Avis de Soutenance

Madame Asma SAIFUDEEN

Biologie-Santé - Spécialité Génétique

Soutiendra publiquement ses travaux de thèse intitulés

Caractérisation de la recombinaison méiotique et de l'architecture chromosomique dans la levure bourgeonnante Lachancea kluyveri

dirigés par Monsieur Bertrand LLORENTE

Thèse soutenue le ***lundi 04 décembre 2023*** à 14h30
Lieu : Bâtiment Z-Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), 27 Bd Leï Roure, CS 30059 13273 Marseille Cedex 09
Salle : Bibliothèque, Bâtiment Z, CRCM

Composition du jury proposé

M. Bertrand LLORENTE	Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Marseille, France	Directeur de thèse
M. Frédéric BAUDAT	Institut de Génétique Humaine, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France	Rapporteur
Mme Emmanuelle MARTINI	DRF/IBFJ/IRCM/laboratoire du developpement des gonads/ Institut de biologie François Jacob	Rapporteure
M. Gilles FISCHER	Laboratory of Computational and Quantitative Biology (LCQB), Institut de Biologie Paris Seine	Examinateur
Mme Marie-Noëlle SIMON	Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), Marseille, France	Président

Mots-clés : levures,recombinaison homologue,meiose,architecture des chromosomes,Lachancea kluyveri,

Résumé :

La méiose est une division cellulaire spécialisée essentielle pour la reproduction sexuée des eucaryotes. Elle consiste en une division réductionnelle produisant quatre cellules filles, ou gamètes, ayant un héritage génétique différent de la cellule mère. Au niveau de la population, le programme méiotique joue un rôle central dans la diversité génétique tout en préservant la stabilité du génome. Les cassures doubles brins de l'ADN (DSBs, Double Strand Breaks en anglais) sont induites à grande échelle et de manière programmée pendant la méiose par la protéine Spo11. Ces DSB sont générées dans des boucles de chromatine, ancrées par un axe de protéines telles que des cohésines, dont la sous-unité kléisine Rec8, ainsi que les protéines Red1 et Hop1, essentielles pour la formation des cassures de l'ADN. La réparation des DSBs par la recombinaison homologue promeut la formation de chiasmas, assurant une ségrégation précise des chromosomes méiotiques, prévenant ainsi des maladies génétiques telles que la trisomie 21 et l'infertilité. Des études

antérieures avec la levure Lachancea kluyveri ont révélé une absence naturelle de COs méiotiques et DSBs dans une région d'1-Mb qui contient le locus sexuel (MAT) (Brion et al., 2017). Des études complémentaires ont montré que les protéines d'axe du chromosome méiotique Hop1 et Red1, qui favorisent normalement la formation de DSB, ne sont pas non plus recrutées sur LakI0C-gauche, alors qu'il est capable de recruter Rec8 et de former des boucles de chromatine normalement (Legrand et al., 2023). Au cours de ma thèse, grâce à des études cytologiques, j'ai mis en évidence que l'absence de recrutement des protéines de l'axe et l'absence d'initiation de la recombinaison suffisent à provoquer l'échec de la synapse des homologues dans la région LakI0C-gauche, pourtant initiée dans le bras chromosomique LakI0C-droit. En outre, j'ai constaté que la longueur cumulée des chromosomes de L. kluyveri au stade pachytène est plus petite et que leur largeur est plus grande que celle de la levure bourgeonnante de référence Saccharomyces cerevisiae. Cette augmentation de largeur suggère des boucles plus longues chez L. kluyveri que chez S. cerevisiae, une tendance confirmée par les études de compactage des chromosomes utilisant la méthode HiC. La comparaison de la longueur et de la largeur des chromosomes pachytènes reflète le taux de recombinaison plus faible chez L. kluyveri que chez S. cerevisiae, conformément à la relation largement conservée entre la taille de l'axe des chromosomes méiotiques et le taux de recombinaison. J'ai également exploré des hypothèses variées, testant et excluant le rôle de plusieurs mutants de gènes candidats, tels que Tel1, Pch2, et Nup2, dans l'inhibition des Spo11-DSBs dans la région LakI0C-left. Pour mieux quantifier le défaut de recombinaison de LakI0C-left, j'ai utilisé un test rapporteur dédié, confirmant une absence totale de recombinaison dans plus de 128 méioses analysées dans un contexte diploïde homozygote. De manière intrigante, nous avons également découvert une liaison génétique entre le locus MAT et un phénotype de taille de colonie. Ce phénotype a servi de preuve potentielle quantifiable illustrant une liaison complète entre le locus MAT et des polymorphismes de séquence hétérozygotes accumulés sur le bras chromosomique LakI0C-gauche en conséquence de son défaut de recombinaison. En outre, j'ai étudié l'auto-diploïdisation spontanée chez les haploïdes de L. kluyveri et découvert que son origine était une endoréduplication possible au cours de la mitose plutôt que des erreurs méiotiques. Essentiellement, j'ai utilisé diverses techniques cytologiques et génétiques pour mieux caractériser la RH méiotique dans la levure exotique L. kluyveri, en l'utilisant comme modèle naturel pour élucider l'impact de la recombinaison sur la structure des chromosomes méiotiques et vice versa.

