



HAL
open science

Mécanismes impliqués dans la formation des anomalies chromosomiques lors de la meiose en absence de brca2 chez la plante arabidopsis thaliana

Marilyn Dumont

► **To cite this version:**

Marilyn Dumont. Mécanismes impliqués dans la formation des anomalies chromosomiques lors de la meiose en absence de brca2 chez la plante arabidopsis thaliana. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT: 2011PA112086 . tel-00632489

HAL Id: tel-00632489

<https://theses.hal.science/tel-00632489>

Submitted on 14 Oct 2011

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

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



Thèse de Doctorat

Pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université Paris 11, Orsay
Ecole Doctorale : Sciences du Végétal

Présentée par Marilyn Dumont

Mécanismes impliqués dans la formation des anomalies chromosomiques lors de la méiose en absence de Brca2 chez *Arabidopsis thaliana*

Composition du jury :

Mme Valérie Borde	Rapporteur
Mme Marie-Pascale Doutriaux	Directrice de thèse
Mme Ariane Gratias Weill	Co-directrice de thèse
Mme Mathilde Grelon	Examineur
M Thierry Lagrange	Rapporteur
Mme Annie Sainsard	Présidente du jury



Thèse de Doctorat

Pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université Paris 11, Orsay
Ecole Doctorale : Sciences du Végétal

Présentée par Marilyn Dumont

Mécanismes impliqués dans la formation des anomalies chromosomiques lors de la méiose en absence de Brca2 chez *Arabidopsis thaliana*

Composition du jury :

Mme Valérie Borde	Rapporteur
Mme Marie-Pascale Doutriaux	Directrice de thèse
Mme Ariane Gratias Weill	Co-directrice de thèse
Mme Mathilde Grelon	Examineur
M Thierry Lagrange	Rapporteur
Mme Annie Sainsard	Présidente du jury

Remerciements

J'exprime toute ma gratitude à Valérie Borde, Thierry Lagrange, Mathilde Grelon et Annie Sainsard pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie très chaleureusement Marie-Pascale Doutriaux de m'avoir accueilli dans son équipe pendant ma thèse. Et je ne saurais jamais assez remercier ma « maman scientifique » Ariane Gratias Weill. Toutes deux ont su m'encadrer, me transmettre leur savoir et leur goût pour la recherche. Merci à Sophie également d'avoir été ma co-équipière de manip' et bien souvent de galère. Je tiens également à remercier les autres membres de cette chaleureuse équipe, Nicolas, Emeline, et tous les petits stagiaires qui ont rythmés ces années de thèse : Sandie, Guillaume, les pious-pious, Daniels, Nelly ...

Merci à l'ensemble de l'IBP, des personnes formidables et de grande culture scientifique, ces quelques années passées avec vous ont été très enrichissantes.

Merci à tous les thésards avec qui j'ai passé ces quelques années, on s'est épaulé et bien souvent réconforté mais on a aussi bien rigolé.

Enfin, je tiens à remercier mon entourage personnel. A mes parents qui m'ont permis d'avoir pu faire de longues études, à Cédric pour m'avoir soutenu et pour partager ma vie, à ma petite sœur que j'aime de tout mon cœur, à Dodie, Mémé et Pépé, qui n'aura pas vu l'aboutissement de ce travail, à mes copines qui sont un réel soutien dans ma vie, je vous adore, à mon armée de choc de nounous, sans vous, rien n'aurait été possible, à mes p'tits mecs : Kiki et Jeff, et enfin à mon fils, Mylan, merci d'illuminer ma vie.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

ADN-T : ADN de Transfert

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARN interférence

ATP : adénosine triphosphate

At : *Arabidopsis thaliana*

BER : Base Excision Repair

CDB : Cassures doubles brin

CO : Crossing Over

Col0 : Columbia (écotype)

CS : complexe synaptonémal

DSB : cassures simple brin

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindol

dNTP : deoxynucleosides triphosphate

Ec : *Escherichia coli*, *E. coli*

EA : Elément Axial

EC : Elément Central

EL : Elément Latéral

Gy : Gray

Hs : *Homo Sapiens*, humain

MMR : Mismatch Repair

MMS : Methyl méthane sulfonate

NHEJ : Non Homologous End Joining

NER : Nucleotide Excision repair

Pb : paires de bases

PCR : Polymérase Chain Reaction

RH : Recombinaison Homologue

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*

SSA : Single Strand Annealing

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transférase dUTP Nick End Labelling

UV-C : ultra violet C

WT : Wild Type

5-FU : 5-fluorouracile

Convention : *GENE*, Protéine, *mutant*

Avant propos

La molécule d'ADN est le support de l'information génétique et cette information doit rester intègre. Pourtant cette molécule d'ADN subit de nombreuses lésions qui doivent être réparées. Ces lésions peuvent être des cassures simple brin ou des cassures double brin (CDB) de l'ADN qui sont réparées par des mécanismes spécifiques et en majorité conservés à travers les espèces.

Mes recherches font suites aux travaux des thèses d'Eloïse Dray et de Nicolas Siaud. Ils ont montré que chez *Arabidopsis*, en absence de Brca2 dont l'expression génique a été éteint spécifiquement à la méiose par un système ARN interférent (ARNi), les plantes étaient stériles et présentaient des anomalies chromosomiques méiotiques. La formations de ces anomalies sont dépendantes de l'introduction de cassures doubles brin (CDB) de l'ADN en méiose. Ainsi, les CDB ont eu lieu mais leur réparation ne serait pas effectuée par la Recombinaison Homologue (RH) puisque l'un de ces acteurs clé, Brca2, est absent chez ces plantes contenant la construction ARNi. Ainsi mon sujet de thèse porte sur l'étude de l'implication d'autres voies de réparation des CDB de l'ADN. Dans les cellules somatiques, trois voies principales de réparations des CDB sont décrites : le Non Homologous End Joining (NHEJ), le Single Strand Annealing (SSA) et la Recombinaison homologue (RH). L'intervention de l'un ou l'autre de ces trois mécanismes dépend du cycle cellulaire, du tissu cellulaire et des acteurs moléculaires présents. Cependant il existe une collaboration entre ces mécanismes, c'est à dire qu'en l'absence de l'un, un autre prend le relais afin de réparer la CDB et de conserver l'intégrité de l'information génétique. Ainsi, cette collaboration pourrait peut être présente en méiose. En absence de la RH, rendu inactive par l'absence de Brca2, un autre mécanisme de réparation pourrait agir pour réparer les CDB de l'ADN méiotique. J'ai donc étudié l'implication du NHEJ, du SSA et des ADN-Ligase dans la formation des aberrations chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2. Cette étude m'a amener à étudier et caractériser des mutants pour le NHEJ, le SSA, la RH et différentes Ligases.

Les différentes parties de cette introduction vont présenter les sujets intervenant dans la compréhension de mon étude. Ainsi, je vais vous présenter *Arabidopsis thaliana* qui est le modèle utilisé mais également l'ADN, ses lésions et ses différents mécanismes de réparations.

Sommaire

Introduction	1
<u>Chapitre I : L'ADN support de l'information génétique</u>	2
<u>I. La molécule d'ADN</u>	2
I.1. Structure de l'ADN	2
I.2. Localisation de l'ADN	3
I.3. L'ADN associé à des protéines : la chromatine	3
I.4. La chromatine, une structure dynamique	3
I.5. Le chromosome	4
<u>II. Métabolisme de l'ADN</u>	4
II.1. La réplication	4
II.2. La transcription	4
<u>III. Dommages de l'ADN</u>	5
III.1. Les agents alkylants	5
III.2. Les agents pontants	6
III.3. Les rayonnements électromagnétiques ionisants	6
<u>Chapitre II : <i>Arabidopsis thaliana</i></u>	7
<u>I. Présentation</u>	7
<u>II. Cycle de développement</u>	8
<u>III. Cycle de reproduction</u>	8
III.1. Production du gamète mâle	8
III.2. Production du gamète femelle	9
III.3. La double fécondation	10
III.4. La méiose chez <i>Arabidopsis</i> : description cytologique	10
III.4.1. La première division de méiose	11
III.4.1.1. La prophase I	11
III.4.1.2. La segregation des chromosomes homologues	13
III.4.2. La deuxième division de méiose	14

Chapitre III : Les cassures simple brin de l'ADN : les mécanismes de réparation	15
<u>I. Réparation des mésappariement par le système de MisMatch Repair (MMR)</u>	15
I.1. Principe	15
I.2. Mécanisme et acteurs	16
I.2.1. Etape de reconnaissance du mésappariement	16
I.2.2. Etape de recrutement des facteurs	16
I.2.3. Etape de différenciation des brins d'ADN	16
I.2.4. Etape de dégradation et réparation du mésappariement	17
<u>II. Réparation par excision de base : le Base excision repair (BER)</u>	17
II.1. Principe	17
II.2. Mécanismes et acteurs	18
II.2.1. Etape de reconnaissance	18
II.2.2. Etape de réparation : voies du long et short-patch	18
<u>III. Réparation par excision de nucléotide : le NER</u>	19
III.1. Principe	19
III.2. Mécanisme et acteurs	20
III.2.1. Détection de la lésion	20
III.2.2. Etape d'excision	20
III.2.3. Etape de réparation	21
Chapitre IV : Les cassures double brin de l'ADN : introduction, signalisation et réparation	22
<u>I. Initiation des CDB de l'ADN</u>	22
I.1. Les CDB accidentelles	22
I.2. Les CDB programmées	22
I.2.1. Lors de la formation des immunoglobulines	22
I.2.2. Lors de la méiose	23
<u>II. Signalisation et maturation, si nécessaire, de la CDB</u>	24
<u>III. Le Non Homologous End Joinning : NHEJ</u>	25

III.1. Principe	25
III.2. Etapes moléculaires et acteurs du NHEJ classique (D-NHEJ)	26
III.2.1. Etape de reconnaissance et de maintien	26
III.2.2. Etape de maturation	27
III.2.3. Etape finale de ligation	27
III.3. NHEJ alternatif ou B-NHEJ	28
III.4. Le NHEJ dans le système immunitaire chez les vertébrés	29
III.5. Rôle de certains acteurs du NHEJ au niveau des télomères	29
III.6. Rôle de l'un des acteurs du NHEJ dans la signalisation des CDB	30
III.7. Etude des mutants du NHEJ	31
<u>IV. Single Strand Annealing : SSA</u>	32
IV.1. Principe	32
IV.2. Mécanisme et acteurs	32
IV.3. Etude des mutants du SSA	32
<u>V. Recombinaison homologue</u>	33
V.1. Principe	33
V.2. Etapes moléculaire et acteurs	33
V.2.1. Reconnaissance et maturation de la cassure	33
V.2.2. Formation du nucléofilament	33
V.2.2.1. Mécanisme	33
V.2.2.2. Les acteurs moléculaires	33
V.2.2.2.1. Les recombinases Rad51 et Dmc1, homologues de RecA	34
V.2.2.2.2. Les médiateurs de Rad51	36
V.2.2.2.3. Les médiateurs de Dmc1 en méiose	39
V.2.3. Réparation et résolution des jonctions de Holliday	39
V.3. Brca2	40
V.3.1. Acteur de la RH	40
V.3.1.2. Brca2 : conservée chez la plupart des espèces	42
V.3.1.3. Interactions et structure de Brca2	42
V.3.1.4. Rôle de Brca2 autre que dans la RH	45

IV.4. Compétition et collaboration entre les différentes voies de réparation des CDB de l'ADN	47
Chapitre V : Les ADN-ligases	49
<u>I. Présentation</u>	49
<u>II. La Ligase I</u>	50
<u>III. La Ligase III</u>	51
<u>IV. La Ligase IV</u>	52
<u>V. La Ligase 6</u>	52
Chapitre VI : Contexte de la thèse	54
Résultats	56
Chapitre I : Le SSA et le NHEJ ne sont pas impliqués dans la formation des aberrations chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2	57
<u>I. Résumé de l'Article</u>	57
<u>II. Article : « Characterization of Brca2-Deficient Plants Excludes the Role of NHEJ and SSA in The Meiotic Chromosomal Defect Phenotype »</u>	60
<u>III. La technique TUNEL</u>	61
Chapitre II : Etude des ADN-Ligases : la Ligase I, Ligase Ia (ou la Ligase I-like) et la Ligase 6	62
<u>I. Etude de la Ligase I</u>	63
I.1. Analyse de l'expression génique de la Ligase I en contexte sauvage et hétérozygote	63
I.2. Etude de la ségrégation chez l'hétérozygote <i>LIGASE I</i> ^{+/-}	64
I.3. Inactivation de la Ligase I en méiose chez le double mutant <i>brca2</i>	65
<u>II. Etude de la Ligase Ia (Ligase I-like)</u>	66
II.1. Expression du gène <i>LIGASE I-like</i>	67
II.2. Obtention du mutant <i>ligase I-like</i>	67
II.3. Test de sensibilité à des stress génotoxiques du mutant « <i>ligase I-like</i> »	67
II.4. Inactivation de Brca2 chez le « mutant <i>ligase I-like</i> »	68
<u>III. Etude de la méiose chez les doubles mutants <i>ligase6 mnd1</i> et <i>lig6 rad51</i></u>	68

Chapitre III : Etude des gènes <i>XRCC4</i> et <i>XRCC4-like</i>, nouveaux acteurs du NHEJ ?	70
<u>I. Isolation des mutants <i>xrcc4</i> et <i>xrcc4-like</i></u>	70
<u>II. Sensibilité des mutants <i>xrcc4</i> et <i>xrcc4-like</i> à différents stress génotoxiques</u>	71
<u>III. Déroulement de la méiose chez les mutant <i>xrcc4</i> et <i>xrcc4-like</i> inactivé pour <i>Brca2</i></u>	72
<u>IV. Interaction entre la Ligase IV, <i>Xrcc4</i> et <i>Xrcc4-like</i></u>	73
Chapitre IV : Sensibilité au MMS d'un mutant de la RH : <i>rad51</i>	75
Discussion et perspectives	77
<u>I. Le double mutant <i>brca2a brca2b</i> chez <i>Arabidopsis</i></u>	78
I.1. Etude du phénotype méiotique du double mutant <i>brca2a brca2b</i>	78
I.2. Etude du phénotype somatique du double mutant <i>brca2a brca2b</i>	79
I.3. Descendants du double mutant <i>brca2a brca2b</i> !	80
<u>II. Le NHEJ et le SSA n'interviennent pas en méiose dans les aberrations chromosomiques causées par l'absence de <i>Brca2</i></u>	81
<u>III. Intervention des Ligases dans les anomalies chromosomiques en méiose</u>	82
III.1. Intervention de la Ligase I ?	82
III.2. Redondance des Ligases	83
<u>IV. Le rôle de la Ligase 6</u>	84
<u>V. Rôle des cohésines, des acteurs du complexe synaptonémal dans les anomalies méiotiques observées en absence de <i>Brca2</i> ?</u>	85
Conclusion	88
Matériels et Méthodes	89
Bibliographie	103
Annexes	124

Introduction

Chapitre I : L'ADN support de l'information génétique

I. La molécule d'ADN

I.1. Structure de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule porteuse de l'information génétique de la cellule. La caractérisation et la découverte de la structure chimique de l'ADN se sont faites en plusieurs étapes à partir de la fin du XIX^{ème} siècle et c'est en 1953 que la structure de l'ADN a été décrite par Watson et Crick. Cette molécule universelle contient, sous forme d'un code appelé code génétique, toutes les informations nécessaires à la vie et les caractéristiques de chaque individu.

L'ADN est un polymère composé de deux chaînes nucléotidiques, nommées brins, qui s'assemblent pour former une double hélice (Figure 1). Un brin d'ADN est un enchaînement de nucléotides reliés entre eux par des liaisons 3'-5' phosphodiester. Chaque nucléotide est constitué d'une base azotée liée par une liaison N-glycosidique à un sucre, le 2-désoxyribose, cette association forme le nucléoside, qui est lui-même lié à un groupe phosphate. L'ADN comprend quatre bases azotées différentes: l'adénine (A), la guanine (G) appelées bases puriques et la thymine (T), la cytosine (C) appelées bases pyrimidiques (Figure 2). L'association des différents nucléotides permet la constitution d'un brin orienté 5'-3'. Le brin ainsi formé adopte une structure hélicoïdale qui s'associe de façon complémentaire à un deuxième brin d'ADN antiparallèle. Cette association se fait par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes entre bases complémentaires assurant la stabilité de la double hélice. Les paires de nucléotides complémentaires sont respectivement G-C, reliées par trois liaisons hydrogène et A-T, reliées par deux liaisons hydrogène.

Dans la molécule d'ADN le pourcentage en GC peut varier d'une région à l'autre et d'une espèce à l'autre. Ainsi un taux élevé de pourcentage en GC est retrouvé dans les régions codantes et au niveau des télomères, extrémités des chromosomes.

La molécule d'ADN

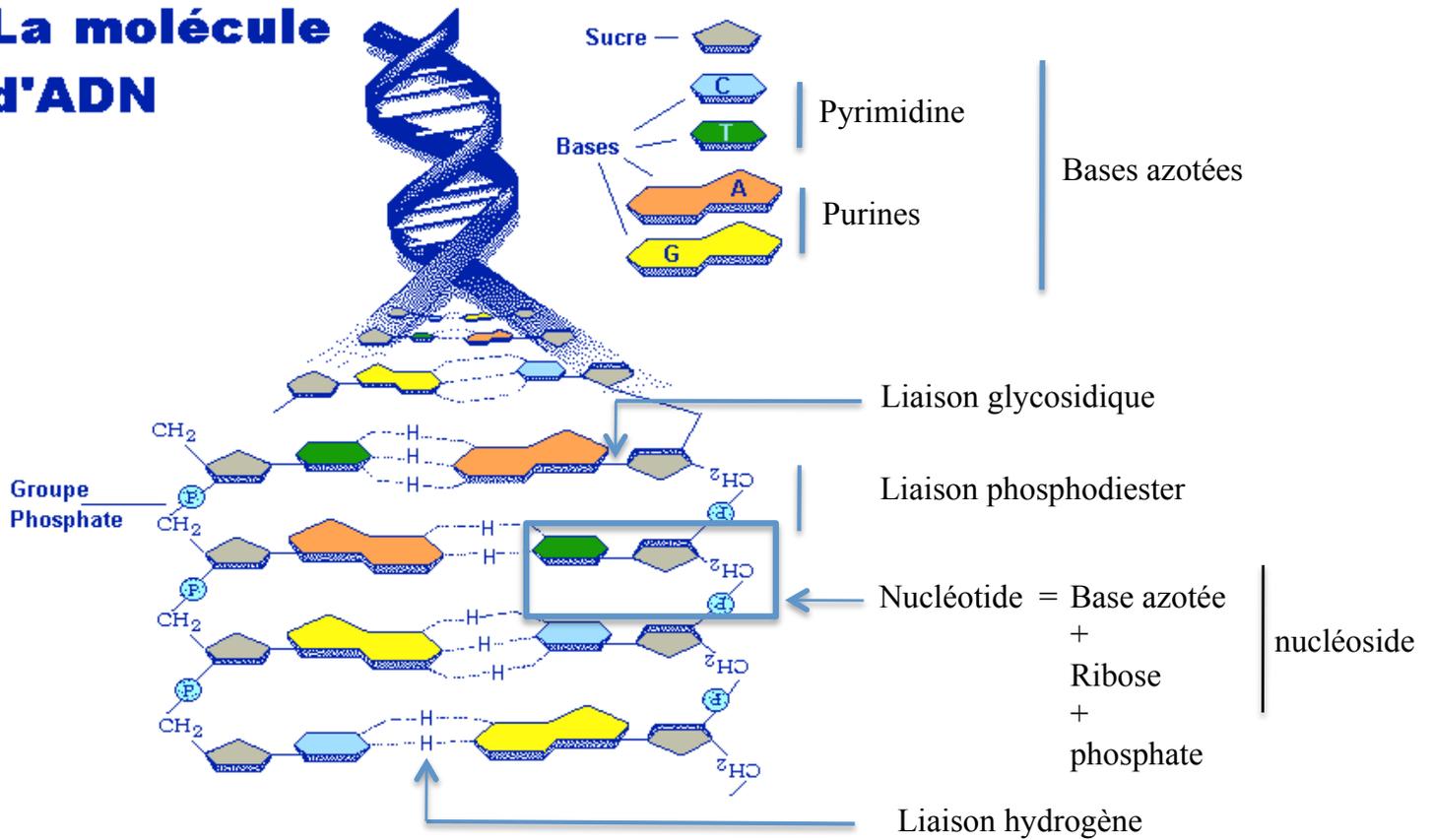


Figure 1 : Structure de l'ADN

L'ADN est composé de deux brins qui sont un enchainement de nucléotides, reliés par une liaison phosphodiester. Un nucléotide est formé par l'association entre une base azotée, un 2-désoxyribose et un phosphate. Les deux brins sont appariés par des liaisons hydrogènes formées entre les bases de façon spécifique, l'adénine (A) est apparié à la thymine (T) et la guanine (G), à la cytosine (C). La liaison entre le désoxyribose et la base est appelée liaison glycosidique.

