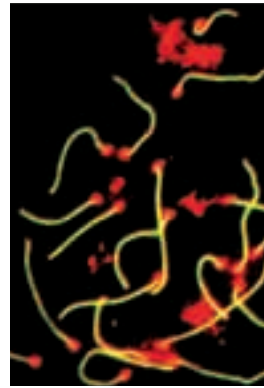


> La recombinaison entre chromosomes homologues est un processus essentiel dont le rôle mécanique est d'assurer la ségrégation réductionnelle des chromosomes lors de la première division de méiose. La protéine Spo11 est responsable du déclenchement de la recombinaison méiotique par formation de cassures double-brin de l'ADN, et cette activité est apparentée à celle des ADN topo-isomérases de type II. Spo11 et sa fonction ont été conservées au cours de l'évolution, de la levure à l'homme: chez tous les eucaryotes testés, les mutants *spo11* sont déficients pour la recombinaison méiotique et ont une fertilité réduite, voire nulle. Cette stérilité reflète selon les cas un dysfonctionnement de la ségrégation des chromosomes ou un arrêt de la différenciation germinale. L'étude phénotypique des différents mutants met en évidence un ensemble de régulations complexes entre la recombinaison et d'autres événements de la prophase de méiose, tels que l'appariement des chromosomes et le contrôle du cycle cellulaire méiotique. <

SP011 : une activité de coupure de l'ADN indispensable à la méiose

Frédéric Baudat, Bernard de Massy



Institut de génétique humaine,
CNRS UPR 1142,
141, rue de la Cardonille,
34396 Montpellier Cedex 05,
France.

bdemassy@igh.cnrs.fr

ments non réciproques,
et des *crossing-over*.

L'étape de cassure est déterminante, puisqu'elle provoque une lésion dans l'ADN (ce qui peut être dangereux pour la cellule) et qu'elle conditionne la fréquence et la distribution des événements de recombinaison. Elle est sous la dépendance de plusieurs gènes dont la fonction est dans la plupart des cas encore inconnue. En 1997, la fonction de l'un d'entre eux a été identifiée: il s'agit du gène codant pour la protéine Spo11, dont la fonction proposée est de catalyser la formation de ces CDB.

Spo11 : un mutant de sporulation chez *S. cerevisiae* déficient pour le déclenchement de la recombinaison méiotique

Spo11, un mutant de *S. cerevisiae* isolé en 1969, est caractérisé par une anomalie de la méiose qui conduit à la formation de spores non viables [2]. Dans les mutants nuls *spo11Δ* (délétion du gène), aucune cassure double-brin méiotique n'est détectée [3], d'où une absence de recombinaison qui a pour conséquences une ségrégation aléatoire des chromosomes à la première division et un contenu chromosomique anormal dans la majorité des spores. À ce stade, un rôle aussi bien direct qu'indirect pouvait être envisagé pour Spo11 dans l'étape de formation des CDB.

En première division de méiose, chaque paire de chromosomes homologues est connectée par au moins un événement de recombinaison réciproque, ou *crossing-over*, visible au microscope sous forme de chiasma. Ces événements d'échanges, produits en prophase, sont essentiels pour la ségrégation réductionnelle des chromosomes homologues: en l'absence de recombinaison méiotique, la ségrégation des chromosomes est en effet altérée, ce qui conduit en général à la formation de gamètes au contenu chromosomique anormal, et donc à une stérilité. Au niveau moléculaire, il a été montré chez *Saccharomyces cerevisiae* (pour revue, voir [1]) que les événements de recombinaison débutent par la formation de cassures double-brin (CDB) de l'ADN chromosomique. Leur réparation par recombinaison avec le chromosome homologue engendre des conversions géniques, événe-

La fonction de Spo11 révélée par les archaebactéries

Chez *S. cerevisiae*, des analyses moléculaires ont montré que - en présence de la mutation *rad50S* qui bloque la réparation des cassures [4] - les extrémités 5' des CDB sont associées de manière covalente avec une protéine. Cette observation a conduit à la proposition que ces cassures soient produites par une des protéines connues pour former des liaisons covalentes avec l'ADN comme les topo-isomérases [5-7].