LE DOYEN

Georges LEONETTI

Résumé

La méiose est une division cellulaire spécialisée essentielle pour la reproduction sexuée des eucaryotes. Elle consiste en une division réductionnelle produisant quatre cellules filles, ou gamètes, ayant un héritage génétique différent de la cellule mère. Au niveau de la population, le programme méiotique joue un rôle central dans la diversité génétique tout en préservant la stabilité du génome. Les cassures doubles brins de l'ADN (DSBs, Double Strand Breaks en anglais) sont induites à grande échelle et de manière programmée pendant la méiose par la protéine Spo11. Ces DSB sont générées dans des boucles de chromatine, ancrées par un axe de protéines telles que des cohésines, dont la sous-unité kléisine Rec8, ainsi que les protéines Red1 et Hop1, essentielles pour la formation des cassures de l'ADN. La réparation des DSBs par la recombinaison homologue promeut la formation de chiasmas, assurant une ségrégation précise des chromosomes méiotiques, prévenant ainsi des maladies génétiques telles que la trisomie 21 et l'infertilité. Des études antérieures avec la levure *Lachancea kluyveri* ont révélé une absence naturelle de COs méiotiques et DSBs dans une région d'1-Mb qui contient le locus sexuel (MAT) (Brion et al., 2017). Des études complémentaires ont montré que les protéines d'axe du chromosome méiotique Hop1 et Red1, qui favorisent normalement la formation de DSB, ne sont pas non plus recrutées sur Lakl0C-gauche, alors qu'il est capable de recruter Rec8 et de former des boucles de chromatine normalement (Legrand et al., 2023).

Au cours de ma thèse, grâce à des études cytologiques, j'ai mis en évidence que l'absence de recrutement des protéines de l'axe et l'absence d'initiation de la recombinaison suffisent à provoquer l'échec de la synapse des homologues dans la région Lakl0C-gauche, pourtant initiée dans le bras chromosomique Lakl0C-droit. En outre, j'ai constaté que la longueur cumulée des chromosomes *de L. kluyveri* au stade pachytène est plus petite et que leur largeur est plus grande que celle de la levure bourgeonnante de référence *Saccharomyces cerevisiae*. Cette augmentation de largeur suggère des boucles plus longues chez *L. kluyveri* que chez *S. cerevisiae*, une tendance confirmée par les études de compactage des chromosomes utilisant la méthode HiC. La comparaison de la longueur et de la largeur des chromosomes pachytènes reflète le taux de recombinaison plus faible chez *L. kluyveri* que chez *S. cerevisiae*, conformément à la relation largement conservée entre la taille de l'axe des chromosomes méiotiques et le taux de recombinaison.

J'ai également exploré des hypothèses variées, testant et excluant le rôle de plusieurs mutants de gènes candidats, tels que Tel1, Pch2, et Nup2, dans l'inhibition des Spo11-DSBs dans la région Lakl0C-left. Pour mieux quantifier le défaut de recombinaison de Lakl0C-left, j'ai utilisé un test rapporteur dédié, confirmant une absence totale de recombinaison dans plus de 128 méioses analysées dans un contexte diploïde homozygote. De manière intrigante, nous avons également découvert une liaison génétique entre le locus MAT et un phénotype de taille de colonie. Ce phénotype a servi

de preuve potentielle quantifiable illustrant une liaison complète entre le locus MAT et des polymorphismes de séquence hétérozygotes accumulés sur le bras chromosomique Lakl0C-gauche en conséquence de son défaut de recombinaison. En outre, j'ai étudié l'auto-diploïdisation spontanée chez les haploïdes de *L. kluyveri* et découvert que son origine était une endoréduplication possible au cours de la mitose plutôt que des erreurs méiotiques. Essentiellement, j'ai utilisé diverses techniques cytologiques et génétiques pour mieux caractériser la RH méiotique dans la levure exotique *L. kluyveri*, en l'utilisant comme modèle naturel pour élucider l'impact de la recombinaison sur la structure des chromosomes méiotiques et vice versa.