(d'après www.futura-sciences.com)

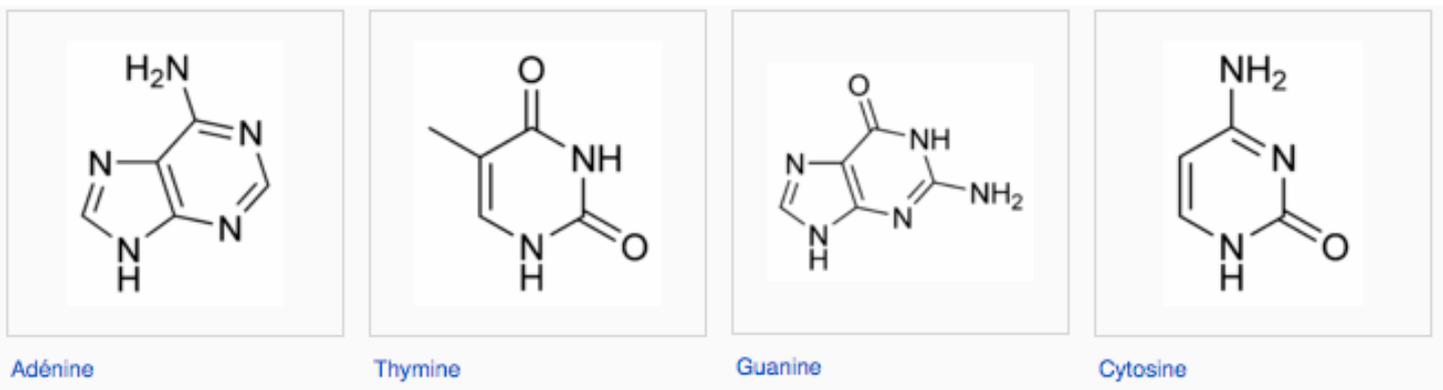


Figure 2 : Les bases azotées de l'ADN

Les purines : Adénine et Guanine sont des molécules azotées hétérocycliques consistant en un cycle pyrimidine fusionné à un cycle imidazole.

Les pyrimidines, Thymine et Cytosine sont des molécules azotées hétérocycliques aromatiques.

(d'après Raven, Johnson, Losos, Singer. de boeck, Biologie)

I.2. Localisation de l'ADN

Chez les procaryotes, l'ADN est localisé dans le cytoplasme et est en général présent sous la forme d'un seul chromosome circulaire super-enroulé. Chez les eucaryotes, l'ADN est présent dans le noyau cellulaire sous forme linéaire scindé en plusieurs chromosomes. De l'ADN est également retrouvé dans les organites donc dans les mitochondries, sous forme circulaire et chez les végétaux dans les chloroplastes, sous forme linéaire ou ramifiée.

I.3. L'ADN associé à des protéines : la chromatine

La molécule d'ADN est de grande taille et doit être compactée. L'ADN nucléaire humain, par exemple, déroulé représenterait une double hélice de 1,8 m. Cette double hélice doit être condensée d'environ 1000 fois dans le chromosome métaphasique. L'ADN nucléaire est associé à des protéines, les histones. Les histones H2A, H2B, H3 et H4 forment un octamère qui permet l'enroulement de l'ADN formant ainsi un nucléosome. L'histone H1 permet la compaction des nucléosomes et rigidifie la structure hélicoïdale ainsi obtenue. Cette association constitue une fibre de chromatine de 30 nm de diamètre. Cette structure est présente quelle que soit la phase du cycle cellulaire. Toutefois lorsque la cellule se divise, la chromatine se condense pour former une nouvelle structure, le chromosome. L'ADN est donc une structure dynamique.

I.4. La chromatine, une structure dynamique

Cette structure en nucléosome permet une condensation variable de l'ADN le long des chromosomes, dans la chromatine. Dans l'euchromatine, l'ADN est décondensé permettant l'accès à la machinerie des ARN polymérases. En revanche, l'ADN est fortement condensé dans l'hétérochromatine, région souvent non transcrite. Le degré de condensation des nucléosomes est régulé par des modifications des extrémités N-terminales des histones, comme des phosphorylations, acétylations, méthylation, ubiquitination, sumoylation.

I.5. Le chromosome

Le chromosome est la forme la plus compactée de l'ADN. Il est formé, après la réplication, lors des divisions cellulaires somatiques, la mitose, et méiotique, la méiose. Le chromosome est composé de deux chromatides dont la région de contact est nommé le centromère. C'est par le centromère qu'est dirigée la ségrégation équitable des chromatides sœurs entre les deux cellules filles lors de la division cellulaire.

II. Métabolisme de l'ADN

Le métabolisme de l'ADN regroupe les différents processus auxquels l'ADN est soumis durant la vie cellulaire.

II.1. La réplication

Lors de la mitose, division cellulaire somatique, la molécule d'ADN est préalablement dupliquée au cours de la réplication, afin d'obtenir deux molécules identiques transmises aux deux cellules filles. La réplication de l'ADN est effectuée par un complexe enzymatique (ADN polymérase) qui permet l'ouverture de la double hélice et la copie des deux brins. La réplication est dite semi-conservative, puisque dans chaque molécule d'ADN, un brin provient de la molécule mère et l'autre brin a été nouvellement synthétisé. La transmission de l'information génétique des cellules de génération en génération repose donc sur la stabilité de l'ADN. Lors de la méiose, qui permet l'obtention des gamètes haploïdes, il y a une seule phase de réplication de la molécule d'ADN, qui précède deux divisions cellulaires successives.

II.2. La transcription

Une autre étape importante dans le métabolisme de l'ADN est la transcription qui permet l'expression génique. Les régions dites codantes sont transcrites par des ARN polymérases permettant d'obtenir de l'ARN à partir d'une molécule d'ADN. Les ARN polymérases agissent en partenariat avec des facteurs de transcription. Les protéines sont ensuite synthétisées par la traduction à partir des ARN.

Ces différentes activités du métabolisme de l'ADN sont essentielles à la cellule et l'ADN doit donc en permanence porter une information intègre. Ainsi, si des erreurs ou des lésions s'introduisent dans l'ADN, elles doivent être réparées pour la survie de la cellule et le maintien de l'information génique.

III. Dommages de l'ADN

La molécule d'ADN est la cible de différentes attaques endogènes ou exogènes provoquant directement ou indirectement des cassures de l'ADN. Les principaux dommages endogènes engendrés à l'ADN résultent de la réplication. En effet des erreurs de réplication peuvent entraîner des cassures simple ou double brin que la cellule doit réparer pour une reprise de la synthèse de la molécule d'ADN. La molécule d'ADN peut également être endommagée par des espèces réactives endogènes de l'oxygène, les ROS, résultant de mécanismes physiologiques comme la respiration ou la photosynthèse. De nombreuses sources exogènes peuvent également engendrer des dommages de l'ADN, ainsi l'exposition à des radiations (ultraviolet, rayonnement gamma...), ou à des agents chimiques (méthyl méthane sulfonate, cisplatine,...) entraîne des lésions de la molécule d'ADN.

III.1. Les agents alkylants

Les agents alkylants ajoutent des groupements alkyles au niveau des groupes électro-négatifs des bases de l'ADN, c'est le cas notamment du méthyl méthane sulfonate (MMS). Le MMS est un agent alkylant qui ajoute des groupements méthyles, radical alkyle, modifiant ainsi la guanine en 7-méthylguanine et l'adénine en 3-méthyladénine (Lundin et al., 2005 ; Wyatt and Pittman, 2006). Ces modifications, entraînant des mésappariements et donc le blocage de la réplication, doivent être réparées. La prise en charge de ces bases modifiées, pour être remplacées par les bases adéquates, entraînent des cassures de l'ADN qui sont réparées par différents mécanismes. Nous entrerons dans le détail de ces mécanismes de réparation de l'ADN dans les chapitres III et IV.

Certains agents alkylants sont utilisés dans certains traitements contre le cancer puisqu'ils peuvent, par le blocage de la réplication, arrêter la croissance des tumeurs.

III.2. Les agents pontants

La mitomycine C et le cisplatine sont des agents pontants : ils créent des ponts intramoléculaires entre les deux brins de l'ADN bloquant ainsi l'avancée de la fourche de réplication.

III.3. Les rayonnements électromagnétiques ionisants

Le rayonnement ultraviolet (UV) est un rayonnement électromagnétique d'une longueur d'onde intermédiaire entre celle de la lumière visible et celle des rayons X. Les UV se décomposent en trois types distincts en fonction de leur position et longueur d'onde sur le spectre électromagnétique : les UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) et UV-C (280-100 nm). Les UV-A et B émis par le soleil atteignent la terre et la surface de la peau chez l'homme et sont responsables du bronzage et des « coups de soleil ». Les UV-C, les plus proches des rayons X, sont les plus nocifs. Ils n'atteignent pas la surface de la terre puisqu'ils sont complètement filtrés par la couche d'ozone. En laboratoire, des lampes à UV-C sont utilisées afin de stériliser des pièces ou des appareils (hotte à flux laminaire, par exemple). Les UV-B et UV-C altèrent l'ADN des cellules en créant des dimères de thymidine, en effet l'énergie apportée par les photons provoque la formation d'une liaison covalente entre deux thymidines successives. La présence de ces dimères perturbe le fonctionnement cellulaire, en bloquant la réplication et la transcription, et pour sa survie, la cellule doit les réparer. Les nucléotides endommagés, les dimères de thymidine, sont alors excisés par un mécanisme de réparation simple brin de l'ADN.

Les irradiations gamma engendrent deux types de lésions, l'oxydation de bases et la formation de sites abasiques. La fréquence de ces lésions et leur proximité peuvent aboutir à des cassures double brin de l'ADN qui doivent être prises en charge par les mécanismes adéquats. La bléomycine imite l'effet des rayons gamma, elle est qualifiée de gamma mimétique.

L'ADN est donc le support de l'information génétique chez toutes les espèces vivantes dont *Arabidopsis thaliana* qui est la plante modèle en biologie végétale et que nous utilisons au laboratoire.

Chapitre II : *Arabidopsis thaliana*

I. Présentation

Arabidopsis thaliana (*Arabidopsis* ou *At*) est aussi appelée dans le langage courant l'Arabette des dames. C'est une plante annuelle qui appartient à la famille des Brassicaceae, dont de très nombreuses espèces voisines sont cultivées (chou, colza, moutarde, girofle, radis,...).

Arabidopsis est de petite taille (environ 20-30 centimètres) et présente un cycle de vie court (six à huit semaines de graines à graines). Elle est photosynthétique donc ne requiert que peu de nutriments pour sa croissance (air, eau, lumière, minéraux). Elle est donc très facilement cultivable et étudiable en laboratoire. *Arabidopsis* est monoïque, c'est à dire que les deux sexes sont sur la même plante, et autogame puisque la reproduction se fait par autofécondation. Il est cependant possible de croiser deux plantes ensemble.

Arabidopsis a un petit génome, d'environ 120 millions de paires de bases, entièrement séquencé depuis 2000 par « The Arabidopsis Genome Initiative » (2000). La taille de son génome est comparable à ceux de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) et est trente fois plus petit que celui de l'Homme ou du maïs. Le génome d'*Arabidopsis* contient approximativement 25500 gènes, répartis sur cinq paires de chromosomes. On retrouve le même nombre de gènes approximativement chez *Arabidopsis* que dans le génome humain. Le génome d'*Arabidopsis* est diploïde, cependant il passe par une phase haploïde lors de la gamétogenèse, comme chez tous les eucaryotes.

Pour générer des mutants, le ciblage génique est utilisé chez la souris, par exemple, et permet de déléter spécifiquement un gène. Chez *Arabidopsis* le ciblage génique est inefficace mais, il existe différentes collections de mutants. Ces mutants sont générés par transformation, qui s'effectue grâce à une bactérie pathogène des plantes, *Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie a la capacité de transférer un fragment d'ADN nommé ADN-T, pour ADN de transfert, dans la cellule végétale. Cet ADN-T va ensuite s'intégrer au hasard et de façon stable dans le génome des cellules somatiques et germinales. Ainsi aux générations suivantes,

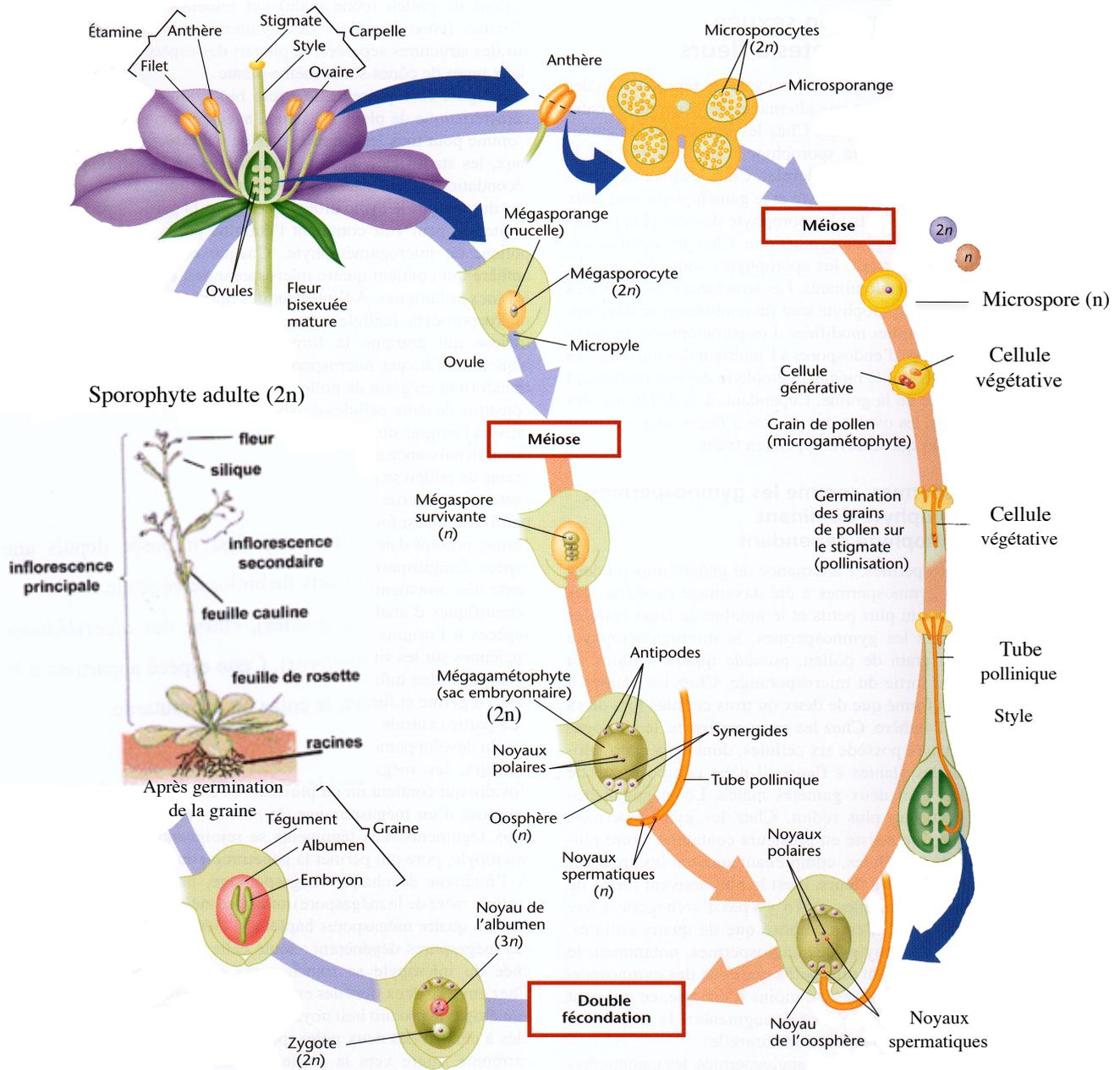


Figure 3 : Cycle de développement et de reproduction de la plante *Arabidopsis*

La hampe centrale porte les inflorescences. Après auto-fécondation, les siliques, gousses qui contiennent les graines, se développent. La fleur est bisexuée, les gamétophytes mâle et femelle sont donc sur la même fleur.

Production du gamète mâle : dans les anthères, les microsporangies contiennent des microsporocytes qui donnent, après la méiose quatre microspores haploïdes. Après une mitose, les microspores se transforment en grain de pollen, le microgamétophyte, constitué de la cellule végétative et la cellule générative. Après libération du grain de pollen, celui-ci se dépose sur le stigmate réceptif d'une fleur, il germe et forme un tube pollinique qui va progresser jusqu'aux ovules.

Production du gamète femelle : Dans le carpelle de la plante à fleur, l'ovaire contient plusieurs ovules, composés d'un mégasporange (appelé également le nucelle) entouré par un ou deux téguments. Les téguments se rejoignent au niveau du micropyle qui est le pore par lequel le tube pollinique pénètre. Chaque mégasporange contient un mégasporocyte, cellule mère diploïde de la mégaspore, qui après la méiose et donne naissance à quatre mégaspores haploïdes. Trois dégèrent, la quatrième se transforme en mégagamétophyte qui produit, par mitose, huit noyaux haploïdes. Quatre noyaux sont rassemblés à chacun des deux pôles, puis un des noyaux de chaque extrémité migre vers la partie centrale. Il s'agit des deux noyaux polaires. Les trois noyaux situés à l'extrémité près du micropyle se composent de l'oosphère, encadrée par les deux synergides. Les trois cellules de l'extrémité opposée, les antipodes, peuvent disparaître ou jouer un rôle nutritif. Le mégagamétophyte mature, composé de sept cellules et huit noyaux, est également appelé sac embryonnaire, car c'est là que se développera l'embryon après la fécondation.

La double fécondation : Après le contact du grain de pollen avec le stigmate, la cellule végétative forme le tube pollinique qui croît et s'insinue dans le tissu carpellaire, pénètre par le micropyle dans le sac embryonnaire. Les deux gamètes mâles sont déversés dans le sac embryonnaire puis a lieu la double fécondation. Un des deux noyaux spermatiques fusionne avec l'oosphère pour donner le zygote diploïde. Le second s'unit aux deux noyaux polaires au centre du sac embryonnaire pour former un noyau triploïde, nommé noyau de l'albumen, tissu chargé de réserves dont l'embryon se nourrira au cours de son développement.

(D'après Raven, Evert, Eichhorn. de boeck, 2^{ème} édition, Biologie Végétale)

la présence d'un ADN-T dans un gène crée, le plus souvent, l'extinction de son expression à l'état homozygote. La séquence de l'ADN-T est connue permettant ainsi l'identification de son site d'insertion et donc l'identification du gène dans lequel il s'est inséré.

Toutes ces raisons citées font d'*Arabidopsis* la « plante modèle » privilégiée des généticiens.

II. Cycle de développement

Arabidopsis est une dicotylédone, après apparition des deux cotylédons lors de la germination, les feuilles se développent et forment une rosette. A un certain stade de développement, lorsque les conditions environnementales sont favorables, *Arabidopsis* « monte » à fleur. La hampe centrale se développe, elle porte les inflorescences. Après auto-fécondation, les siliques (fruits des légumineuses), ressemblant à des gousses, contenant les graines, se développent (Figure 3).

Puis à l'étape la plante sèche et les graines sont libérées. Le cycle de vie d'*Arabidopsis* dure de six à huit semaines et alterne entre une phase diploïde majoritaire (sporophyte) et une phase haploïde très courte (gamétophyte).

