux immunoprécipitations ont été réalisées à partir du même échantillon, et correspondent au même « INPUT ». En contrôle, une extraction au TCA a été réalisée sur les échantillons.



Annexe 15 : Immunoprécipitation de la chromatine de Mre11 en contexte *SAE2* WT

%IP de Mre11 par CHIP-qPCR au site contrôle *CDC39* et au hotspot de cassures *ARE1* en contexte *SAE2 TEL1* WT, *tel1Δ*, *tel1kd* ou en absence d'anticorps.

Enrichissement en Mre11 aux hotspots de cassures *ARE1* normalisé au site contrôle en contexte *SAE2 TEL1* WT, *tel1Δ*, *tel1kd* ou en absence d'anticorps.

Résumé

La reproduction sexuée repose sur la méiose, une division cellulaire particulière qui génère des gamètes haploïdes à partir d'une cellule diploïde. La méiose assure la stabilité du génome tout en promouvant la diversité génétique des individus d'une population *via* la génération de crossovers entre chromosomes homologues. Ces crossovers résultent de la réparation par recombinaison homologue de cassures double-brin de l'ADN (DSB, Double Strand Breaks en anglais). Ces DSBs sont formées dans des régions appauvries en nucléosomes, qui correspondent à des promoteurs de gènes chez *Saccharomyces cerevisiae*, nommées « hotspots » de cassures. La génération de centaines de DSBs sur le génome nécessite une fine régulation spatio-temporelle de leur formation. Le mécanisme d'interférence entre DSBs, médié par Tel1, participe à la distribution des DSBs sur le génome en limitant la formation de plusieurs DSB à proximité. Afin d'appréhender le mécanisme d'action de Tel1 dans l'interférence, j'ai cherché à déterminer s'il agissait *in cis* ou *in trans*. Par immunoprécipitation de la chromatine, j'ai mis en évidence le recrutement de Tel1 aux sites de cassures, en réponse à leur formation, par le domaine carboxy-terminal de Xrs2. Ce recrutement est essentiel à la mise en place de l'interférence entre DSB méiotiques, démontrant un contrôle *in cis* de ce mécanisme. Récemment, le laboratoire a montré que l'activité kinase de Tel1 restreint spatialement la formation de cassures multiples (DC, double cuts en anglais) qui se produisent normalement au sein des hotspots de cassures. Dans un mutant de Tel1 dépourvu d'activité kinase, *tel1kd*, les DCs se propagent à l'intérieur des régions 5' des gènes adjacents. J'ai mis en évidence que ce phénomène est causé par le recrutement de Tel1kd par Xrs2 aux hotspots de cassures. De plus, il est apparu que le remodelleur de chromatine Fun30 est essentiel pour cette propagation des DC dans un contexte *tel1kd*, suggérant une potentielle régulation directe de Fun30 par Tel1.

Abstract

Sexual reproduction relies on meiosis, a specialized cell division which generates four haploid gametes starting from one diploid cell. At the population level, the meiotic program ensures genome stability but also promotes genetic diversity notably by promoting crossovers between homologous chromosomes. Such crossovers result from the repair by homologous recombination of programmed DNA double strand breaks (DSBs). DSB formation occurs during meiotic prophase I in nucleosome depleted regions, which correspond mainly to gene promoters in *Saccharomyces cerevisiae* and that are called DSB hotspots. Since hundreds of DSBs per genome occur during meiotic prophase I, DSB formation requires a strong spatiotemporal regulation. One of these spatial regulation mechanisms is Tel1-mediated DSB interference that limits DSB formation *in cis* and promotes evenly spaced events. In order to better understand this mechanism, I determined if Tel1-mediated DSB interference occurred by a *in cis* or a *in trans* control. By chromatin immunoprecipitation, I showed that Tel1 is recruited at DSB hotspots, upon DSB formation, by the Xrs2 carboxy-terminal domain. Importantly, this recruitment is required to mediate DSB interference, which is therefore controlled *in cis* by Tel1. In addition to Tel1-mediated DSB interference, recent work from the lab showed that Tel1 kinase activity restrains spatially hyperlocalised DNA double cuts (DCs), events that normally occur within DSB hotspots. In a *tel1-kinase-dead (tel1kd)* background, DCs spread into the 5' region of adjacent ORFs and I decided to investigate this regulation. I showed that the DC spreading phenotype is due to Tel1kd recruitment at DSB hotspots *via* the Xrs2 carboxy-terminal domain. Interestingly, our data also indicate that this DC spreading phenotype specific of the *tel1kd* background requires the chromatin remodeler Fun30, suggesting a potential regulation of Fun30 by Tel1.