Mots clés : levures, méiose, recombinaison homologue, architecture des chromosomes, *lachancea kluyveri*

Abstract

Meiosis is a specialized cell division crucial for the sexual reproduction of eukaryotes. It consists of a reductional division and produces four daughter cells, or gametes, or sex cells, with a genetic heritage different from the mother cell. At the population level, the meiotic program plays a pivotal role in enhancing genetic diversity while simultaneously preserving genome stability. During meiosis, programmed DNA double-strand breaks (DSBs) are induced extensively genome-wide by Spo11. These DSBs are organized within chromatin loops, anchored on a proteinaceous axis composed of cohesins, including the Rec8 kleisin subunit, and Red1 and Hop1, key proteins for DSB formation. Subsequent DSB repair through the homologous recombination (HR) pathway promotes the formation of crossovers (COs) between homologous chromosomes. In combination with sister chromatid cohesion, such COs ensure accurate segregation of meiotic chromosomes, thereby preventing aneuploidy-related genetic diseases, like Down syndrome and infertility, thereby making studies on meiotic regulation relevant for human health. All these DNA transactions and chromosome segregation are accompanied by gross chromosome structural changes like condensation, chromosome pairing, and synapsis. Previous studies from our laboratory using the budding yeast species *Lachancea kluyveri* showed that there is a natural absence of meiotic COs and DSBs in a 1-Mb long region in the left arm of Chromosome C (Lakl0C-left) that contains the sex locus (MAT locus) (Brion et al., 2017). This phenotype is reminiscent of the lack of recombination on large regions of sex chromosomes from many species, including fungi and mammals. Further studies showed that the meiotic chromosome axis proteins Hop1 and Red1, which normally promote DSB formation, are also not recruited on Lakl0C-left, while it is able to recruit Rec8 and form chromatin loops normally (Legrand et al., 2023).

During my thesis, through cytological studies, I revealed that the lack of recruitment of the axis proteins and the failure to initiate recombination is sufficient to cause the failure of homolog synapsis in the Lakl0C-left region, despite being initiated in the Lakl0C-right chromosome arm. In addition, I found that the cumulated length of *L. kluyveri* pachytene-stage chromosomes is smaller, and their width is bigger than that of the reference budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This increase in width suggests longer loops in *L. kluyveri* compared to *S. cerevisiae*, a trend supported by chromosome compaction studies using the HiC method. The comparison of length and width in pachytene chromosomes together reflects the previously reported lower *L. kluyveri* recombination rate compared to *S. cerevisiae*, consistent with the widely conserved relationship between chromosome axis length and recombination rate. In addition to these findings, I explored various hypotheses where I tested and ruled out the role of several candidate gene mutants, such as Tel1, Pch2, and Nup2, in the inhibition of Spo11-DSBs in the Lakl0C-left region. To better quantify the recombination defect of Lakl0C-left, I employed a dedicated reporter assay, confirming a complete absence of recombination in over 128 meioses analyzed in a homozygous diploid background. Intriguingly, we also uncovered a genetic linkage

between the *MAT* locus and a colony-size phenotype, which acted as putative quantifiable evidence illustrating a complete *MAT*-associated linkage of accumulated heterozygous sequence polymorphisms on Lakl0C-left chromosome arm as a consequence of its recombination defect. In addition to this, I also explored spontaneous auto-diploidization in *L. kluyveri* haploids in the lab and found its origin to be possible endoreduplication during mitosis rather than meiotic errors. In essence, I used various cytological and genetic techniques to better characterize the unique features of meiotic HR in the exotic yeast *L. kluyveri*, using it as a natural model to elucidate the impact of recombination on meiotic chromosome structure and vice versa.

Keywords: yeasts, meiosis, homologous recombination, chromosome architecture, *lachancea kluyveri*