III. Cycle de reproduction

Chez les Angiospermes, comme *Arabidopsis*, la fleur est bisexuée, les gamétophytes mâle et femelle sont donc non seulement sur la même plante, mais aussi sur la même structure florale. Les fleurs bisexuées possèdent des étamines, organes mâles qui produisent les microgamétophytes et un carpelle, organe femelle qui produit les mégagamétophytes (Figure 3)

III.1. Production du gamète mâle

A l'intérieur des anthères, les microsporangies contiennent des microsporocytes, cellule mère diploïde de la microspore (Figure 3). Chaque microsporocyte subit une méiose (le déroulement de la méiose sera détaillé plus tard, dans le paragraphe III.4.) qui entraîne la formation de quatre microspores haploïdes. Chaque microspore se divise par mitose et est

ensuite constitué de deux cellules d'aspect différent : la cellule végétative qui générera le tube pollinique et la cellule générative qui subit à son tour une seconde mitose donnant naissance à deux cellules spermatiques. Ainsi le grain de pollen est formé et nommé microgamétophyte. La maturation des grains de pollen se poursuit avec la mise en place d'une paroi protectrice externe et d'une paroi interne. Pour chaque espèce d'angiosperme, la paroi externe du grain de pollen présente une ornementation spécifique. Puis le grain de pollen mûr est libéré lors de la déhiscence de l'anthere. Il se dépose ensuite sur le stigmate réceptif d'une fleur, il germe et forme un tube pollinique qui va parcourir le style jusqu'aux ovules et dans lequel migreront les noyaux spermatiques.

III.2. Production du gamète femelle

Dans le carpelle de la plante à fleur, l'ovaire contient plusieurs ovules. Chaque ovule se compose d'un mégasporange, appelé également le nucelle, entouré par un ou deux téguments. Les téguments se rejoignent au niveau du micropyle, pore par lequel le tube pollinique pénètre. A l'intérieur de chaque mégasporange, un mégasporocyte, cellule mère diploïde de la mégaspore, subit une méiose et donne naissance à quatre mégaspores haploïdes. Trois de ces mégaspores dégénèrent, seule celle qui est la plus éloignée du micropyle se transforme en mégagamétophyte. Le mégagamétophyte produit huit noyaux haploïdes après trois mitoses successives. Quatre noyaux sont rassemblés à chacun des deux pôles, puis un des noyaux de chaque extrémité migre vers la partie centrale. Il s'agit des deux noyaux polaires. Des cellules s'individualisent autour des trois noyaux restant à chaque extrémité, tandis qu'une grande cellule centrale contient les deux noyaux polaires. Les trois noyaux situés à l'extrémité près du micropyle se composent de l'oosphère, encadrée par les deux synergides, cellules voisines plus petites, qui auront une fonction bien précise lors de la fécondation. Les trois cellules de l'extrémité opposée, les antipodes, peuvent disparaître ou jouer un rôle nutritif. Le mégagamétophyte mature, composé de sept cellules et huit noyaux, est également appelé sac embryonnaire, car c'est là que se développera l'embryon après la fécondation. Le stigmate, organe récepteur au sommet du carpelle d'une fleur typique, est alors apte à recevoir le pollen provenant d'une même espèce ou parfois, d'une variété de la même espèce.

III.3. La double fécondation

Après le contact du grain de pollen avec le stigmate, la cellule végétative s'allonge pour former le tube pollinique qui croît pendant une période allant de quelques heures à quelques jours. Le tube pollinique s'insinue dans le tissu carpellaire, pénètre par le micropyle dans le sac embryonnaire. Le tube pollinique peut éviter ou traverser les synergides qui facilitent la décharge pollinique. Les deux gamètes mâles non flagellés sont déversés dans le sac embryonnaire après gélification de l'extrémité du tube pollinique. Puis le phénomène typique de la double fécondation a lieu. Un des deux noyaux spermatiques s'unit à l'oosphère pour donner le zygote diploïde qui entre rapidement en division, commençant ainsi l'édification de l'embryon. Le second s'unit aux deux noyaux polaires au centre du sac embryonnaire pour former un noyau triploïde, nommé noyau de l'albumen qui rentrera à son tour en division. Ce noyau est à l'origine de l'albumen, tissu chargé de réserves dont l'embryon se nourrit au cours de son développement. Ce tissu est digéré et absorbé par l'embryon pendant son développement à l'intérieur du sac embryonnaire. Le phénomène de double fécondation qui produit à la fois l'embryon et l'albumen est caractéristique des angiospermes.

III.4. La méiose chez *Arabidopsis* : description cytologique

La méiose est une étape essentielle pour tous les organismes à reproduction sexuée. Par ce processus, sont formés les gamètes mâles et femelles desquels résultera après fécondation, un nouvel individu diploïde. La méiose comporte plusieurs étapes. Lors de la première division de méiose, dite réductionnelle, les chromosomes se condensent et se regroupent par paires d'homologues formant ainsi cinq bivalents, chez *Arabidopsis*, qui s'alignent et ségrègent vers les pôles opposés de la cellule. Lors de la deuxième division méiotique, dite équationnelle, les chromosomes s'alignent puis les chromatides sœurs se séparent. Ces deux divisions chromosomiques successives se produisent après une seule étape de réplication de l'ADN. Ainsi la cellule mère diploïde donnera quatre cellules filles haploïdes contenant chacune un lot de cinq chromosomes (Figure 4). Le niveau de ploïdie sera ensuite restauré lors de la fécondation, par la fusion de deux gamètes de sexe opposé.

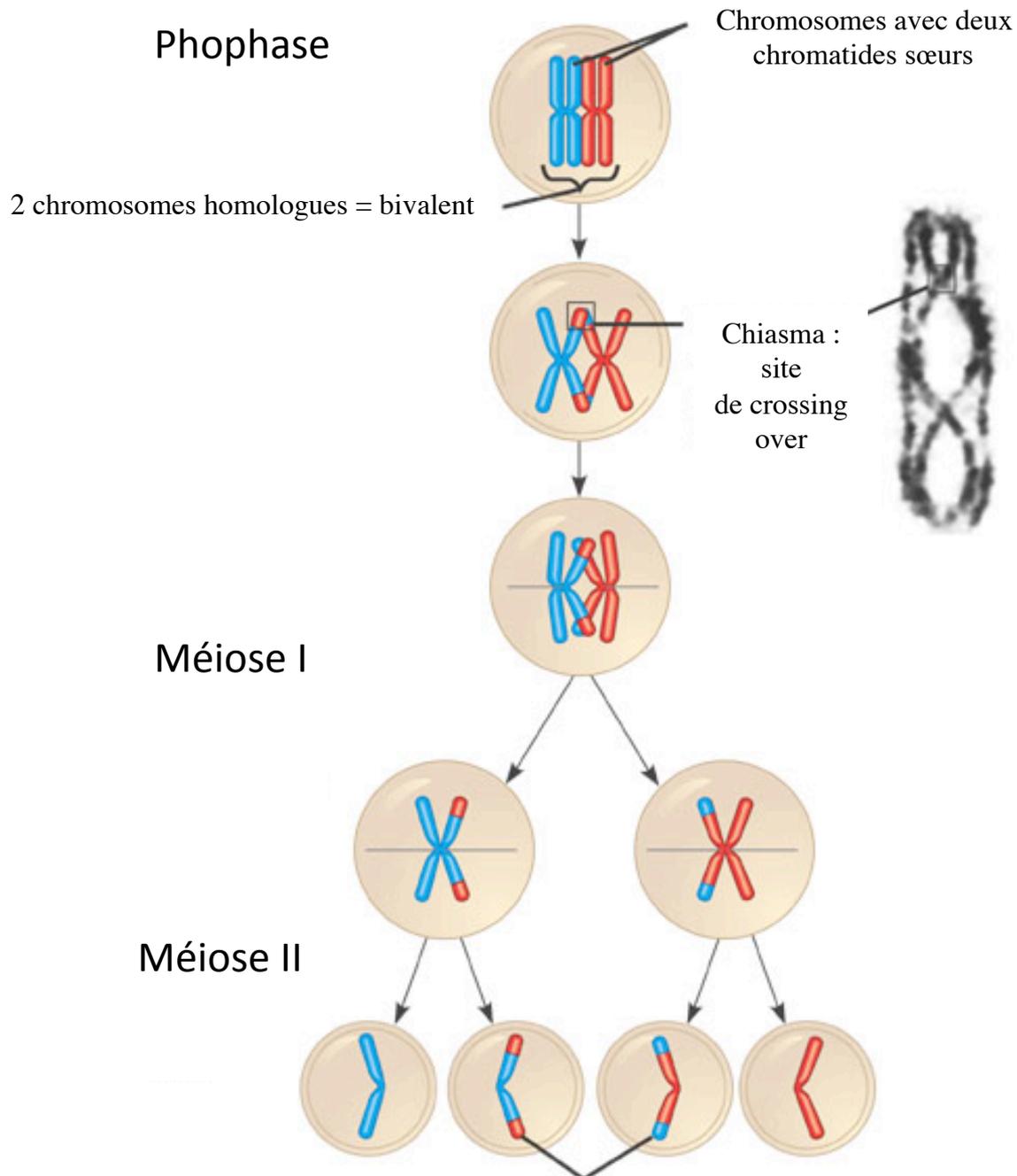


Figure 4 : La méiose

En Prophase I de méiose les chromosomes comportant deux chromatides sœurs s'associent en bivalent. En première division de méiose dit réductionnelle, il y a ségrégation des chromosomes homologues. Cette migration aux pôles peut se réaliser grâce au relarguage de la cohésion existant entre les bras des chromatides sœurs. En seconde division de méiose, dite cette fois équationnelle, les chromatides sœurs se séparent une fois la cohésion centromérique relarguée. La méiose permet l'obtention de quatre cellules haploïdes.

Chez l'homme, un défaut dans la ségrégation des chromosomes entraîne la létalité ou certaines pathologies, comme les trisomies par exemple. Chez *Arabidopsis*, un mauvais déroulement de la méiose entraîne la stérilité, totale ou partielle, de la plante. Il est donc impératif pour la survie et le maintien de l'information génétique, que la méiose se déroule de façon correcte.

III.4.1. La première division de méiose

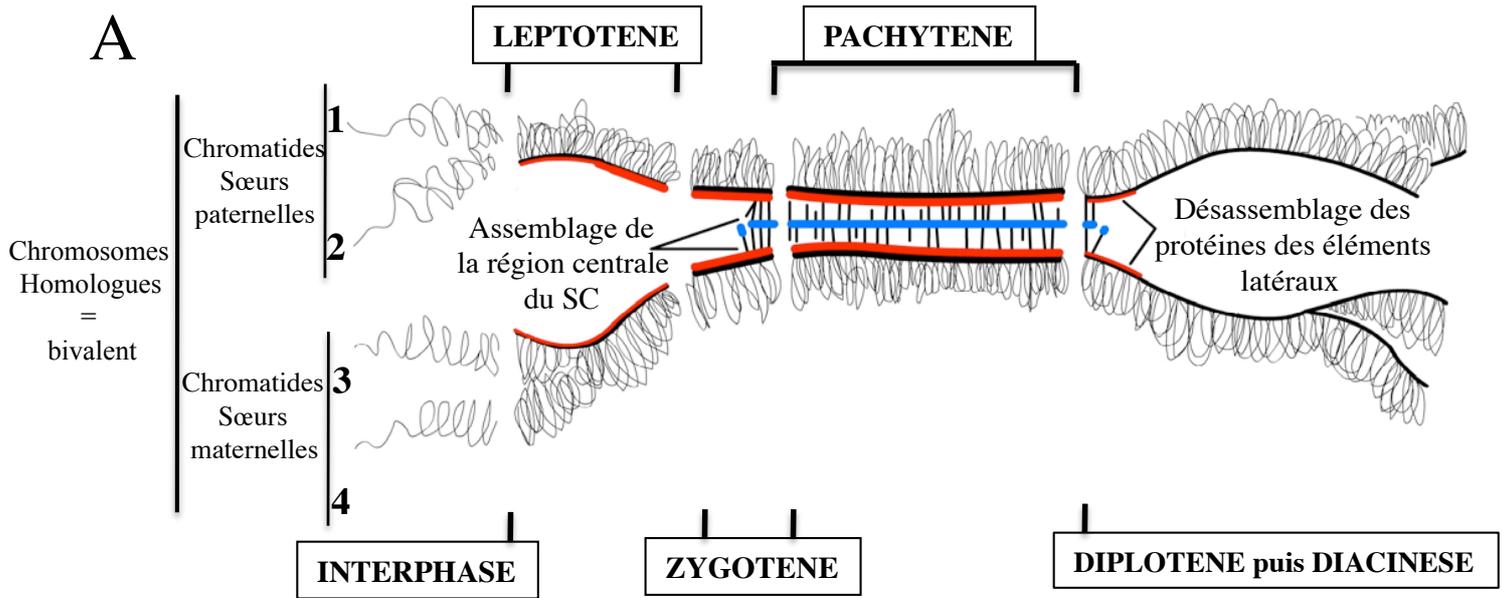
III.4.1.1. La prophase I

La première étape de la méiose, la prophase I, est la phase la plus longue et la plus complexe. Sa durée varie d'une espèce à l'autre, par exemple elle dure 10 jours chez la souris et 33h chez *Arabidopsis* (Cohen et al., 2006).

En prophase I, les chromosomes se condensent et s'assemblent en bivalents, au nombre de cinq chez *Arabidopsis*. La prophase I se divise en cinq stades nommés chronologiquement leptotène, zygotène, pachytène, diplotène et diacinèse (Figure 5 A) (Zickler and Kleckner, 1999 ; Horlow and Doutriaux, 2003).

Le stade leptotène

En leptotène, les chromosomes commencent à se condenser. Les chromosomes sont individualisés sous forme de longs fils minces entremêlés. Chaque paire de chromatides sœurs développe une structure linéaire composée d'une rangée de boucles d'ADN connectées à leur base par une structure axiale à laquelle s'ajoute une structure protéique appelée élément axial (Moens and Pearlman, 1988). Chez *Arabidopsis*, la protéine Asy1 (Hop1 chez *S. cerevisiae*) est connue pour composer cet élément axial (Hollingsworth et al., 1990; Caryl et al., 2000). L'élément axial est le précurseur du futur complexe synaptonémal, qui se polymérise. Les cohésines, associées aux éléments axiaux, agissent ensemble pour permettre la cohésion des chromatides sœurs entre elles (Klein et al., 1999). Ainsi le mutant d'*Arabidopsis rec8*, une des cohésines méiotiques, est incapable de former l'élément axial (Chelysheva et al., 2005). A ce stade, des cassures doubles brins (CDB) de l'ADN sont réalisées de façon programmée par la protéine Spo11 et seront réparées lors des stades ultérieurs (la formation des CDB ainsi que leur réparation seront étudiées dans la suite de ce manuscrit).



B

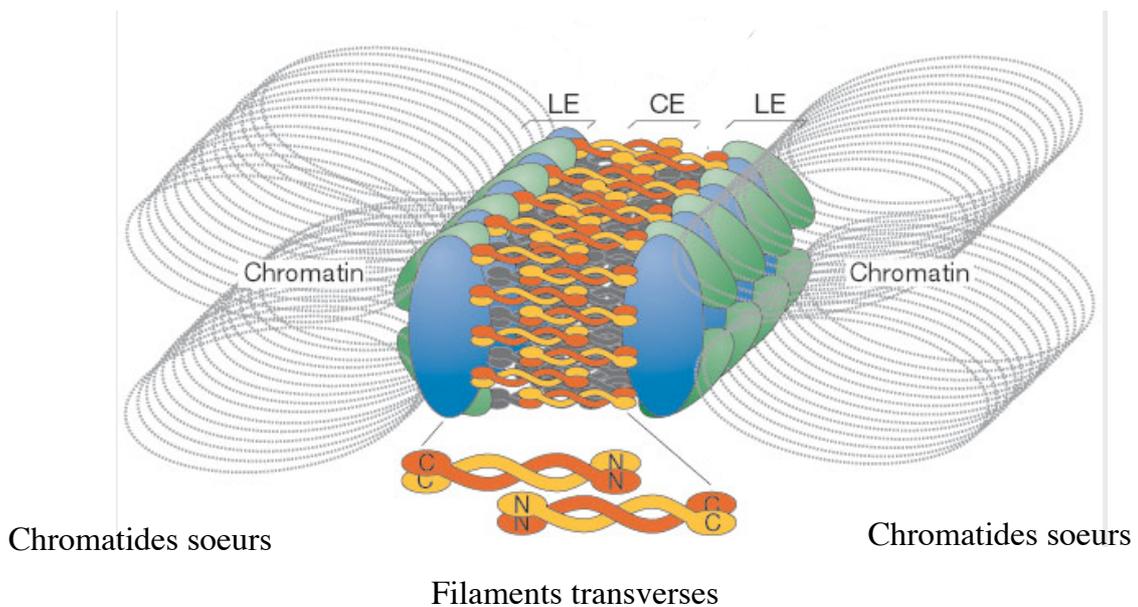


Figure 5 : Le complexe synaptonémal

A- Progression du complexe synaptonémal au cours de la Prophase I

Ce schéma illustre l'assemblage et le désassemblage du complexe synaptonémal (CS) lors de la prophase I. Les éléments axiaux sont représentés en rouge qui deviennent les éléments latéraux du CS au stade pachytène. L'élément central (CE) du CS est représenté en bleu.

(d'après Molecular Biology of the Cell, 4eme edition.)

B- Le complexe synaptonémal (SC) est une structure protéique formée d'un élément latéral (LE) et d'un élément central (CE). Les LE sont composés de cohésines et de protéine structurales composant les axes (en bleu et vert). Le CE est composé des protéines des filaments transverses (en jaune et orange)

(d'après Annual Reviews of Cell and Developmental Biology 20, 2004.)

Le stade zygotène

Au stade zygotène, les chromosomes homologues vont commencer à s'associer grâce à la formation du complexe synaptonémal. Les éléments axiaux de chacun des homologues (appelé à ce stade éléments latéraux) se retrouvent liés par les filaments transverses composant l'élément central. Cette association est appelée synapsis (Figure 5 B). Chez *Arabidopsis*, les filaments transverses de l'élément central sont constitués de la protéine Zyp1 (Higgins et al., 2005). La formation correcte du complexe synaptonémal est nécessaire pour l'association des chromosomes homologues en bivalents. En effet, chez le mutant *hop1/asy1* (levure/*Arabidopsis*), il n'y a pas formation du complexe synaptonémal et donc pas d'association des chromosomes homologues en bivalent ce qui induit un mauvais déroulement de la méiose (Caryl et al., 2000). Des CDB méiotiques de l'ADN introduites sont réparées, en zygotène, par la recombinaison homologue (RH) dite alors méiotique (approfondie dans la partie Recombinaison Homologue).

Chez de nombreuses espèces, les chromosomes sont attachés à l'enveloppe nucléaire par leurs extrémités télomériques. A ce stade, les extrémités télomériques se regroupent pour former le « bouquet » (Zickler and Kleckner, 1998). Chez *Arabidopsis*, on ne peut pas parler de bouquet télomérique mais les télomères se regroupent quand même au niveau du nucléole (Armstrong et al., 2001).

Le stade pachytène

En pachytène, les chromosomes homologues sont alignés et synapsés sur toute leur longueur, ils continuent à se compacter et apparaissent plus courts et épais qu'aux stades précédents. A ce stade, les intermédiaires de la recombinaison homologue sont résolus en générant des crossing-over (CO) (Smithies and Powers 1986 ; Roeder, 1997). Il y a au moins un CO par bivalent. Les crossing-over sont responsables du brassage intra chromosomique. Ce stade est le plus long de la prophase I et peut représenter comme chez *Arabidopsis* la moitié du temps de la prophase I méiotique.

Le stade diplotène

Les chromosomes commencent à se décompacter, en diplotène, perdant ainsi les composants du complexe synaptonémal. Les chromosomes homologues se séparent légèrement mais restent associés au niveau des chiasmas, qui correspondent aux sites de crossing-over (Sturtevant, 1915).

Le stade diacinèse

Au stade diacinèse, les chromosomes se condensent à nouveau, atteignant leur niveau de compaction maximal. Les chromosomes se détachent de l'enveloppe nucléaire. Les cinq bivalents individualisés sont bien distincts. Les chromosomes sont associés en bivalent grâce à la cohésion et aux chiasmas (Sturtevant, 1915). La cohésion assure l'association des chromatides sœurs et les CO génèrent un échange réciproque de fragments entre une des deux chromatides de chaque chromosome. Ainsi, tant que la cohésion maintient l'association des chromatides sœurs au niveau des bras des chromosomes, l'association des chromosomes homologues sous forme de bivalent est conservée.