En 1997, une homologie a été identifiée entre la sous-unité catalytique (A) d'une famille de topo-isomérases de type II nouvellement découverte chez les archaebactéries, appelée TopoVI [8], et la protéine Spo11. Or, les

topo-isomérases de ce type produisent transitoirement des CDB et restent attachées de façon covalente aux extrémités de ces cassures, celles-ci étant ensuite à nouveau attachées par l'enzyme elle-même. Spo11 est donc apparue comme protéine candidate pour l'activité de formation des CDB méiotiques. L'implication directe de Spo11 dans la catalyse des CDB a par la suite été confirmée par deux approches.

D'une part, la coupure d'un brin d'ADN implique la présence dans toutes les topo-isomérases d'une tyrosine, appelée tyrosine catalytique; or, une souche de *S. cerevisiae* portant la mutation *spo11Y135F* (changement de la tyrosine 135 en phénylalanine) à l'état homozygote ne forme pas de CDB méiotiques [8]. D'autre part, Spo11 est effectivement associée de manière covalente aux extrémités 5' des CDB méiotiques *in vivo* [9].

Un modèle d'action de Spo11 peut être proposé sur la base des données structurales de l'homologue de Spo11 chez l'archaebactérie *Methanococcus jannashii* [10] et de la conservation structurelle entre cette TopoVIA et la protéine Spo11 de *S. cerevisiae* (B. de Massy et J.P. Pin, données non publiées) (Figure 1). Selon ce modèle, Spo11 n'aurait pas, contrairement aux topo-isomérases, les propriétés nécessaires pour attacher de nouveau les CDB.

Conservation de Spo11 chez les eucaryotes

Des homologues de TopoVIA et Spo11 sont, respectivement, présents chez toutes les archaebactéries et tous les eucaryotes testés (pour revue, voir [11, 12]). L'analyse des mutants des gènes correspondant à ces homologues a été réalisée par des méthodes différentes selon les organismes étudiés: test de fertilité, analyse cellulaire de la différenciation, analyse cytologique, ou encore analyse génétique et moléculaire de la recombinaison (Tableau 1). Les résultats révèlent plusieurs caractéristiques communes aux différentes espèces étudiées [13-19, 20]. La fertilité est réduite ou nulle chez tous les mutants *spo11* (délétion ou interruption

du gène). Dans les espèces où l'on peut évaluer la fréquence de recombinaison chez des organismes stériles ou à fertilité réduite, une absence totale de recombinaison méiotique est observée. Chez *Mus musculus*, où une telle approche n'est pas réalisable, le test est celui de la formation des chiasmats. Celle-ci est absente chez toutes les espèces où elle a été recherchée (*M. musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* et *Sordaria macrospora*). L'ensemble de ces observations montre que la majorité, si ce n'est la totalité, des événements de recombinaison méiotique est sous le contrôle de Spo11. Enfin, la recherche directe du rôle de Spo11 dans le déclenchement de la recombinaison n'a pour l'instant été réalisée que chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, des organismes chez lesquels cette étape est effectivement analysable par détection moléculaire des CDB en méiose: aucune CDB ne peut être détectée en l'absence de Spo11 [3, 15].

Les mutations de Spo11 n'ont toutefois pas toujours des conséquences identiques pour toutes les espèces: ainsi en est-il des altérations observées dans l'appariement