III.4.1.2. La segregation des chromosomes homologues

Après la prophase, la première division de méiose correspondant à la ségrégation des chromosomes homologues, se déroule en plusieurs étapes : la métaphase I, anaphase I et télophase I (Figure 4).

Après la disparition du complexe synaptonémal, au stade diplotène, les homologues restent associés en bivalents grâce à la cohésion, effectuée par les cohésines, et au niveau des chiasmas. Les bivalents s'alignent sur la plaque métaphasique en métaphase I grâce à l'attachement des chromosomes au fuseau de microtubules au niveau de leurs kinétochores (complexes multiprotéiques localisés au niveau du centromère de chaque chromosome). En anaphase I, la perte de la cohésion au niveau des bras chromosomiques s'effectue par la

dégradation des cohésines. Puis le réseau de microtubules, qui est bipolaire, va tirer les chromosomes vers chaque côté de la cellule grâce à l'orientation contrôlée des kinétochores en anaphase I. Le brassage inter-chromosomique résulte ici de l'orientation des homologues lors de leur ségrégation. En fin de première division de méiose, la cellule contient deux lots de cinq chromosomes à ses deux pôles. A ce stade, les chromosomes subissent une légère décondensation.

III.4.2. La deuxième division de méiose

Lors de la deuxième division méiotique, les chromosomes commencent tout d'abord par se recondenser. Puis ils s'alignent en métaphase II de telle sorte que les chromatides sœurs se retrouvent de part et d'autre de la plaque métaphasique. Enfin en anaphase II, la perte de la cohésion au niveau des centromères va permettre la migration des chromatides sœurs vers les pôles opposés. La cellule contient alors quatre lots comprenant cinq chromosomes à une seule chromatide. Les chromosomes se décondensent en télophase II terminant ainsi la division méiotique.

Ainsi, le bon déroulement de la méiose passe par une ségrégation correcte des chromosomes. Cette bonne ségrégation est importante pour la formation des gamètes et ainsi pour l'intégrité de l'information génétique. Lors de la méiose des cassures double brin de l'ADN sont introduites de façon programmée. Ces cassures doivent être réparées par un mécanisme déterminé permettant ainsi l'association en bivalent et donc la bonne ségrégation des chromosomes. De manière générale, l'ensemble des cellules subit des lésions de l'ADN de façon programmée comme lors de la méiose et de façon accidentelle, provoquées par des facteurs endogènes ou exogènes. Pour l'intégrité du génome et plus largement pour la survie de la cellule ces lésions faites à l'ADN doivent être réparées. Il existe plusieurs mécanismes décrits de réparation des lésions simple et double brin de l'ADN et qui sont relativement conservées à travers les espèces, dont *Arabidopsis*.

Chapitre III : Les cassures simple brin de l'ADN : les mécanismes de réparation

Lorsqu'un seul des deux brins subit une cassure ou contient une erreur, une base modifiée ou déléetée, l'information génétique peut être restaurée en utilisant le brin complémentaire comme matrice exacte. Dans ce cas, la lésion est tout d'abord détectée puis selon le type de lésion, le mécanisme adéquat est utilisé pour la réparer. On peut distinguer trois voies principales de réparation impliquant une réparation de cassure simple brin (CSB) : la réparation des mésappariements par MisMatch Repair (MMR), la réparation par excision de base : Base Excision Repair (BER) qui élimine une base (ou quelques), et la réparation par excision de nucléotides : Nucleotide Excision Repair (NER) qui excise un oligomère de 25 à 32 nucléotides. Ces mécanismes sont conservés à travers les espèces, ainsi leurs mécanismes et acteurs sont retrouvés chez les procaryotes, comme *Escherichia coli* (*E. coli*) et chez les eucaryotes, comme les mammifères et *Arabidopsis* (Kimura and Sakaguchi, 2006). Ces trois voies de réparation des CSB sont présentées de façon succincte dans la suite de ce mémoire.

I. Réparation des mésappariement par le système de MisMatch Repair (MMR)

I.1. Principe

Le MisMatch Repair (MMR) intervient afin de réparer les erreurs de mésappariements. Un mésappariement est une association non complémentaire entre nucléotides (avec la formation de paires de bases non AT ou GC). Les mésappariements sont le plus souvent créés lors de la réplication, lorsque le brin complémentaire de l'ADN est assemblé. Le mésappariement peut être causé soit par l'ajout d'un nucléotide non complémentaire soit par la délétion ou l'insertion d'un ou plusieurs nucléotides. Des mésappariements peuvent également résulter de la désamination spontanée de la 5'-méthyle cytosine en thymine dans l'ADN, en dehors de la réplication. La thymine ainsi produite est donc mésappariée à une guanine.

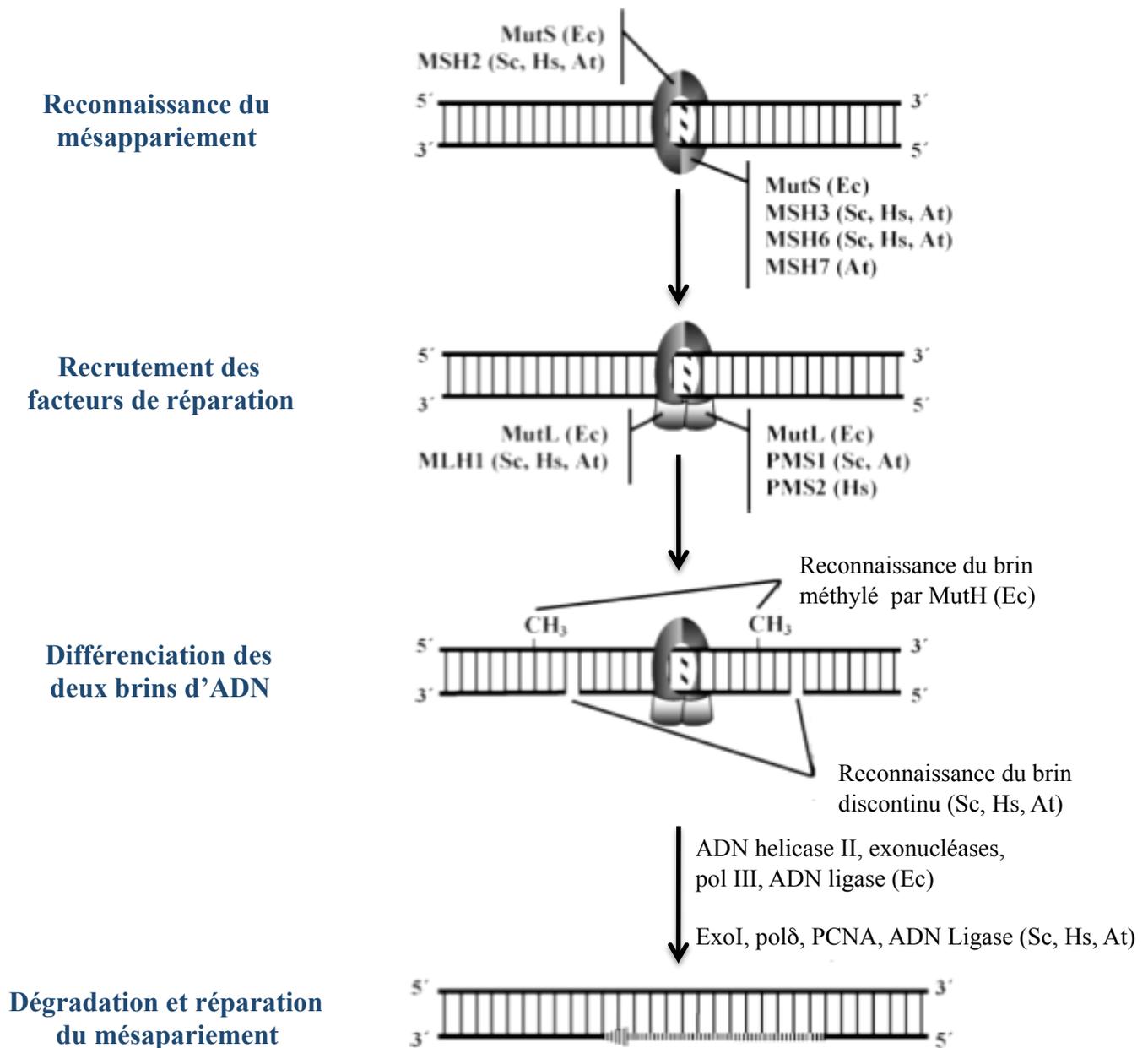


Figure 6 : MisMatch Repair (MMR)

Le mésappariement est reconnu par MutS (Ec) ou les protéines paralogues MSH (Sc, Hs, At). Ensuite MutL (Ec) ou MLH/PMS (Sc, Hs, At) s'associent à ce complexe MutS/ADN pour le stabiliser. Puis, chez E. coli, l'endonucléase MutH clive le brin non méthylé contenant la base incorrecte en 5' ou en 3'. Les deux brins d'ADN sont écartés par l'ADN hélicase II puis l'extrémité flanquante est dégradée par des exonucléases différentes selon que la coupure ait eu lieu en 3' ou en 5'. Enfin l'ADN est synthétisé par la polymérase III et il y a une étape finale de ligation. Chez les Eucaryotes, en absence de MutH, le brin discontinu contenant le mésappariement est reconnu et localement dégradé par l'exonucléase ExoI. Puis il y a resynthèse effectué par l'ADN polymérase δ aidé de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Enfin il y a une étape finale de ligation. (Ec : E. coli ; Sc : S. cerevisiae; Hs : H. sapiens; At : A. thaliana) (Adapté de Spampinato et al., 2009)

Le MMR se divise en plusieurs étapes : la reconnaissance du mésappariement, le recrutement de facteurs, la recherche d'un signal permettant de différencier le brin néosynthétisé contenant l'erreur et son excision (Figure 6).

I.2. Mécanisme et acteurs

I.2.1. Etape de reconnaissance du mésappariement

Le mésappariement est reconnu par la protéine MutS (*E. coli*) (Jiricny et al., 1988). MutS détecte aussi des insertions/délétions de quelques nucléotides. Chez les Eucaryotes, *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), l' Humain (*Hs*) et *Arabidopsis* (*At*) les homologues de MutS ont été retrouvés et comptent plusieurs paralogues nommés MSH (Acharya et al., 1996); (Marsischky et al., 1996);(Culligan and Hays, 1997);(Ade et al., 1999); (Spampinato et al., 2009). S'il existe plusieurs paralogues c'est pour permettre la reconnaissance spécifique des différents mésappariements.

I.2.2. Etape de recrutement des facteurs

La protéine MutL (*E. coli*) est ensuite recrutée au niveau du mésappariement (Grilley et al., 1989). MutL stabilise le complexe formé par MutS et l'ADN. Chez les Eucaryotes, les homologues de MutL ont été retrouvés et comptent plusieurs paralogues, dont l'utilisation diffère selon le type de mésappariement, nommé MLH (*Sc*, *Hs*, *At*) ou PMS1-2 (PMS1 chez *Sc* et *At* et PMS2 chez *Hs*) (Nicolaidis et al., 1994 ; Prolla et al., 1994 ; Jean et al., 1999 ; Alou et al., 2004).

I.2.3. Etape de différenciation des brins d'ADN

Le complexe MutS/L (*Ec*) ainsi formé permet de différencier le brin d'ADN parental du brin néosynthétisé en reconnaissant des séquences méthylées présentes uniquement sur le brin parental. Ce complexe active ensuite la protéine MutH (Ban and Yang, 1998) qui va

cliver le brin néosynthétisé non méthylé contenant le mésappariement en 5' ou en 3' du mésappariement (Pukkila et al., 1983 ; Iyer et al., 2006).

L'homologue de MutH n'a pas été identifié chez les eucaryotes, ce qui est cohérent avec l'absence de méthylation des séquences du brin parental. La distinction entre les deux brins est faite par la recherche d'une interruption de brin, par MutS/MutL, résultant de la présence de fragments d'Okazaki sur le brin retardé, ou de la présence d'extrémité 3'-OH libre sur le brin continu (Modrich and Lahue, 1996 ; Iyer et al., 2006).

I.2.4. Etape de dégradation et réparation du mésappariement

Le brin néosynthétisé contenant l'erreur est ensuite déplacé par l'ADN Helicase II (*Ec*) et partiellement dégradé par des exonucléases pour être resynthétisé correctement par l'ADN polymérase III (Lahue et al., 1989). Chez les Eucaryotes, l'exonucléase I (*Sc*, *Hs*) dégrade, à partir de la cassure, la portion du brin contenant le mésappariement. L'ADN est ensuite resynthétisé par l'ADN polymérase δ (*Sc*, *Hs*) aidé de la Proliférating Cell Nuclear Antigen (Pcna) (*Sc*, *Hs*) qui est une protéine connue pour améliorer la processivité des ADN polymérases lors de la réplication de l'ADN (Umar et al., 1996; Gary et al., 1999). Enfin il y a une étape finale de ligation dont l'ADN Ligase n'a pas encore été clairement identifiée (Genschel and Modrich, 2003); (Iyer et al., 2006).

II. Réparation par excision de base : le Base excision repair (BER)

II.1. Principe

La réparation par excision de base permet principalement de remplacer les bases modifiées comme par exemple l'uracile produite par la déamination des cytosines, l'alkylation de base induite par des métabolites cellulaires, des bases oxydées de l'ADN et certains mésappariements induits par les erreurs de réplication de l'ADN.

La base endommagée est reconnue puis clivée et l'intervention de protéines spécifiques entraîne une cassure simple brin de l'ADN qui va être prise en charge par deux voies dont la différence porte sur le nombre de nucléotides resynthétisés et les acteurs impliqués (Figure 7).

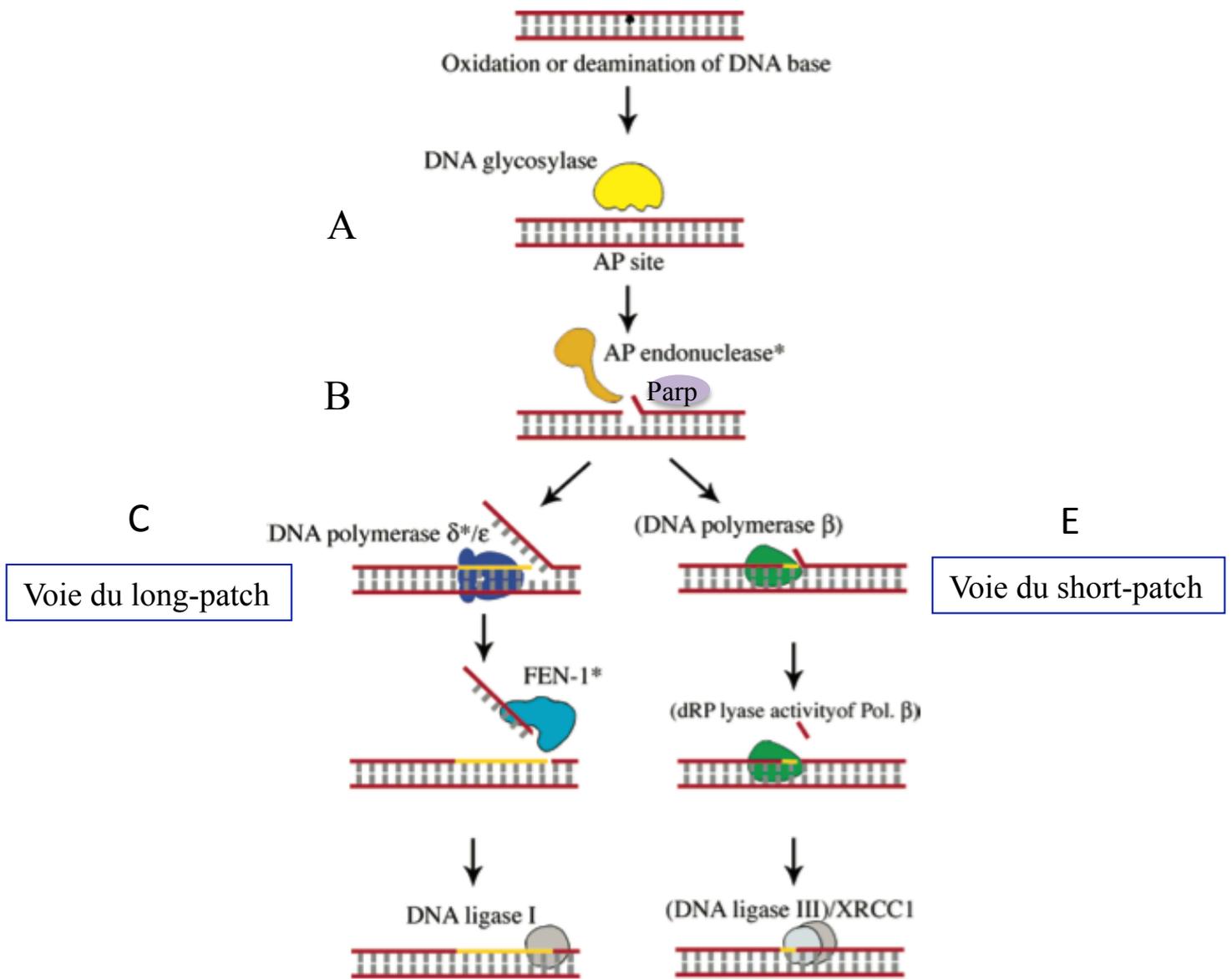


Figure 7 : La réparation par excision de base, BER.

Après détection de la base endommagée, (A) il y a excision enzymatique de la base effectué par une ADN glycosylase produisant ainsi un site abasique (AP). (B) Une AP endonucléase va ensuite prendre en charge ce site abasique et cliver la liaison phosphodiester, puis la PARP se lie à l'ADN et une fois activée joue un rôle sur le modelage de la chromatine et sur le recrutement des facteurs nécessaires à la réparation de l'ADN. Puis il y a synthèse et religation .

La réparation par BER peut s'effectuer selon deux voies : le long-patch ou le short-patch.

Les acteurs moléculaires principaux du long-patch (C) sont l'ADN polymérase δ/ϵ qui effectue la synthèse d'ADN, la protéine FEN-1 clive l'ADN et l'étape finale de ligation est effectuée par l'ADN Ligase I.

Pour le Long patch (E), c'est l'ADN polymérase β qui synthétise l'ADN et la ligation est effectuée par le complexe DNA Ligase III/Xrcc1.

Les protéines entre parenthèse n'ont pas été retrouvées chez *Arabidopsis* et celles marquées d'un astérisque sont présentes en plusieurs copies.

(d'après Kimura et Sakaguchi, 2006)

II.2. Mécanismes et acteurs

II.2.1. Etape de reconnaissance

Après détection de la base endommagée, celle-ci est excisée par une ADN glycosylase qui clive la liaison glycosidique (Figure 8). Il existe plusieurs ADN glycosylases qui reconnaissent les différents dommages des bases spécifiquement. Par exemple Ogg1 (8-oxo-guanine glycosylase 1 chez *S. cerevisiae* et *A. thaliana*) reconnaît et excise les 8-oxoG (van der Kemp et al., 1996 ; Dany and Tissier, 2001). Les Uracil DNA Glycosylases (UDG) reconnaissent et excisent les uraciles incorporés par erreur dans l'ADN (Gallinari and Jiricny, 1996). Chez *Arabidopsis*, il a été identifié une UDG nommée Ung (Cordoba-Canero et al., 2010). Les ADN glycosylases peuvent être mono-fonctionnelles ou bi-fonctionnelles. Les ADN glycosylases mono-fonctionnelles, comme les UDG, créent, par excision de la base endommagée, un site apurinique ou apyrimidique, dit site AP. Ce site AP est ensuite pris en charge et transformé en cassure simple brin de l'ADN par une AP endonucléase (Ape1) qui génère une extrémité 3'OH et un résidu 5'desoxyribose phosphate abasique (5'-dRP) (Hegde et al., 2008). Les ADN glycosylases bi-fonctionnelles comportent en plus une activité AP-lyase. La création du site AP se fait par β -élimination, c'est le cas d'Ogg1, laissant une cassure avec des extrémités 5'-phosphate et 3' aldéhyde α,β -insaturée (3'-dRP), ou par $\beta\delta$ -élimination laissant des extrémités phosphate en 5' et 3'. Puis l'intervention d'une AP endonucléase (Ape1) après la phase de β -élimination permet de cliver le 5'dRP et d'obtenir des extrémité 3'OH et 5'P nécessaire pour la suite de la réparation par BER. Après une $\beta\delta$ -élimination, c'est une polynucléotides kinase (Pnk) qui permet l'obtention des extrémités correctes 3'OH et 5'P par son activité 5'kinase/3'phosphate (Hegde et al., 2008).

II.2.2. Etape de réparation : voies du long et short-patch

La réparation par BER se décline ensuite sous deux formes : le short patch repair qui agit sur un nucléotide et le long patch repair qui agit sur au moins deux nucléotides.

Dans la voie de réparation du short patch, la poly-ADP ribose polymérase 1 (Parp1) est recrutée au niveau de la cassure simple brin permettant le recrutement des autres facteurs de

réparation. Si l'intermédiaire 5'-desoxyribose phosphate abasique (5'-dRP) produit par l'activité AP endonucléase n'a pas été clivé, il est alors éliminé par l'activité lyase de l'ADN polymérase Pol β , qui est associée à Xrcc1 (X-ray cross-complementing protein). La Pol β , associée à Xrcc1 permet l'ajout du nucléotide complémentaire à l'extrémité 3'. L'étape finale consiste en une ligation effectuée par l'ADN Ligase III (Ligase III) associée à Xrcc1.

La Ligase III et la Pol β n'ont pas été retrouvés chez *Arabidopsis* ni chez aucun génome de plante. Il semblerait que ce soit, chez les plantes, la polymérase Pol λ , appartenant à la même famille que la Pol β , qui permette la synthèse d'ADN (Kimura and Sakaguchi, 2006).

La réparation par le long patch est utilisée pour agir sur au moins deux nucléotides. L'ADN polymérase ϵ/δ (Pol ϵ et Pol δ) et PcnA (Frosina et al., 1996) sont recrutées au niveau de la cassure pour catalyser la réaction de synthèse. Puis Fen1 (Flap endonuclease) clive le brin mésapparié 5' sortant et enfin l'ADN Ligase I (Ligase I) termine la réparation en effectuant une ligation (Klungland and Lindahl, 1997 ; Pascucci et al., 1999).

III. Réparation par excision de nucléotide : le NER

III.1. Principe

Le mécanisme du NER permet de réparer des lésions encombrant la structure hélicoïdale de l'ADN comme par exemple les dimères de pyrimidines causés principalement par les rayonnements UV.

La réparation par NER agit à trois niveaux : le premier est un mécanisme de réparation qui identifie les lésions de l'ADN localisées dans les parties non transcrites du génome, le *Global Genome Repair* (GGR), le deuxième est un mécanisme plus rapide qui intervient lors de la transcription du gène, nommé *Transcription Coupled Repair* (TCR), et le dernier, moins connu, correspond à la réparation des domaines associés à la transcription sur les deux brins des gènes actifs Domain-Associated Repair (DAR) (Hanawalt et al., 2000 ; Nospikel, 2009). Le NER se déroule en quatre étapes. Après détection de la lésion, la double hélice d'ADN est déroulée et ouverte localement. Après excision de quelques bases autour de la lésion, le nucléotide endommagé est excisé, générant ainsi des coupures simple brin aux extrémités du

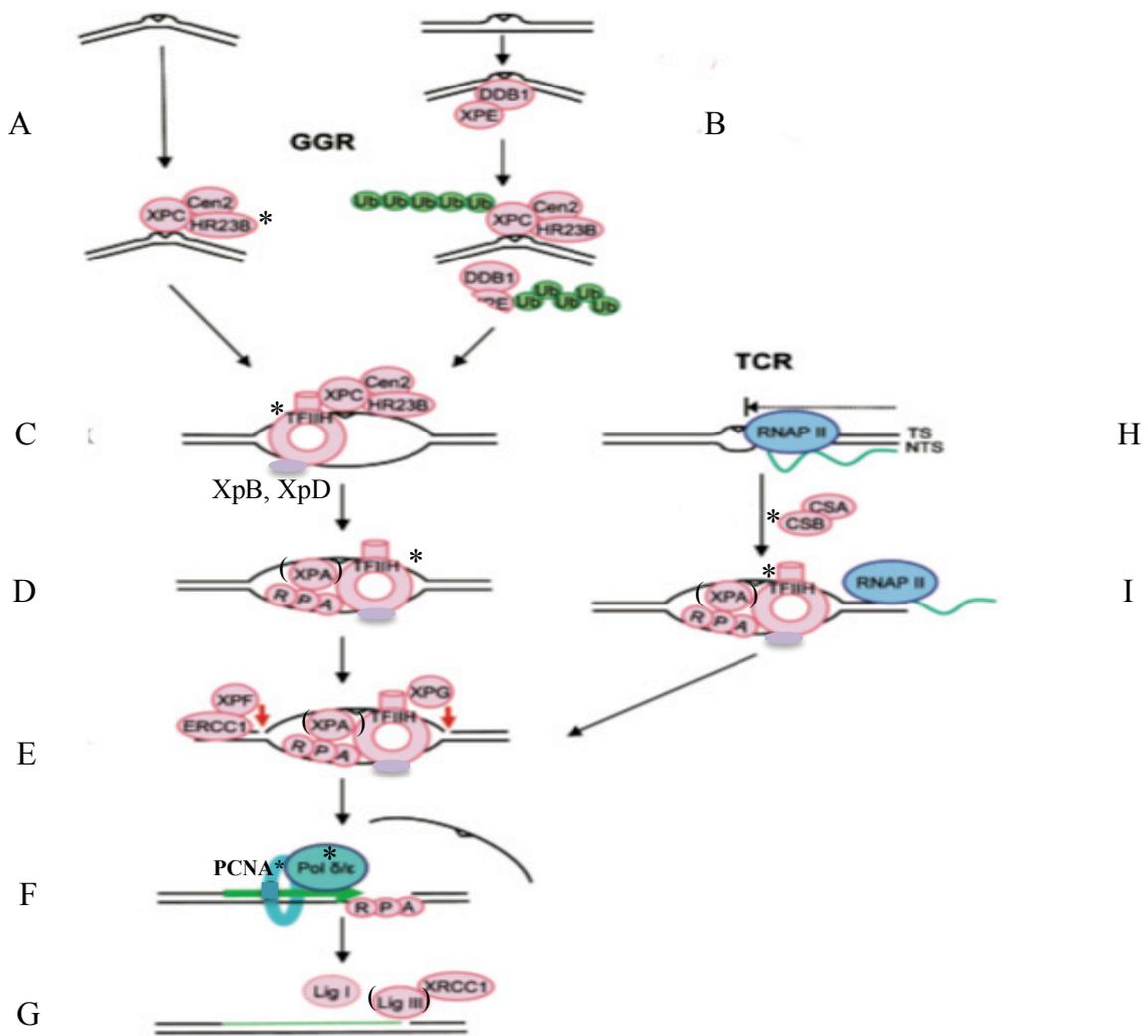


Figure 8 : Nucleotide excision repair (NER), chez les mammifères

Le NER se divise en trois voies. La réparation globale du génome (global genome repair, GGR), la réparation couplée à la transcription (transcription-coupled repair, TCR) et la réparation des domaines associés à la transcription sur les deux brins des gènes actifs (Transcription domain-associated repair, DAR) qui est moins connu et donc non représenté sur la figure. Le NER débute par la reconnaissance des dommages, l'excision des nucléotides endommagés puis s'achève par la synthèse de l'ADN et sa religation.

La voie du GGR. (A) Beaucoup de lésions de l'ADN sont détectées directement par le complexe XpC-Rad23(HR23B)-Centrine2(Cen2), par le biais des distorsions structurelles qu'elles causent à l'ADN. (B) Les lésions qui cause une grande distorsion de l'ADN peuvent être reconnues par le complexe DDB. Ce complexe polyubiquitinye le complexe XpC et XpF grace à l'ubiquitine E3 (Ub). XpC ubiquitinylé permet d'augmenter son affinité à l'ADN, tandis que l'ubiquitination de XpF conduit à sa dégradation. (C) Les hélicases XpB et XpD et TFIIH permettent l'ouverture de la double hélice d'ADN d'environ 30 nucléotides autour de la lésion. (D) Le complexe XpA-Rpa se joint à TFIIH et déplace le complexe XpC. Rpa se lie à l'ADN simple brin; XpA confirme la présence d'une lésion et/ou sert à identifier le brin endommagé. (E) XpG incise le brin endommagé en 3' de la lésion et Ercc1-XpF en 5'. (F) Les ADN polymérase δ/ε, susceptibles d'être associées à Pcna, resynthétisent correctement l'ADN. (G) La ligation est effectuée par la ligase III, avec une contribution mineure de la ligase I dans les cellules en phase de réplication.

(H) Dans la voie de la TCR, l'ARN polymérase II (RNAPII) est bloquée par des lésions dans le brin transcrit (TS). (I) Les enzymes CsA, CsB et XpA sont alors recrutées au niveau de la lésion, puis le complexe TFIIH agit comme dans la voie de réparation par GGR.

Les protéines avec une astérisque sont présentes en plusieurs copies chez *Arabidopsis* alors que celles entre parenthèse ne sont pas retrouvées chez la plante modèle.

(d'après Nouspikel, 2009)

site de dommage. Enfin les nucléotides adéquats manquant sont synthétisés afin de réparer le dommage puis il y a une ligation (Figure 8).

III.2. Mécanisme et acteurs

III.2.1. Détection de la lésion

L'étape de reconnaissance du nucléotide à exciser est différente dans la voie du GGR et dans la voie du TCR.

Dans le GGR, la reconnaissance du nucléotide s'effectue par le complexe *Xeroderma pigmentosum* groupe C ou XpC (*Hs*), Rad23 (*Hs*, *Sc*, *At*) et la Centrine 2 (Evans et al., 1997; Sugasawa et al., 1998). La famille des protéines Xp, pour *Xeroderma pigmentosum*, provient du nom du syndrome humain provoqué par la mutation dans un de ces gènes, qui induit une forte sensibilité aux UV et donc des cancers de la peau chez l'homme.

Il peut y avoir une étape préalable de reconnaissance, lorsqu'il y a une distorsion dans l'ADN, par exemple après une exposition aux UV, effectuée par XpE (Xp groupe E), associé à Ddb1 (damaged DNA-binding) (*Hs*, *At*) (Reardon et al., 1993 ; Kulaksiz et al., 2005). XpE et Ddb1 polyubiquitinylent le complexe XpC-XpC grâce à l'ubiquitine E3.

Dans le TCR, l'ARN polymérase II est stoppée lors de la transcription lorsqu'elle détecte une lésion. Les protéines CsA et CsB (syndrome de cockayne) (*Hs*, *At*) sont alors recrutées au niveau de la lésion mais leur rôle n'est pas clair (Tsutakawa and Cooper, 2000).

III.2.2. Etape d'excision

Les étapes suivantes de réparation par NER sont ensuite les mêmes dans le GGR et le TCR.

TFIIH (transcription factor IIH) est ensuite recruté au niveau de la lésion, il est associé aux hélicases XpB et XpD qui permettent de séparer les deux brins d'ADN. Le complexe XpC est ensuite déplacé par XpA et Rpa qui viennent se joindre à TFIIH. La présence de la lésion et l'identification du brin où elle se localise est réalisée par XpA (Sugasawa et al., 1998). Ensuite,

les endonucléases XpG (*Hs*, *At*) et XpF (group F) (*Hs*, *At*) associées à la protéine Ercc1 (Excision repair complementing défective repair in Chinese hamster 1) (*Hs*, *At*), incisent le brin endommagé, respectivement en 3' et 5' de la lésion, et libèrent un fragment de 25 à 30 nucléotides (Friedberg, 2003; Hohl et al., 2003). Chez la levure *S. cerevisiae*, les orthologues de XpF et Ercc1 sont nommés Rad1 et Rad10 respectivement.

III.2.3. Etape de réparation

Enfin, les ADN polymérase δ/ϵ resynthétisent de l'ADN, avec l'aide de PCNA, au niveau de la cassure et le complexe ADN LigaseIII/Xrcc1 termine la réparation par une ligation (Popanda and Thielmann, 1992).

La ligaseI joue également un rôle, même s'il est mineur, lors de l'étape de ligation du NER dans les cellules en division mais pas dans les cellules quiescentes (Moser et al., 2007).

Chez *Arabidopsis* la LigaseIII n'existant pas, c'est la LigaseI qui intervient dans l'étape finale de ligation.

Chapitre IV : Les cassures double brin de l'ADN : introduction, signalisation et réparation

Les cassures double brin (CDB) de l'ADN peuvent être introduites soit de façon accidentelle, soit de façon programmée. Elles sont particulièrement toxiques pour la cellule et elles doivent impérativement être réparées pour sa survie et le maintien de l'intégrité génétique.

I. Initiation des CDB de l'ADN

I.1. Les CDB accidentelles

Les CDB de l'ADN accidentelles sont générées par des agents endogènes, par des mécanismes cellulaires (réplication par exemple), ou par des agents exogènes comme des stress génotoxiques (vu dans le Chapitre I).

I.2. Les CDB programmées

I.2.1. Lors de la formation des immunoglobulines

Chez les vertébrés, les immunoglobulines appartenant au système immunitaire, jouent un rôle essentiel dans la défense contre les pathogènes. La formation et la diversité des immunoglobulines reposent sur l'introduction de CDB, à des sites spécifiques, et sur des modifications dans leurs séquences géniques ainsi que leur prise en charge pour leur réparation. La diversité des immunoglobulines repose donc sur la recombinaison V(D)J, intervenant sur sa région variable et sur la commutation de classe (CSR) qui agit sur sa région constante. Lors de la recombinaison V(D)J, les CDB sont engendrées par les protéines Rag et sont ensuite réparées par un mécanisme de réparation adapté. Dans la CSR, la protéine Aid induit des modifications de l'ADN qui nécessitent leur réparation par plusieurs mécanismes.

I.2.2. Lors de la méiose

Lors de la méiose, les CDB de l'ADN sont programmées et effectuées par Spo11 (Keeney et al., 1997). *SPO11* code une protéine de 45 kDa présentant une homologie avec la sous unité catalytique d'une topoisomérase II : la topoisomérase VI d'Archaeobactérie (Bergerat et al., 1997 ; Keeney et al., 1997). Les topoisomérases induisent des cassures de l'ADN par une réaction de trans-estérification afin de résoudre les contraintes topologiques de l'ADN causées par des événements tels que la réplication de l'ADN, la transcription, ou le remodelage de la chromatine. Les topoisomérases de type I font des cassures simple brin de l'ADN alors que les topoisomérases de type II clivent les deux brins de l'ADN (Champoux, 2001 ; Wang, 2002).

Au cours de la méiose, Spo11 agit en dimère se fixant sur l'ADN et le clive par l'intermédiaire de deux tyrosines catalytiques formant un intermédiaire Spo11/5'ADN. Les protéines Spo11 sont incapables d'effectuer une religation. Elles sont donc dissociées de la zone de cassure par l'intermédiaire d'un mécanisme de coupure simple brin de l'ADN situé à une trentaine de nucléotides en 3' du complexe Spo11-ADN effectuée probablement par l'activité nucléase de Mre11 et Sae2 (Moreau et al., 1999 ; Neale et al., 2005).

Le mécanisme de formation des CDB de l'ADN semble très conservé au cours de l'évolution puisque les homologues de Spo11 ont été retrouvés aussi bien chez les protistes que chez les eucaryotes pluricellulaires (Malik et al., 2007). Chez la majorité des espèces, Spo11 est codée par un seul gène et son inactivation par mutation aboutit à une réduction de la recombinaison méiotique, donc à une diminution de la fertilité. Chez *Arabidopsis*, en revanche il existe trois homologues de Spo11 (Hartung and Puchta, 2000 ; 2001). Spo11-1 et 2 ont un rôle dans la méiose, les simples mutants *spo11-1* et *spo11-2* sont stériles. Chez ces mutants, il n'y a pas d'introduction de CDB lors de la méiose, les bivalent ne se forment alors pas et les chromosomes sont en univalents et ségrégent de façon aléatoire. Ces deux protéines ne sont donc pas redondantes, elles agiraient sous forme d'hétérodimères lors de la création des CDB (Grelon et al., 2001 ; Stacey et al., 2006). En revanche Spo11-3 n'a pas de rôle méiotique. Spo11-3 intervient dans le développement de la plante, elle régulerait l'expression des gènes comme ceux codant pour des hormones (les brassinostéroïdes) (Hartung et al., 2002 ; Yin et al., 2002). Il a également été montré que Spo11-3 aurait un rôle dans l'endoréplication, la

réplication de l'ADN n'étant pas suivie de division de la cellule (Sugimoto-Shirasu et al., 2002).

Mais il est maintenant connu que Spo11 n'agit pas seule et que d'autres protéines sont absolument nécessaires pour générer des CDB en méiose. Chez *S. cerevisiae*, la formation de CDB de l'ADN requiert également les protéines Rad50, Mre11, Xrs2, Rec102, Rec104, Rec114, Ski8, Mer2 et Mei4 (Keeney, 2001). Chez *Arabidopsis*, seule Rad50, Mre11 et Nbs1 (homologue de Xrs2) ont été montré comme intervenant en méiose mais pas forcément lors de la formation des CDB de l'ADN (Bleuyard et al., 2004). L'homologue de Ski8 a été trouvé chez *Arabidopsis*, mais n'aurait pas de rôle en méiose (Jolivet et al., 2006). Enfin, Prd1 a été identifié, chez *Arabidopsis*, comme un partenaire de Spo11-1 (De Muyt et al., 2007). Prd1 est impliquée dans la formation des CDB de l'ADN en méiose et joue donc un rôle dans la recombinaison méiotique (De Muyt et al., 2007).

II. Signalisation et maturation, si nécessaire, de la CDB

Chez la levure *S. cerevisiae*, le complexe MRX, composé des protéines Mre11, Rad50 et Xrs2 est tout d'abord recruté au niveau de la CDB (Johzuka and Ogawa, 1995 ; Usui et al., 1998). Il a deux activités qui ne sont pas utilisées dans tous les mécanismes de réparation des CDB de l'ADN. Il a tout d'abord un rôle dans la signalisation des CDB. Ainsi, le complexe MRX recrute, *via* Xrs2 la protéine kinase Tel 1 (Atm pour Ataxia telangiectasia mutated chez les mammifères), dont la fonction catalytique va alors être activée. L'activité kinase de Tel1 va permettre la phosphorylation de l'histone H2AX, variant de l'histone H2A, induisant ainsi un remodelage de la chromatine au niveau de la cassure rendant la CDB plus accessible pour les différents acteurs moléculaires des mécanismes de réparation de l'ADN (Burma et al., 2001 ; Lee and Paull, 2004). Un autre rôle du complexe MRX, *via* l'activité nucléase de Mre11, est la dégradation de 5' vers 3' des bordures de l'ADN afin de libérer une extrémité 3' simple brin. Ce processus n'est utilisé que pour les mécanismes de réparation nécessitant, comme substrat, une extrémité 3' d'ADN simple brin.