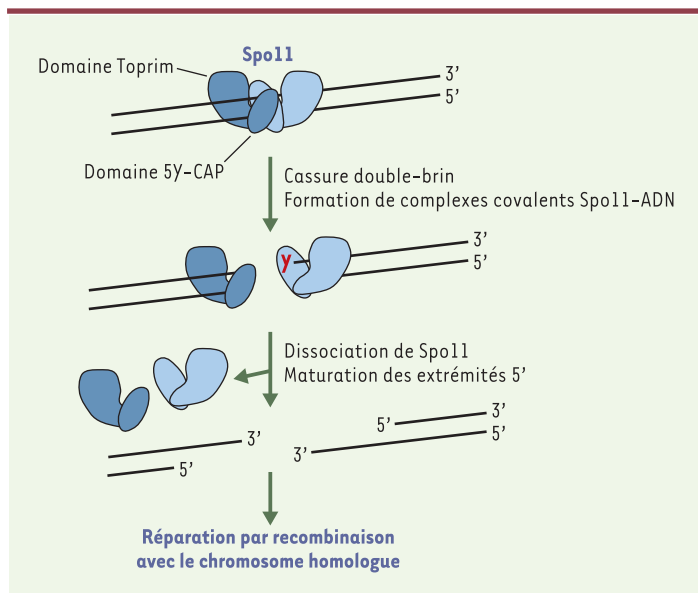


Figure 1. Déclenchement de la recombinaison méiotique par formation de cassures double-brin (CDB) catalysée par Spo11. Le domaine carboxy-terminal Toprim (commun aux topo-isomérases et aux primases) de chaque monomère de Spo11 interagit avec le domaine 5Y-CAP (*catabolite gene activator protein*) de l'autre monomère. Un dimère se fixe sur l'ADN, introduit une cassure double-brin par l'intermédiaire des tyrosines catalytiques (Y) situées dans les domaines 5Y-CAP et forme deux intermédiaires covalents avec les deux extrémités 5' d'ADN. À ce stade, les monomères peuvent rester associés ou se séparer. Spo11 se dissocie ensuite de l'ADN selon un mécanisme non encore identifié, qui pourrait impliquer soit une réaction d'hydrolyse de la liaison phosphodiester, soit une coupure simple brin en 3' du complexe Spo11-ADN. Les cassures double-brin ainsi formées sont ensuite réparées par recombinaison avec le chromosome homologue.

des chromosomes et la progression du cycle méiotique. L'appariement des chromosomes est caractérisé en prophase par la formation d'une structure protéique nommée complexe synaptonémal (pour la souris, en particulier, voir [21]). Plusieurs études suggèrent que les étapes de déclenchement de la recombinaison ont lieu avant la formation de ce complexe [22]. D'ailleurs, celle-ci n'est pas assurée dans les mutants *spo11* de *S. cerevisiae*, *S. macrospora*, *Coprinus cinereus* et *M. musculus* (Figure 2), suggérant que le déclenchement de la recombinaison est requis pour l'assemblage du complexe synaptonémal. En revanche, dans d'autres modèles comme *C. elegans* ou *Drosophila melanogaster*, le complexe synaptonémal se forme normalement [16, 23], ce qui suggère l'existence, au moins chez ces organismes, d'un mécanisme d'appariement des chromosomes indépendant de la recombinaison.

L'absence de recombinaison a également des conséquences très différentes sur le déroulement du cycle méiotique selon les espèces. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, *S. macrospora*, *S. pombe*, *A. thaliana*, *C. elegans* ou *D. melanogaster*, les divisions méiotiques se poursuivent malgré le dysfonctionnement de la ségrégation réductionnelle. En revanche, chez *C. cinereus* et *M. musculus*, le cycle méiotique est interrompu en prophase et les cellules méiotiques entrent en apoptose. Il est intéressant

de remarquer qu'au sein même de l'espèce *M. musculus*, les réponses du cycle cellulaire et d'induction d'apoptose diffèrent entre les méioses mâle et femelle.

Questions encore sans réponse

Quel rôle pour les partenaires de Spo11 ?

Bien que le modèle actuel du rôle direct de Spo11 dans le déclenchement de la recombinaison par formation de CDB explique de manière assez satisfaisante plusieurs aspects de la recombinaison méiotique, l'activité enzymatique de Spo11 n'a pas encore été démontrée *in vitro*. À l'image de son homologue chez les archaebactéries, composé de la sous-unité catalytique TopoVIA et d'une autre sous-unité, TopoVIB, qui contient un site de fixation de l'ATP nécessaire à l'activité de coupure de l'ADN [24], l'activité de Spo11 pourrait nécessiter la présence d'une autre protéine. Or, aucune protéine homologue à TopoVIB n'a été identifiée chez les eucaryotes: il est possible que Spo11 ait évolué de manière à ne plus nécessiter une seconde sous-unité pour son activité catalytique, ou que les propriétés de l'éventuelle seconde sous-unité diffèrent de celles de TopoVIB.

Une situation qui reste exceptionnelle a été décrite chez *A. thaliana*: son génome possède trois homologues de Spo11, et il est le seul eucaryote connu à ce jour pour

	Fertilité ¹	Recombinaison méiotique	Formation de chiasmats	Présence de CDB	Complexe synaptonémal	Progression en méiose
<i>S. cerevisiae</i>	nulle < 0,1%	non	nt	non	non	oui
<i>S. macrospora</i>	réduite	réduite < 10%	non	nt	non	oui
<i>S. pombe (rec12)</i>	réduite 25%	non	nt	non	— ²	oui
<i>C. cinereus</i>	réduite 1,6%	nt	nt	nt	non	arrêt/apoptose
<i>A. thaliana</i>	réduite 2-10%	réduite < 10%	réduite < 10%	nt	nt	oui
<i>C. elegans</i>	nulle < 0,1%	non	non	nt	oui	oui
<i>D. melanogaster (mei-W68)</i>	réduite	non	nt	nt	oui	oui
<i>M. musculus</i>	nulle	nt	non	nt	non	arrêt/apoptose