Alors que les protéines Mre11 et Rad50 sont très conservées chez tous les organismes vivants, Xrs2 l'est moins. L'homologue fonctionnel de Xrs2 chez l'homme, et plus largement chez les mammifères, est nommé Nbs1, il ne présente que très peu d'homologie de séquence avec

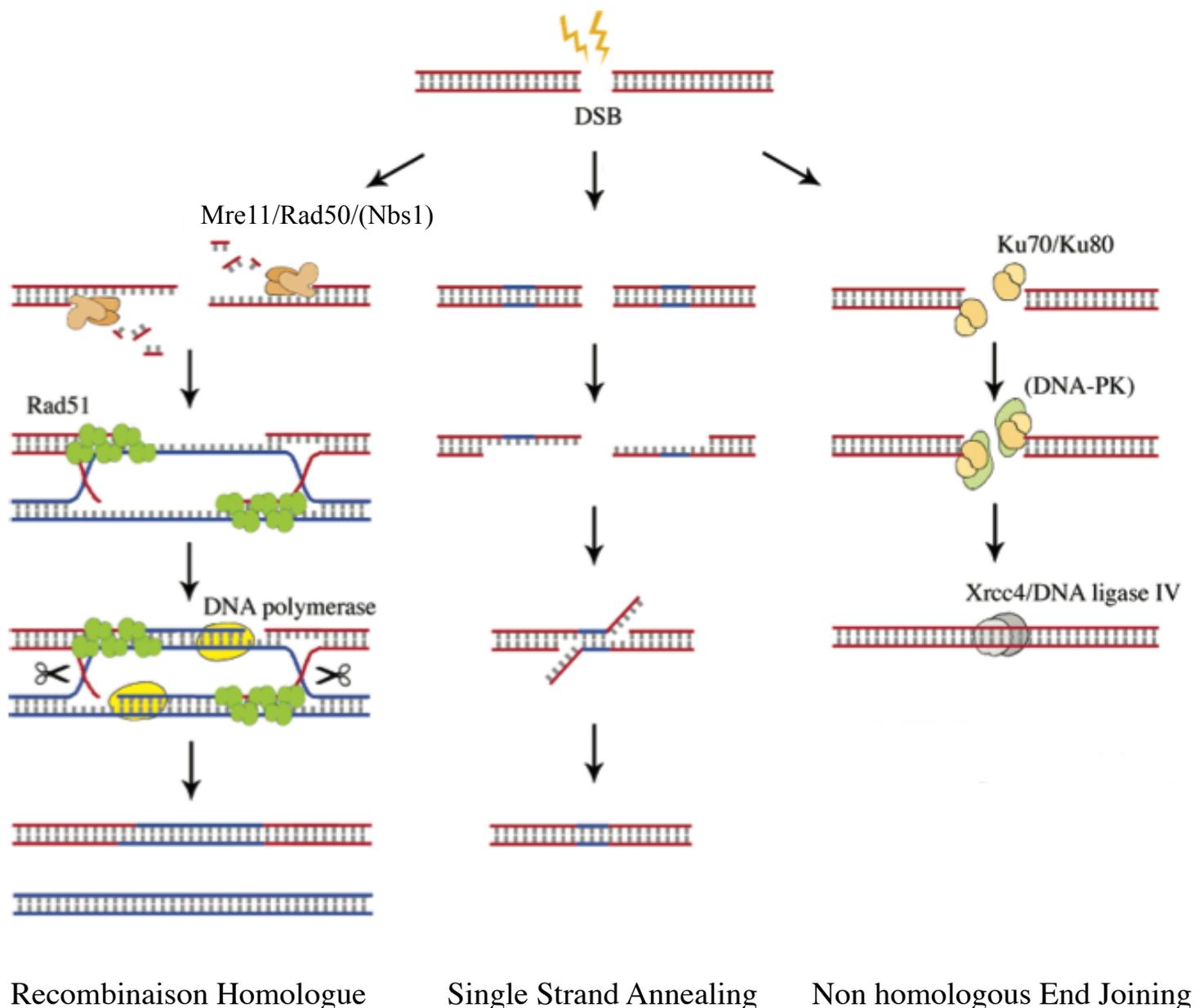


Figure 9 : Mécanismes de réparations des cassures doubles brin (CDB) de l'ADN

La réparations des CDB peut s'effectuer par trois voies.

La cassure peut être maturée afin d'obtenir des extrémités simple brin 3' sortantes. La CDB est ensuite réparée soit par Recombinaison Homologue (RH) soit par Single Strand Annealing (SSA). La réparation par RH se fait en recopiant la séquence homologue, elle est qualifiée de fidèle. La réparation par SSA s'effectue en appariant deux séquences contenant des microhomologies, cela nécessite la dégradation de quelques à plusieurs centaines de nucléotides. Le SSA est donc dit non conservatif.

La cassure peut également ne pas subir de maturation et être réparée par Non Homologous End Joining (NHEJ) qui consiste en une simple religation des extrémités.

Les protéines entre parenthèses sont présentes uniquement chez les mammifères.

(d'après Kimura et Sakaguchi, 2006)

Xrs2 (Carney et al., 1998). Ainsi le complexe est nommé MRN chez les mammifères. Chez la bactérie *E. coli*, les homologues de Mre11 et Rad50 sont nommés SbcD et SbcC respectivement (Sharples and Leach, 1995). Des mutations dans les gènes du complexe MRX entraînent chez la levure une sensibilité aux agents génotoxiques (Haber, 1998). Chez la souris, l'inactivation des gènes du complexe MRN est létale (Rad50 : (Luo et al., 1999); Mre11 : (Xiao and Weaver, 1997)). En revanche, ils sont viables chez *Arabidopsis*. En effet le mutant *rad50* a un développement normal, mais présente une sensibilité accrue au MMS et est stérile, signifiant un rôle de Rad50 dans la réparation de l'ADN en somatique et en méiotique également chez *Arabidopsis* (Gallego et al., 2001).

Trois mécanismes principaux sont impliqués dans la réparation des CDB de l'ADN : le Non Homologous End Joining (NHEJ), le Single Strand Annealing (SSA) et la Recombinaison Homologue (RH) (Figure 9). Ces mécanismes sont conservés entre les espèces et retrouvés également chez *Arabidopsis*.

III. Le Non Homologous End Joinning : NHEJ

III.1. Principe

Le NHEJ intervient pour réparer les CDB de l'ADN dans les cellules somatiques par simple religation ne nécessitant pas forcément d'homologie de séquence (Figure 9). Il est donc dit non-conservatif et peut être responsable d'importantes délétions ou de remaniements chromosomiques. Ce mécanisme agit durant tout le cycle cellulaire mais avec une plus grande importance lors de la phase G1 et en début de phase S (Takata et al., 1998 ; Delacote and Lopez, 2008). Chez les mammifères et chez *Arabidopsis*, contrairement à la levure, le NHEJ est le mécanisme le plus utilisé pour réparer les CDB de l'ADN en phase somatique. Il est

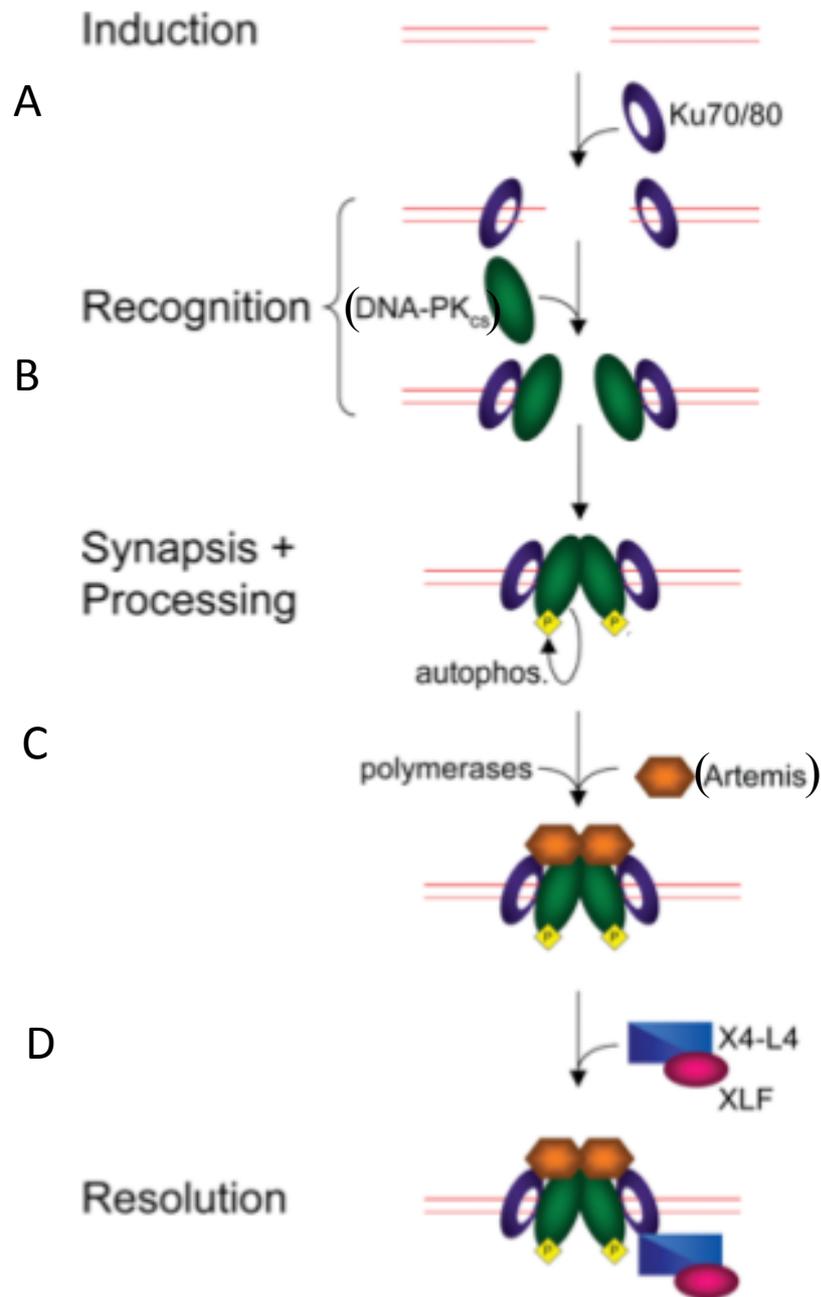


Figure 10 : NHEJ chez les mammifères

(A) L'hétérodimère Ku70-80 est recruté au niveau de la CDB de l'ADN,(B) puis la DNA-PKcs permettant par son action de phosphorylation de recruter et d'activer les autres acteurs du NHEJ. (C) Une étape de maturation de l'ADN peut être observée réalisé par Artemis qui élimine les structures en épingles à cheveux. (D) Puis le complexe LigaseIV-Xrcc4 (X4-L4) et Xlf sont recrutés pour l'étape finale de ligation.

Les protéines entre parenthèses n'ont pas été identifiées chez *Arabidopsis*.
(d'après Valérie and Povirk, 2003)

décrit deux voies du NHEJ, une classique et l'autre alternative n'utilisant pas les mêmes acteurs moléculaires.

Certaines protéines, acteurs du NHEJ sont également retrouvées dans d'autres mécanismes cellulaires autres que la réparation de l'ADN.

III.2. Etapes moléculaires et acteurs du NHEJ classique (D-NHEJ)

III.2.1. Etape de reconnaissance et de maintien

Le NHEJ est initié par la liaison à l'ADN de l'hétérodimère Ku70-Ku80 (Ku). Cet hétérodimère se présente sous forme d'anneau, il permet de maintenir les extrémités cassées proches et de les protéger des activités exonucléases (Featherstone and Jackson, 1999) (Figure 10). L'association des protéines Ku avec l'ADN sert de plateforme pour l'assemblage des autres protéines du NHEJ. Les autres intervenants du NHEJ sont recrutés grâce à leurs interactions avec Ku. Chez les mammifères, la sous-unité catalytique, protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PKcs), est ensuite recrutée *via* son interaction avec Ku (Gottlieb and Jackson, 1993). L'association de l'hétérodimère Ku et de la DNA-PKcs forme le complexe DNA-PK. Cette association entraîne un léger déplacement de l'hétérodimère Ku permettant ainsi à la DNA-PKcs de se trouver en contact avec l'ADN (Yoo and Dynan, 1999). La DNA-PKcs permet la phosphorylation de différentes protéines dont Ku et des protéines intervenant dans les étapes ultérieures du NHEJ. Les conséquences de ces phosphorylations, essentielles pourtant au bon déroulement du NHEJ, ne sont pas toujours connues (Wang et al., 2004 ; Douglas et al., 2005 ; Mahaney et al., 2009).

Le complexe MRX/N intervient également dans la réparation par NHEJ (Xie et al., 2009). Chez la levure, le rôle principal du complexe MRX dans le NHEJ n'est pas la maturation de la cassure comme lors de la RH ou du SSA mais plutôt son rôle dans le recrutement des acteurs du NHEJ comme le complexe ligase (Chen et al., 2001). Chez les vertébrés, c'est la DNA-PKcs qui joue en parallèle du complexe MRN ce rôle de recruteur (DeFazio et al., 2002). Cette redondance peut s'expliquer par le fait qu'il n'a pas été retrouvé d'orthologue de la DNA-PKcs chez la levure, ni d'ailleurs chez *Arabidopsis* (Hartlerode and Scully, 2009).

III.2.2. Etape de maturation

Une fois les acteurs initiaux recrutés, l'extrémité cassée peut éventuellement subir une maturation. Les acteurs de cette étape sont moins bien caractérisés.

Artemis, par exemple, a été identifiée chez les mammifères (Ma et al., 2002) (Figure 10). Cette nucléase appartient à la famille des enzymes métallo- β -lactamase. Elle est recrutée et activée par phosphorylation par la DNA-PKcs (Ma et al., 2002 ; Niewolik et al., 2006). Artemis a une activité exonucléase 5'-3' *in vitro* et permet *in vivo* de dégrader les éventuelles épingles à cheveux formées par l'ADN lors de la recombinaison V(D)J (Schlissel, 2002). Chez *Arabidopsis*, l'orthologue de la protéine Artemis pourrait être Snm3 (Molinier et al., 2004 et comm. perso).

D'autres protéines sont impliquées dans la maturation des extrémités qui ne peuvent pas être reliées en l'état. Ainsi la kinase polynucleotide (PNK) peut intervenir lors du NHEJ pour modifier les groupements 3' et 5'. En effet, elle a une activité ADN 3'phosphatase et 5'kinase (Bernstein et al., 2008 ; Mahaney et al., 2009). La protéine du syndrome de Werner (WRN) est une hélicase et a également une activité exonucléase stimulée par son interaction avec Ku (Cooper et al., 2000 ; Mahaney et al., 2009).

La nucléase Mre11 semble aussi avoir un rôle lors de la maturation des extrémités chez *S. cerevisiae* mais pas chez les vertébrés (Dudasova et al., 2004 ; Di Virgilio and Gautier, 2005). Il peut aussi y avoir une nécessité de synthétiser un ou plusieurs nucléotides avant l'étape de religation, les polymérase Pol λ et Pol μ peuvent ainsi intervenir. Pol λ et Pol μ sont recrutées au niveau de la CDB par leur interaction avec Ku et le complexe de ligation (revue par Nick McElhinny and Ramsden, 2004).

III.2.3. Etape finale de ligation

La réparation des CDB par NHEJ se termine par une étape de ligation (figure 10). Le complexe Ligase IV-Xrcc4 (X-ray repair complementing déficiente repair in Chinese hamster cells 4) (Grawunder et al., 1998a), nommé Dnl4-Lif1 chez *S. cerevisiae* (Chen et al., 2001), est chargé sur l'ADN *via* son interaction avec Ku70-80 (Nick McElhinny et al., 2000).

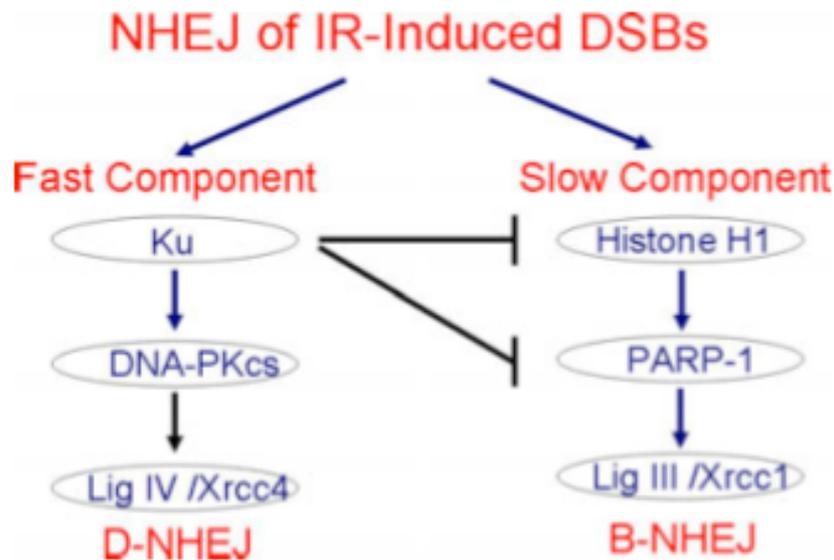


Figure 11 : Mécanismes et régulation du D- et B-NHEJ

(d'après Iliakis, 2009)

Après introduction d'une CDB de l'ADN, celle-ci est normalement réparée par le D-NHEJ, NHEJ classique, mais en absence de Ku, c'est par la voie du B-NHEJ, backup NHEJ, que se fait cette réparation.

Le B-NHEJ, comme le D-NHEJ, est un mécanisme de réparation non fidèle. La CDB est reconnue par la PARP-1 et c'est le complexe LigaseIII/Xrcc1 qui remplit le rôle de ligation.

L'histone H1 a également une fonction dans le B-NHEJ, il agit sur l'activité de PARP-1.

Donc dans des conditions normales, Ku est présent et se lie à la CDB induisant le D-NHEJ et inhibant l'activité de l'histone H1 et de la PARP-1 donc le B-NHEJ.

En l'absence du D-NHEJ, le B-NHEJ n'est pas réprimé et agit alors en système de secours pour réparer la CDB.

L'activité ligase de la Ligase IV dépend de l'association avec son co-facteur Xrcc4 (Grawunder et al., 1998a). Ce complexe de ligation serait phosphorylé par la DNA-PKcs mais les conséquences de cette phosphorylation ne sont pas claires (Mahaney et al., 2009). Il a été de plus caractérisé chez les mammifères, un troisième facteur du complexe de ligation, Xlf (Xrcc4-like factor) (Ahnesorg et al., 2006), qui est nommé Cernunos chez l'Humain (Buck et al., 2006) et Lif2 (Frank-Vaillant and Marcand, 2001) ou Nej1 chez *S. Cerevisiae* (Kegel et al., 2001 ; Valencia et al., 2001). XLF a la même structure que Xrcc4 (Ahnesorg et al., 2006). Il est recruté au site de la CDB par son interaction avec Ku et stimulerait l'activité du complexe Ligase IV-Xrcc4 (Yano et al., 2008; Mahaney et al., 2009).

Chez *Arabidopsis*, Xrcc4 a pu être identifié grâce à son interaction retrouvée avec la Ligase4, en double hybride et en co-immunoprécipitation (West et al., 2000). En revanche, il n'a pas été identifié de Xlf chez *Arabidopsis*.

III.3. NHEJ alternatif ou B-NHEJ

Lorsque le NHEJ dit classique, ou D-NHEJ, est déficient, les CDB de l'ADN sont tout de même réparées. Par exemple dans une lignée cellulaire où des anticorps contre Ku80 ont été introduit, séquestrant ainsi la protéine et empêchant son action (Wang et al., 2003), ou dans une lignée cellulaire dont la Ligase IV n'est pas fonctionnelle (Wang et al., 2001). En absence du D-NHEJ, il existe donc une autre voie de réparation des CDB de l'ADN. La RH pourrait être responsable de cette réparation mais celle-ci est toujours réalisée même chez les doubles mutants NHEJ/RH (Iliakis, 2009). Ces études ont permis de considérer l'existence d'une autre voie de réparation des CDB de l'ADN nommé backup NHEJ ou B-NHEJ (Wang et al., 2003) qui est Ku et LigaseIV indépendante. Le B-NHEJ est une voie alternative de réparation des CDB de l'ADN n'employant pas les acteurs moléculaires du NHEJ traditionnel et considéré comme un mécanisme de réparation non fidèle (Figure 11). Les acteurs de ce mécanisme ne sont pas totalement définis. La Parp-1 reconnaît la CDB de l'ADN et s'y fixe (Audebert et al., 2004). La Parp-1 a une action connue dans la réparation par excision de base et plus largement dans la réparation des cassures simple brin de l'ADN. Il a également été montré que l'histone H1 a une fonction dans le B-NHEJ, il agirait sur l'activité de Parp-1

(Rosidi et al., 2008). Ensuite, l'étape de ligation est effectuée par le complexe Ligase III-Xrcc1 (Wang et al., 2005).

Iliakis et al., ont proposé en 2009 un modèle de régulation des deux voies du NHEJ (Figure 11). Ainsi dans des conditions normales, Ku se lie à la CDB et induit le D-NHEJ en inhibant l'activité de l'histone H1 et de la Parp-1, et donc du B-NHEJ. C'est *via* le D-NHEJ impliquant la DNA-PKcs et le complexe Ligase IV-Xrcc4 que la cassure est réparée. Lorsque ce mécanisme est défaillant, du fait de l'absence d'un composant, d'une enzyme ou d'une structure non conforme de la chromatine, c'est le B-NHEJ qui vient en quelque sorte à la rescousse. Le B-NHEJ est initié par l'inhibition du D-NHEJ. Le D-NHEJ étant réprimé, la DNA-PKcs, impliquée dans cette voie, n'est alors pas phosphorylée et ne peut ainsi pas déplacer l'histone H1 se trouvant au niveau du site de cassure. L'histone H1 agirait sur l'activité de la Parp-1 recrutée à ce stade au niveau de la cassure. Cette dernière est ensuite déplacée pour permettre au complexe Ligase III-Xrcc1 d'agir afin de réparer la cassure par ligation (Iliakis, 2009).