Tableau 1. Phénotype des mutants *spo11*. CDB: cassure double-brin; nt: non testé(e); ¹: les différences de fertilité peuvent s'expliquer par celles du nombre de chromosomes; ²: pas de complexe synaptonémal chez *S. pombe*. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, qui possède seize paires de chromosomes, la probabilité de former un gamète euploïde par ségrégation aléatoire est considérablement plus faible que pour *S. pombe*, qui n'a que trois paires de chromosomes.

posséder un homologue identifié de la sous-unité Topo-VIB. Un des homologues de Spo11, exprimé spécifiquement dans les tissus floraux, est requis pour la recombinaison méiotique, suggérant qu'il s'agit là de l'homologue fonctionnel de Spo11 [17]. Les deux autres sont exprimés dans les tissus végétatifs et interagissent tous deux avec l'homologue de TopoVIB: ils pourraient donc avoir avec cette dernière une activité de topoisomérase [25]. Cette situation suggère une corrélation entre la différenciation des fonctions TopoVI et Spo11 et la présence ou l'absence de la sous-unité B.

Malgré l'absence d'homologue de TopoVIB identifié, l'activité de Spo11 semble nécessiter la présence de partenaires dont le rôle reste à définir: en effet, chez *S. cerevisiae*, pas moins de dix gènes, outre *SPO11*, sont nécessaires à la formation des CDB (pour revue, voir [11]). Certaines de ces protéines interagissent d'ailleurs avec Spo11: Rec102 et Spo11 ont ainsi été co-immunoprécipités au sein d'un même complexe [26], et une interaction entre Ski8 et Spo11 a été mise en évidence par la méthode du double hybride [27]. En revanche, aucun partenaire de Spo11 n'a pu être identifié chez les autres eucaryotes.

Comment les cibles de Spo11 sont-elles choisies ?

Bien que les CDB méiotiques soient localisées dans des régions précises, aucune spécificité de séquence n'a encore été mise en évidence. Toutefois, des études menées chez la levure montrent que les cibles de Spo11 correspondent à certaines régions accessibles de la chromatine (pour revue, voir [28]) dont les spécificités ne sont pas connues. A. Peciña *et al.* [29] ont étudié les propriétés de la protéine de fusion Gal4-Spo11, Gal4 portant un domaine de reconnaissance et de fixation à une séquence spécifique de l'ADN. Cette protéine chimérique permet la formation de CDB ciblées vers de nouveaux sites: les motifs de fixation de Gal4. Cependant, les dix autres gènes nécessaires à la formation des CDB méiotiques restent tous indispensables à la formation de CDB à ces

nouveaux sites. Ces expériences démontrent que ces gènes jouent un rôle essentiel pour l'activité de Spo11, indépendamment du contrôle du choix de la cible [29].

Que fait Spo11 avant et après la formation des CDB ?

La phase de réplication préméiotique se déroule juste avant le début de la prophase. Deux analyses chez *S. cerevisiae* ont mis en évidence une relation entre cette phase S et le début de la recombinaison. D'une part, il a été montré qu'un intervalle de temps constant sépare la réplication de la formation des CDB, qui intervient par conséquent plus tôt dans les régions répliquées précocement que dans les régions répliquées tardivement [30]. D'autre part, la phase S est raccourcie chez le mutant *spo11Δ*. Bien qu'encore inexplicables, ces observations suggèrent que certains éléments impliqués dans le déclenchement de la recombinaison, et peut-être Spo11 elle-même, sont mis en place dès la réplication préméiotique [31].

Par ailleurs, un rôle tardif de Spo11, postérieur à la formation des CDB, a été suggéré. La localisation de Spo11 par immunocytochimie chez *M. musculus* et *S. macrospora* met en évidence des foyers au stade leptotène, stade auquel les CDB sont détectées chez la levure. De plus, au stade pachytène, alors que les étapes de déclenchement de la recombinaison sont en principe

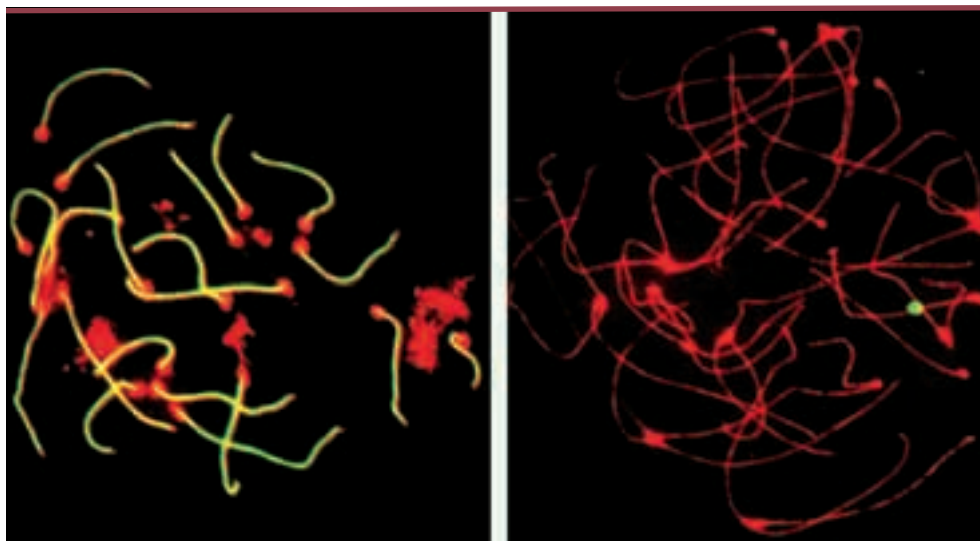


Figure 2. Analyse de l'appariement des chromosomes dans des ovocytes de souris. Les protéines Sycp3 (*synaptonemal complex protein 3*) (en rouge) et Sycp1 (*synaptonemal complex protein 1*) (en vert) marquent respectivement les axes des chromosomes et les régions appariées dans le complexe synaptonémal. La superposition de ces deux marquages produit un signal jaune. Les centromères situés à l'extrémité de chacun des chromosomes sont également repérés (en rouge) par des anticorps anticentromères (provenant du sérum de sujets présentant un syndrome Crest - calcinose, Raynaud, œsophage, sclérodactylie, tégangiectasies). À gauche, dans une lignée sauvage, les 20 paires de chromosomes homologues sont appariées. À droite, chez un mutant *Spo11*^{-/-}, les axes des 40 chromosomes sont formés, mais les chromosomes ne sont pas appariés (la tache verte est un artefact).

passées, Spo11 est détectée le long des axes des chromosomes appariés [32]. L'ensemble de ces résultats, s'ils n'apportent pas de réponse claire, reflètent sans doute une régulation complexe de la protéine Spo11 avant et après son activité de formation de CDB.

Conclusions

L'étude des caractéristiques de la protéine Spo11 dans différentes espèces révèle une conservation du mécanisme de déclenchement de la recombinaison méiotique par formation de cassures double-brin, qui devra toutefois être confirmée par la mise en évidence des propriétés de coupures de l'ADN de la protéine Spo11 *in vitro*, et par la mise en évidence de CDB méiotiques chez les eucaryotes supérieurs. Compte tenu du danger potentiel que peut constituer l'activité de Spo11 dans une cellule, un aspect tout à fait fascinant et encore à explorer est celui de sa régulation : comment Spo11 est-elle activée, dirigée vers ses cibles et par la suite inactivée ? Un dérèglement pourrait en effet avoir des conséquences délétères non seulement sur le déroulement de la méiose, mais également dans les cellules somatiques. En effet, même si le gène *SPO11* n'est normalement exprimé qu'en méiose (l'analyse génétique des mutants *spo11* n'a d'ailleurs permis de déceler aucun phénotype somatique jusqu'à ce jour), on peut imaginer les conséquences sur la stabilité du génome d'une expression inappropriée de *SPO11* dans les cellules végétatives. ♦