III.4. Le NHEJ dans le système immunitaire chez les vertébrés

Le système immunitaire des vertébrés est dépendant de l'introduction programmée de CDB et de leur réparation. Ce processus permet de créer le répertoire des immunoglobulines et d'assurer la diversité des TCR (récepteurs des cellules T), impliquée dans la reconnaissance de l'antigène, produits respectivement par les lymphocytes B et les lymphocytes T. Le NHEJ est utilisé pour effectuer, après introduction des CDB, la recombinaison V(D)J qui permet de créer une grande diversité de la partie variable des immunoglobulines. En revanche, le NHEJ n'est pas le seul mécanisme de réparation à intervenir pour la commutation de classe des immunoglobulines (Class Switch Recombination ou CSR), le BER et le MMR peuvent également y jouer un rôle (Dudley et al., 2005).

III.5. Rôle de certains acteurs du NHEJ au niveau des télomères

Les télomères sont les extrémités des chromosomes, ils sont constitués de séquences répétées et non codantes et d'une longue extension simple brin. Afin que l'extrémité

télomérique ne soit pas identifiée comme une CDB de l'ADN, elle adopte une structure particulière de repli possible grâce à ses nombreuses séquences répétées. Chez les mammifères cette structure est dite en T-loop (Griffith et al., 1999). De nombreuses protéines sont impliquées dans le repliement et la protection des télomères comme Rap1 (Sc, Hs) et les protéines Sir (Sc) et Trf (Hs) (Moretti et al., 1994 ; Li et al., 2000). Les acteurs du NHEJ jouent un rôle contradictoire dans le maintien des télomères. Le NHEJ serait logiquement néfaste au niveau des télomères puisque l'extrémité du chromosome ne doit pas être reconnue comme une CDB. Ainsi dans une lignée cellulaire de mammifères dont les télomères sont déstabilisés par l'absence d'une de ses protéines de maintien (Trf2), il a été observé une forte fréquence de fusion télomérique qui est diminuée en l'absence de la Ligase IV (Smogorzewska et al., 2002). Ceci indique que ces fusions entre télomères résultent de la prise en charge du télomère comme une CDB qui est réparée par NHEJ.

Pourtant, certains des acteurs de ce mécanisme de réparation de l'ADN sont retrouvés au niveau des télomères et sont mêmes nécessaires à leur structure particulière. C'est le cas de l'hétérodimère Ku (Sc, Hs) et du complexe MRX qui jouent un rôle de protection des extrémités (Bailey et al., 1999). L'absence de Nbs1, lorsque son l'expression génique a été éteinte par ARNi, dans des cellules fibroblastiques humaines conduit à une augmentation de l'incidence des fusions télomériques (Zhang et al., 2005). De même chez *Arabidopsis*, le mutant *mre11* présente, en plus d'un phénotype méiotique, une instabilité chromosomique dans les cellules somatiques résultant de fusions télomériques (Puizina et al., 2004). Enfin une lignée cellulaire de souris KO pour Ku70 et Ku80 présentent également des fusions entre télomères indiquant que l'hétérodimère Ku participe à la protection des télomères (Bailey et al., 1999 ; Riha et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, il a été montré que les fusions télomériques observées en absence de la télomérase (mutant *tert*) ne sont pas dépendantes du NHEJ classique. En effet, en absence de la télomérase et du Ku70 et/ou de la Ligase IV, les fusions télomériques sont toujours présentes (Heacock et al., 2007).

III.6. Rôle de l'un des acteurs du NHEJ dans la signalisation des CDB

Lorsqu'une CDB est créée, l'histone H2AX est phosphorylée autour de cette lésion permettant sa reconnaissance. Ainsi H2AX phosphorylée est reconnue par plusieurs kinases, dont ATM, ATR et la DNA-PKcs qui à leur tour phosphorylent les histones H2AX situé

autour de la cassure, augmentant ainsi la zone de phosphorylation et de ce fait amplifiant le signal de la présence d'une CDB. Les mécanismes de réparation peuvent ainsi commencer leur travail (Hartlerode and Scully, 2009).

III.7. Etude des mutants du NHEJ

Chez la souris, le mutant KO *ligaseIV* est létal (Barnes et al., 1998) et les mutants *xrcc4*, *ku80* et *Artemis* présentent une sensibilité aux irradiations gamma (Stamato et al., 1983); (Nussenzweig et al., 1997). Chez l'homme, la mutation de Artemis provoque une sévère sensibilité aux radiations combinée à une immunodéficiência (SCID) (Moshous et al., 2001). Toujours chez l'homme, la mutation de Cernunnos entraîne des immunodéficiencies et un retard développemental (Buck et al., 2006).

Dans les lignées cellulaires lymphocytaires humaines knockout pour la Ligase IV, la recombinaison V(D)J est totalement abolie (Grawunder et al., 1998b). Il en est de même pour les cellules déficientes pour Ku, Artemis ou la DNA-PKcs (Gu et al., 1997). La radiosensibilité des cellules déficientes pour la DNA-PKcs ou Artemis est significativement plus faible que dans des cellules déficientes pour Ku et Xrcc4. Cette observation est en accord avec le fait que la DNA-PKcs et Artemis sont moins indispensables au mécanisme du NHEJ que Ku et le complexe Ligase IV-Xrcc4 (Gao et al., 1998).

Contrairement aux vertébrés, les plantes déficientes pour le NHEJ ont une croissance normale et sont fertiles. Elles sont cependant sensibles aux agents induisant des CDB dans l'ADN. Le mutant *ku80* a été décrit comme sensible à plusieurs stress génotoxiques : la ménadione, la bléomycine (West et al., 2002), le MMS (van Attikum et al., 2003) et les irradiations gamma (Friesner and Britt, 2003). En revanche, les mutants *ku80* et *ligase IV* ne sont pas sensibles aux UV (Friesner and Britt, 2003). L'absence de la protéine Ku80 réduit fortement l'activité du NHEJ *in vivo*, observé grâce à un système de religation de plasmide (Gallego et al., 2003). L'expression de la Ligase IV est induite par les irradiations gamma, suggérant son rôle dans la réparation des CDB de l'ADN (West et al., 2000). Le mutant *ligase IV* présente également une sensibilité aux irradiations gamma (Friesner and Britt, 2003).

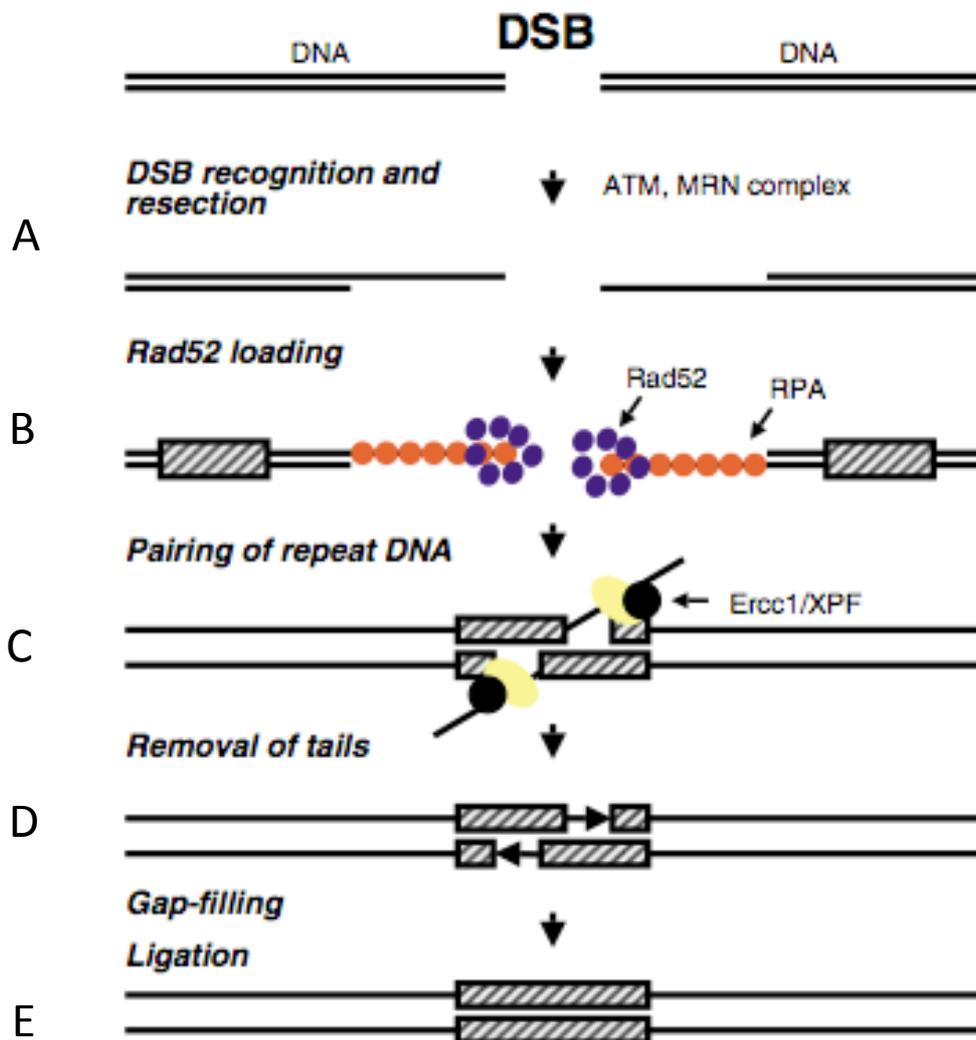


Figure 12 : Le Single Strand Annealing, SSA

(A) La CDB est reconnue, signalée par ATM puis maturée par le complexe MRN pour obtenir des extrémités 3' libres. Ainsi la RH et le SSA utilisent le même substrat de recombinaison. (B) Les protéines Rpa et Rad52 recouvrent les extrémités afin de les protéger des nucléases. (C) Puis ces extrémités sont « scannées » jusqu'à trouver une homologie de séquence. Ces séquences homologues sont appariées et les extrémités non appariées sont clivées par les nucléases Ercc1/Xpf. (D) L'action d'une polymérase et (E) d'une ligase termine la réparation par SSA. (d'après Valérie and Povirk, 2003)

IV. Single Strand Annealing : SSA

IV.1. Principe

La réparation d'une CDB somatique de l'ADN par SSA est effectuée par recherche, alignement et appariement de séquences contenant une homologie (Figure 12). Après appariement des séquences homologues, les extrémités non appariées sont dégradées. Ce mécanisme est donc dit non-conservatif puisqu'il engendre des délétions de quelques à plusieurs centaines de nucléotides.

IV.2. Mécanisme et acteurs

La CDB est tout d'abord maturée par le complexe MRX/N, qui permet de libérer des extrémités d'ADN 3' simple brin. Ces extrémités sont protégées de l'activité des nucléases par Rpa qui se lie aux extrémités 3' simple brin. Rad52 (*Sc*, *Hs*) vient se lier aux extrémités de l'ADN sous forme d'un cercle heptamérique (Mortensen et al., 1996). La fixation de Rad52, sur l'ADN simple brin, favorise l'association entre les deux extrémités d'ADN complémentaires, il y a ensuite recherche et appariement de séquences dites d'homologie, de 29pb à 400pb (Van Dyck et al., 2001). Les extrémités non appariées sont ensuite clivées par le complexe de nucléases XpF/Ercc1 (Adair et al., 2000), Rad1/Rad10 chez la levure (Fishman-Lobell and Haber, 1992 ; Ivanov and Haber, 1995).

Chez *Arabidopsis* le complexe XpF/Ercc1 est présent, les gènes codant ces deux endonucléases ont été identifiés par recherche d'homologie de séquence. Puis l'identification de la fonction de ces protéines a été possible par l'emploi d'un intermédiaire de recombinaison utilisant spécifiquement le SSA pour reconstituer le gène GUS ((Dubest et al., 2002) pour Rad1p et (Dubest et al., 2004a) pour Ercc1).

IV.3. Etude des mutants du SSA

Les souris mutantes pour les gènes *ERCCI* et *XPF* présentent de fortes malformations à la naissance qui entraînent la mort prématurée du souriceau (McWhir et al., 1993 ; Selfridge

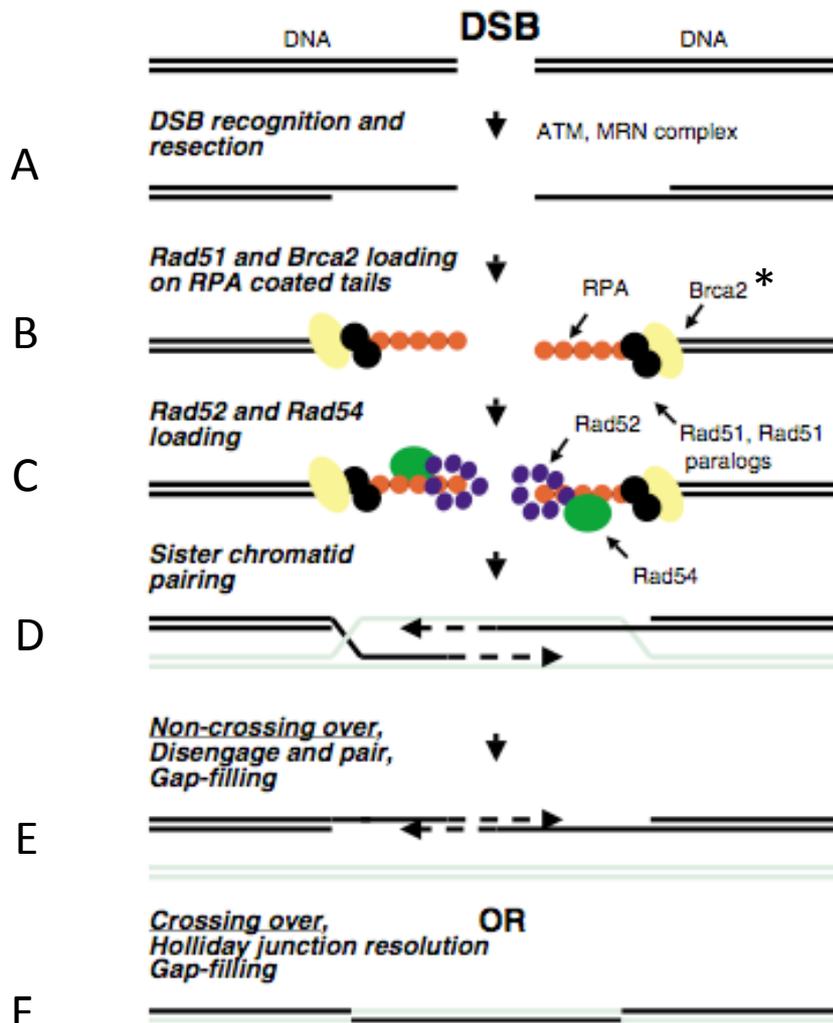


Figure 13 : La recombinaison Homologue (RH)

Lors de la reconnaissance de la CDB de l'ADN, (A) la protéine Mre11 est tout d'abord recrutée au niveau de la CDB. Celle-ci active la kinase ATM qui va phosphoryler l'histone H2AX permettant l'arrivée de NBS1 et donc du complexe MRN, et ce recrutement amplifie le signal de présence de CDB. Le complexe MRN mature la cassure afin d'obtenir des extrémités 3' libres auxquelles se fixe RPA pour les protéger. (B) RPA est ensuite délogée par Rad51 qui se lie à l'ADN au niveau de la cassure. (C) Cette association Rad51/ADN nommé le nucléofilament, est aidé par Brca2, Rad52 et Rad54. (D) Le nucléofilament va rechercher une séquence homologue et la recopier. La RH peut se terminer sans (E) ou avec un crossing over (F), résultant de la résolution des jonctions de Holliday. Enfin une étape de ligation achève la RH. Ce mécanisme de RH ainsi que ces acteurs ont été retrouvés chez *Arabidopsis*. La protéine Brca2 avec un astérisque est codée par deux gènes chez *Arabidopsis* (Brca2 : 2 gènes). (d'après Valérie and Povirk, 2003)

et al., 2001 ; Tian et al., 2004). En revanche, chez *Arabidopsis* le mutant *erccl* est viable (Dubest et al., 2004a). Ce dernier présente une hypersensibilité aux UV (Dubest et al., 2004a), aux irradiations gamma et à la mitomycine C ainsi qu'une légère sensibilité au MMS (Hefner et al., 2003b).

V. Recombinaison homologue

V.1. Principe

La recombinaison homologue (RH) est un mécanisme de réparation des cassures double brin (CDB) de l'ADN qui s'effectue en recopiant une séquence homologue. Il est pour cela qualifié de fidèle. Dans ce processus, comme dans la réparation par SSA, la cassure est d'abord maturée afin d'obtenir des extrémités 3'-OH libres simple brin. Les extrémités sont déplacées pour rechercher et envahir la séquence homologue située sur la chromatide sœur en phase somatique ou sur la chromatide non sœur du chromosome homologue en phase méiotique. Enfin la séquence est recopiée et la cassure est réparée (Figure 13).

V.2. Etapes moléculaire et acteurs

V.2.1. Reconnaissance et maturation de la cassure

Dans cette étape de maturation de la cassure, l'intervention d'autres protéines aidant le complexe MRX/N a été mise en évidence. Ainsi, Sae2, chez la levure (nommé Ctp1 chez l'homme) qui a une activité nucléase, collabore avec le complexe MRX/N pour initier la maturation de la CDB en engageant la dégradation de l'extrémité de l'ADN (Clerici et al., 2005);(Sartori et al., 2007). Puis la nucléase Exo1 (chez la levure) et l'helicase Sgs1 (chez la levure, nommé RecQ chez *E. coli* et Blm chez l'humain) poursuivent cette maturation de la CDB pour permettre d'obtenir des extrémités 3' OH libres, substrat pour la RH (Hickson, 2003 ; Mimitou and Symington, 2008).

L'ADN simple brin est ensuite recouvert par la protéine RPA (replication protein A) afin de protéger l'ADN des dégradations par les nucléases et de la formation de structure secondaires

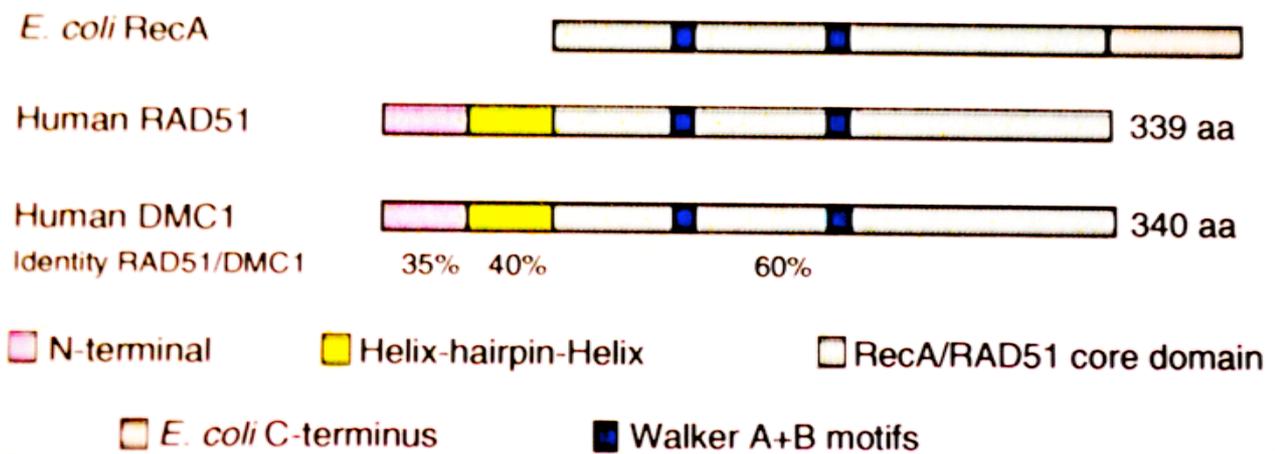


Figure 14 : La famille des recombinases RecA/RAD51

Représentation schématique des protéines RecA chez *E. coli*, Rad51 et Dmc1 humain, montrant les motifs conservés.