RÉFÉRENCES

- Smith KN, Nicolas A. Recombination at work for meiosis. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 200-11.
- Klapholz S, Waddell CS, Esposito RE. The role of the SPO11 in meiotic recombination in yeast. *Genetics* 1985; 110: 187-216.
- Cao L, Alani E, Kleckner N. A pathway for generation and processing of double-strand breaks during meiotic recombination in *S. cerevisiae*. *Cell* 1990; 61: 1089-101.
- Alani E, Padmore R, Kleckner N. Analysis of wild-type and *rad50* mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* 1990; 61: 419-36.
- Liu J, Wu TC, Lichten M. The location and structure of double-strand DNA breaks induced during yeast meiosis: evidence for a covalently linked DNA-protein intermediate. *EMBO J* 1995; 14: 4599-608.
- Keeney S, Kleckner N. Covalent protein-DNA complexes at the 5' strand termini of meiosis-specific double-strand breaks in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11274-8.
- De Massy B, Rocco V, Nicolas A. The nucleotide mapping of DNA double-strand breaks at the *CYS3* initiation site of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1995; 14: 4589-98.
- Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* 1997; 386: 414-7.
- Keeney S, Giroux CN, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 1997; 88: 375-84.
- Nichols MD, DeAngelis K, Keck JL, Berger JM. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *EMBO J* 1999; 18: 6177-88.
- Keeney S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 2001; 52: 1-53.
- Lichten M. Meiotic recombination: breaking the genome to save it. *Curr Biol* 2001; 11: R253-6.
- Baudat F, Manova K, Yuen JP, Jasin M, Keeney S. Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking *spo11*. *Mol Cell* 2000; 6: 989-98.
- Celerin M, Merino ST, Stone JE, Menzie AM, Zolan ME. Multiple roles of *spo11* in meiotic chromosome behavior. *EMBO J* 2000; 19: 2739-50.
- Cervantes MD, Farah JA, Smith GR. Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol Cell* 2000; 5: 883-8.
- Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M, Villeneuve AM. Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 1998; 94: 387-98.

17. Grelon M, Vezon D, Gendrot G, Pelletier G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* 2001; 20: 589-600.
18. McKim KS, Hayashi-Hagihara A. mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev* 1998; 12: 2932-42.
19. Lin Y, Smith GR. Transient, meiosis-induced expression of the *rec6* and *rec12* genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 1994; 136: 769-79.
20. Storlazzi A, Tesse S, Gargano S, James F, Kleckner N, Zickler D. Meiotic double-strand breaks at the interface of chromosome movement, chromosome remodeling, and reductional division. *Genes Dev* 2003; 16: 16.
21. Moens PB, Kolas NK, Tarsounas M, Marcon E, Cohen PE, Spyropoulos B. The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* 2002; 115: 1611-22.
22. Zickler D, Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 1999; 33: 603-754.
23. McKim KS, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, et al. Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 1998; 279: 876-8.
24. Buhler C, Lebbink JH, Bocs C, Ladenstein R, Forterre P. DNA topoisomerase VI generates ATP-dependent double-strand breaks with two-nucleotide overhangs. *J Biol Chem* 2001; 276: 37215-22.
25. Hartung F, Puchta H. Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene* 2001; 271: 81-6.
26. Kee K, Keeney S. Functional interactions between SPO11 and REC102 during initiation of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2002; 160: 111-22.
27. Uetz P, Giot L, Cagney G, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2000; 403: 623-7.
28. Petes TD. Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 360-9.
29. Peciña A, Smith KN, Mezard C, Murakami H, Ohta K, Nicolas A. Targeted stimulation of meiotic recombination. *Cell* 2002; 111: 173-84.
30. Borde V, Goldman AS, Lichten M. Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* 2000; 290: 806-9.
31. Cha RS, Weiner BM, Keeney S, Dekker J, Kleckner N. Progression of meiotic DNA replication is modulated by interchromosomal interaction proteins, negatively by Spo11p and positively by Rec8p. *Genes Dev* 2000; 14: 493-503.
32. Romanienko PJ, Camerini-Otero RD. The mouse *spo11* gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* 2000; 6: 975-87.

TIRÉS À PART

B. de Massy

PCR Quantitative Multicolore en temps réel

Avec le système iCycler iQ™, Bio-Rad vous offre une solution globale.

Conception



Software de dessin de sondes et d'amorces

Réalisation



• iQ™ Supermix/iQ SYBR™ Green Supermix



iCycler
iQ

Analyse



- Gradient de température
- Courbes de fusion
- Discrimination allélique
- Analyse automatique des données

Support



- Hotline
- www.bio-rad.com/icycler:
Forum Aux Questions (FAQ)
Certificats d'analyse des réactifs
Bulletins techniques

The polymerase chain reaction (PCR) process is covered by Hoffmann-La Roche. Use of the iQ process requires a license. iCycler is a trademark of Molecular Probes, Inc.

BIO RAD

Bio-Rad : 3, Boulevard Raymond Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette - Tél : 01 47 95 69 65 - Fax : 01 47 95 61 21