(d'après Torslund and West, 2007)

de l'ADN (Fanning et al., 2006) (Figure 13).

V.2.2. Formation du nucléofilament

V.2.2.1. Mécanisme

Après l'action du complexe MRX, la protéine Rpa vient se fixer à l'ADN simple brin pour le protéger de l'action des nucléases. Rpa est ensuite délogé par Brca2 ou Rad52 (*Sc*) pour permettre la fixation d'une ADN recombinase à l'ADN simple brin. L'association recombinase/ADN forme le nucléofilament qui va rechercher la séquence homologue (Pittman et al., 1998a ; Yoshida et al., 1998), l'envahir afin de l'utiliser comme matrice et ainsi réparer la cassure par synthèse d'ADN (Figure 13).

V.2.2.2. Les acteurs moléculaires

V.2.2.2.1. Les recombinases Rad51 et Dmc1, homologues de RecA

Une recombinase a la capacité de pouvoir rechercher une séquence homologue et de catalyser l'échange de brin d'une molécule d'ADN à l'autre. Chez les procaryotes, la recombinase spécifique de la RH est RecA. Chez les eucaryotes, deux homologues de RecA ont été identifiés : *RAD51* qui est exprimée de façon ubiquitaire et *DMC1* qui est spécifique de la méiose (Shinohara et al., 1992 ; Bishop, 1994).

Les recombinases sont très conservées. En effet les protéines Rad51 humaines, de souris et d'*Arabidopsis* présentent autour de 60% d'identité entre elles et 30% avec RecA. La protéine humaine Rad51 contient 339 acides aminés et possède une extension de 100 acides aminés en N-terminale absente chez RecA. Cette région de Rad51 conservée chez les eucaryotes supérieurs est impliquée dans la fixation à l'ADN, dans des interactions protéiques et dans sa régulation (Yuan et al., 1998; Aihara et al., 1999 ; Krejci et al., 2001). Rad51 se compose d'un grand domaine homologue au domaine catalytique de la protéine RecA d'*E.coli* nommé

le cœur (core domain) contenant les domaines Walker motifs A et B étant respectivement le domaine de liaison de l'ATP et son domaine d'hydrolyse (Figure 14). La protéine Rad51 existe sous trois formes dans la cellule. La recombinaise Rad51 est inactive lorsqu'elle est associée à Brca2 ou associée avec elle-même en oligomère, elle est seulement active quand elle est associée à l'ADN sous forme de nucléofilament au niveau des CDB (Yu et al., 2003). En réponse à des traitements provoquant des dommages de l'ADN, des foyers de Rad51 sont formés dans le noyau au niveau de ces dommages indiquant que les CDB effectuées sont réparées par RH (Haaf et al., 1995 ; Scully et al., 1997).

Chez la plupart des organismes, *RAD51* est un gène essentiel puisque sa mutation n'est pas viable, sauf chez la levure et *Arabidopsis* où il existe des mutants pour ce gène. Chez les mammifères, le mutant nul *rad51* de souris est létal à l'état embryonnaire (Lim and Hasty, 1996); (Tsuzuki et al., 1996). Le mutant *rad51* de levure est viable mais présente des défauts méiotiques : les CDB méiotiques ne sont pas réparées (Shinohara et al., 1992). Chez *Arabidopsis*, le mutant *rad51* est viable, il a un développement normal mais est stérile (Li et al., 2004). Cependant, le mutant *rad51* présente une sensibilité à certains stress génotoxiques, la Mitomycine et la bléomycine (Markmann-Mulisch et al., 2007). Sa stérilité est causée par une fragmentation chromosomique en méiose dès la fin de prophase (Li et al., 2004).

En méiose, Rad51 colocalise avec Dmc1 au niveau des sites de CDB de l'ADN en méiose suggérant que lors de la méiose, les deux recombinaises Rad51 et Dmc1 sont utilisées (Bishop, 1994) (Figure 14). Dmc1 est également homologue à RecA et présente 45 à 50% d'identité avec Rad51. Dmc1 contient également le domaine coeur composé des motifs Walker A et B, comme pour Rad51 et recA. Si Dmc1 est retrouvé chez la plupart des espèces en revanche il n'a pas été identifié chez *U. maydis*, *D. melanogaster* et *C. elegans* (chez ces organismes, la formation de la synapse entre chromosomes homologues est indépendante de l'introduction de CDB par Spo11).

Les mutations de *DMCI* n'affectent pas la viabilité mais présentent des effets variables sur la méiose selon les organismes. Le mutant *dmc1* de souris est viable avec un développement normal mais il s'avère stérile du fait de défauts chromosomiques lors de la recombinaison méiotique, les chromosomes restent en univalents et dans de rares cas, il y a un appariement observé entre chromosomes non homologues (Yoshida et al., 1998). Chez la levure, la mutation de *DMCI* entraîne une absence de réparation des CDB méiotique et un défaut dans

la formation du complexe synaptonémal (Bishop et al., 1992). Chez *Arabidopsis*, le mutant *dmc1* est viable et stérile, il n'y a pas de formation des bivalents, les chromosomes restent à l'état d'univalents ce qui entraîne leur ségrégation de manière aléatoire (Couteau et al., 1999a).

Ainsi lors de la RH, dans les cellules somatiques, Rad51 permet la réparation de la CDB de l'ADN en recopiant la séquence homologue située sur la chromatide sœur alors qu'en méiose, Dmc1 va permettre de rechercher la séquence à recopier sur le chromosome homologue, aidé par les protéines Hop2 et Mnd1 (Masson and West, 2001 ; Tsubouchi and Roeder, 2002 ; Petukhova et al., 2005).

V.2.2.2.2. Les médiateurs de Rad51

Lors de l'introduction de CDB induites par des stress génotoxiques, des foyers Rad51 sont observés au niveau de ces cassures. D'autres protéines composent également ces foyers : Rad52 (Liu and Maizels, 2000), Rad54 (Tan et al., 1999 ; Essers et al., 2002), RPA (Raderschall et al., 1999) et Brca1 (Scully et al., 1997) et Brca2 (Chen et al., 1998a ; Chen et al., 1999). Ces protéines aident à la localisation et au positionnement de Rad51 pour la formation du nucléofilament, elles sont appelées des médiateurs de Rad51.

Rpa

Rpa (Replication Protein A) est une protéine hétérotrimérique composée de trois sous-unités de 70, 30 et 14 kDa. Elle a une forte affinité pour l'ADN simple brin et s'y fixe donc lors de différents processus cellulaires tels que la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN. Ainsi, Rpa et Rad51 entrent en compétition pour la liaison à l'ADN simple brin mais Rpa ayant une plus forte affinité que Rad51, elle s'y fixe la première.

Les médiateurs de Rad51 chez la levure :

Chez la levure, la compétition entre Rpa et Rad51 est levée par l'arrivée des autres médiateurs de Rad51 : Rad52 et Rad55/Rad57 (Sung, 1997).

Rad52 s'organise sous la forme d'un anneau composé de huit monomères qui interagit préférentiellement avec l'ADN simple brin. L'intervention de Rad52 peut entraîner la réparation de la CDB par SSA ou RH, c'est la présence de Rad51 qui fera pencher la balance en faveur de la RH. Rad52 favorise le déplacement de Rpa et facilite ainsi le chargement de Rad51 pour la RH. Sans son action, Rad51 n'est pas capable de former le nucléofilament (Shen et al., 1996; New et al., 1998). La mutation de *RAD52* entraîne un défaut de la RH et une sensibilité aux stress génotoxiques (Krejci et al., 2002).

Les protéines Rad55 et Rad57 de levure forment un hétérodimère stable qui peut se lier à l'ADN simple brin et permettre la fixation et la stabilisation de Rad51 sur l'ADN simple brin *via* l'interaction entre Rad55 et Rad51 (Hays et al., 1995).

Rad54 appartient à la famille des protéines de remodelage de la chromatine (SWI/SNF2). Ces protéines de remodelage ont une activité ATPase qui permet de dissocier la structure du nucléosome, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et de rendre ainsi l'ADN accessible. Rad54 permet par son interaction avec Rad51 de stabiliser l'interaction entre Rad51 et l'ADN simple brin (Mazin et al., 2003), puis dans un second temps de faciliter l'invasion de brin et la recherche d'homologie en libérant l'ADN matrice des protéines associées à l'ADN (histones) (Jaskelioff et al., 2003). Enfin, il a été observé chez le mutant *rad54*, après irradiation, que les foyers Rad51 formés après la CDB persistent. Ceci indique que Rad54 intervient aussi dans le déplacement de Rad51 de l'ADN après l'invasion de brin pour le désassemblage du nucléofilament (Solinger et al., 2002).

Les médiateurs de Rad51 chez les eucaryotes supérieurs :

Chez les vertébrés, des homologues des médiateurs de la RH décrits chez la levure ont été trouvés.

Rad52 forme chez l'homme, comme chez la levure, un anneau de huit sous-unité qui se fixe à l'ADN simple-brin et interagit avec Rpa et Rad51 (Sugiyama et al., 1998). Chez les vertébrés, la mutation de *RAD52* n'entraîne pas de phénotype sévère en effet le mutant chez la souris est viable (Rijkers et al., 1998). Enfin, il n'a pas été identifié de *RAD52* chez *Arabidopsis*.

Chez l'homme, il y a cinq homologues de *RAD51* nommé les *RAD51-like*. *XRCC2* et *XRCC3* ont été trouvés par complémentation de lignées cellulaires de hamster présentant une sensibilité à des stress génotoxiques (Liu et al., 1998). *Xrcc3* a été identifié comme l'homologue de *Rad57* de levure (Tsutsui et al., 2000). *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* ont été identifiés sur la base de leur homologie de séquence avec *Rad51* (Albala et al., 1997 ; Dosanjh et al., 1998 ; Pittman et al., 1998b). Ces protéines interagissent entre elles en deux complexes tels que, *Rad51C* avec *Xrcc3* et *Rad51B* avec *Rad51C*, *Rad51D* et *Xrcc2* (Schild et al., 2000). *Xrcc3* interagit aussi avec *Rad51*, ce qui lierait ainsi *Rad51* à ces paralogues (Liu et al., 1998 ; Schild et al., 2000).

Les mutations dans chacun des cinq paralogues de *Rad51* dans la lignée cellulaire DT40 de poulet entraînent une diminution de la RH avec un retard dans la formation des foyers *Rad51* après irradiations gamma ainsi qu'une sensibilité à différents stress génotoxiques (mitomycine C, cisplatine et irradiation gamma) (Takata et al., 2001). Chez ces mutants, une surexpression de *Rad51* permet de rétablir la résistance aux agents génotoxiques suggérant que les *Rad51-like* participent à la réparation par RH en facilitant l'action de *Rad51* (Takata et al., 2001). Le complexe *Rad51B-Rad51C* permettrait de favoriser la mise en place de *Rad51* sur l'ADN simple brin lorsque celui-ci est déjà décoré de *Rpa* (Sigurdsson et al., 2001).

Chez la souris, les mutations nulles *RAD51B*, *RAD51D*, *XRCC2* et *RAD51C* entraînent une létalité embryonnaire suggérant l'importance de ces protéines dans la RH (Shu et al., 1999 ; Deans et al., 2000 ; Pittman and Schimenti, 2000 ; Liu et al., 2004 ; Sharan and Kuznetsov, 2007 ; Kuznetsov et al., 2009). Seule l'effet de la mutation de *XRCC3* n'a pas encore été étudié (Kuznetsov et al., 2009).

Chez *Arabidopsis*, les cinq *RAD51-like* sont présents et les mutants de chacun de ces paralogues sont viables et sont hypersensible à la Mitomycine C mais pas aux irradiations gamma (Bleuyard et al., 2005). Seuls *XRCC3* et *RAD51C* sont essentiels à la méiose puisque les mutants *xrcc3* et *rad51C* sont stériles. Le mutant *xrcc3* présente une fragmentation chromosomique dès la fin du pachytène, phénotype similaire au mutant *rad51* et le mutant *rad51C* présente des ponts chromosomiques aboutissant à de la fragmentation (Bleuyard and White, 2004 ; Abe et al., 2005; Bleuyard et al., 2005). Pourtant, malgré l'intervention de ces deux paralogues en méiose, il n'a pas été montré d'interaction entre eux et *Dmc1* (Siaud N.,

communication personnelle).

Enfin, *BRCA2*, pour Breast Cancer 2 a été identifiés, avec *BRCA1*, comme un gène dont les mutations prédisposent les individus au cancer du sein et de l’ovaire (Wooster et al., 1995b). Approximativement, 5 à 10% des individus qui développent un cancer du sein sont génétiquement prédisposés à cette maladie et 10 à 30% de ces cancers sont attribués à une mutation dans le gène *BRCA2* dit suppresseur de tumeur. Le gène *BRCA2* a été identifié en 1995 (Wooster et al., 1995b) et son implication dans la maintenance de la stabilité du génome a été mise en évidence par le fait qu’il interagit avec Rad51, la recombinaise spécifique de la RH (Sharan et al., 1997b). Le gène *BRCA2* étant au centre du travail de ma thèse, je lui consacre par la suite un paragraphe afin de définir et d’approfondir ses caractéristiques (cf paragraphe V.3).

V.2.2.2.3. Les médiateurs de Dmc1 en méiose

Les protéines Hop2 et Mnd1 forment un complexe hétérodimérique, ces deux protéines coimmunoprécipitent dans des extraits cellulaires méiotiques chez *S. cerevisiae* (Tsubouchi and Roeder, 2002 ; Enomoto et al., 2006 ; Kerzendorfer et al., 2006). Chez *S. cerevisiae*, les mutants *hop2* et *mnd1* présentent un phénotype méiotique similaire au mutant *dmc1* qui aboutit à l’arrêt de la méiose en première division (Shinohara and Shinohara, 2004). Il a été montré, chez la levure et les mammifères, que la mutation de *HOP2* entraîne une formation anarchique du complexe synaptonémal qui se forme entre chromosomes non homologues (Leu et al., 1998; Petukhova et al., 2003). Chez la levure, la surexpression de *RAD51* chez ces mutants *hop2* ou *mnd1* restaure un phénotype méiotique sauvage (Tsubouchi and Roeder, 2002). Des expériences *in vitro* montrent ainsi que l’invasion de brin effectuée par Rad51 et Dmc1 est stimulée par l’interaction avec Hop2/Mnd1 (Petukhova et al., 2005).

Les homologues de *HOP2* et *MND1* ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Ils sont également requis pour la réparation des CDB en méiose et les mutants présentent un défaut d’appariement des homologues et une fragmentation (Schommer et al., 2003 ; Domenichini et al., 2006 ; Kerzendorfer et al., 2006 ; Panoli et al., 2006). De plus, l’étude de Domenichini *et al.* en 2006, a montré une sensibilité aux irradiations gamma du mutant *mnd1* indiquant un rôle de Mnd1 également en phase somatique.

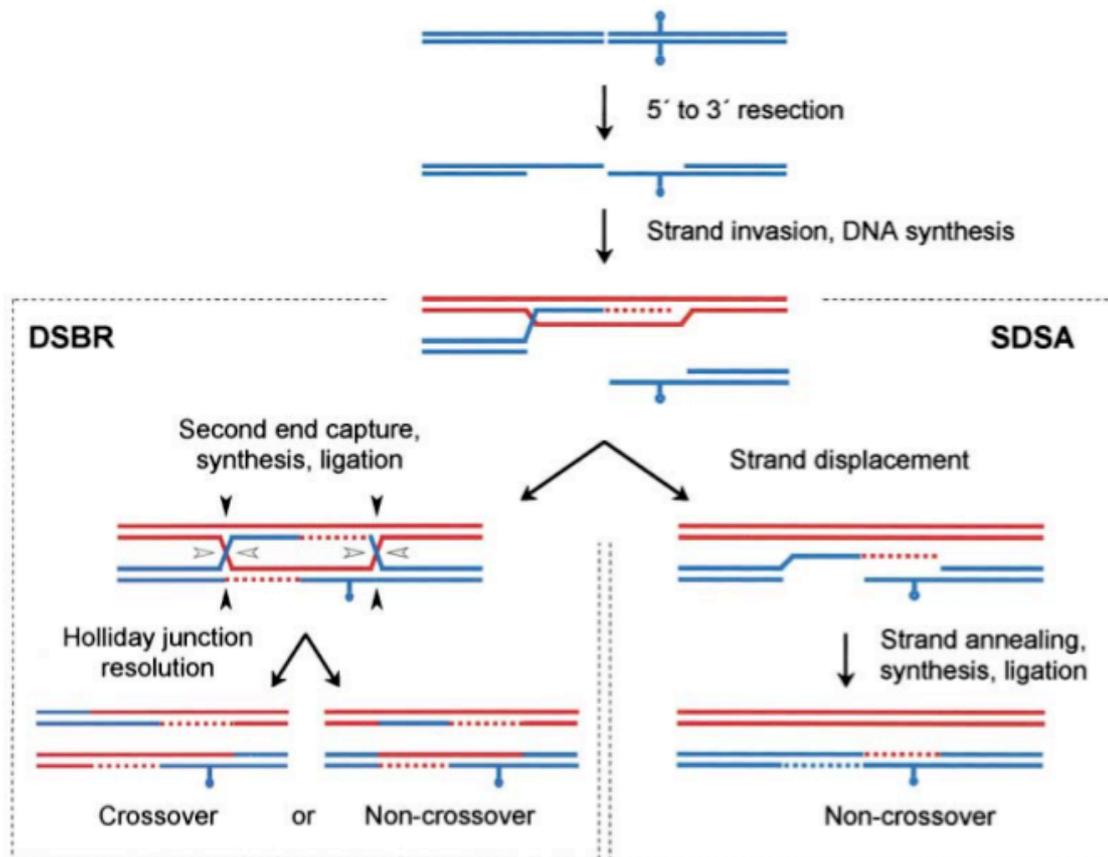


Figure 15 : Modèle de recombinaison par Double Strand Breack Repair (DSBR) ou par Sybthesis-dependant strand annealing (SDSA)

Selon le modèle de DSBR, les crossing-overs et les non crossing-overs sont générés à partir d'un même intermédiaire contenant une double jonction de Holliday. La résolution des jonctions peut se faire dans deux sens, le sens vertical représenté par des flèches noires et le sens horizontal représenté par des flèches grises. Si les jonctions sont résolues dans deux sens contraires, la réparation de la cassure double brin génère un crossing-over. Si les jonctions sont résolues dans le même sens, la réparation génère un non crossing-over.

Selon le modèle de SDSA, les non crossing-overs sont générés sans qu'il y ait formation d'une molécule jointe stable. Après l'invasion de brin et la synthèse d'ADN, le brin envahissant se dissocie de la molécule d'ADN envahie. La réparation est terminée de chaque coté en utilisant l'autre extrémité simple brin comme matrice.

(d'après Allers and Lichten, 2001)

V.2.3. Réparation et résolution des jonctions de Holliday

L'invasion de brin induit la formation d'hétéroduplex d'ADN nommé D-loop, dont l'extrémité 3' est polymérisée. En phase somatique, après la synthèse d'ADN à partir de la séquence homologue, le brin envahissant est simplement repoussé, c'est le modèle SDSA (synthesis-dependant annealing). Puis une étape de ligation termine la réparation de la CDB (Figure 15).

En méiose, la structure d'hétéroduplex d'ADN formerait des structures appelées les jonctions de Holliday (Holliday, 1964). Selon le modèle de Szostak (Szostak et al., 1983), la résolution des jonctions de Holliday dans des sens opposés ou dans le même sens détermine respectivement la formation ou non de crossing over (CO) et la conversion génique simple. Selon une autre étude, les CO seraient engendrés par la résolution de jonction de Holliday par DSBR (Double Strand Break Repair) alors que les non CO seraient induits par le SDSA (Allers and Lichten, 2001).

Il existe deux classes de crossing-over (CO), les CO de classe I qui sont interférents, c'est-à-dire qu'ils inhibent la formation de CO à proximité, et les CO de classe II, non interférents. Dans la formation de CO de classe I, interviennent un groupe de protéine nommé ZMM (Zip1-4, Msh4-5, Mer3, chez la levure et chez *Arabidopsis*) ainsi que la protéine Mlh1, chez la levure et chez *Arabidopsis* et Mlh3, chez la levure uniquement (Wang et al., 1999; Muyt et al., 2009). Certaines de ces protéines sont les acteurs de la réparation par MMR des cassures simple brin (Lynn et al., 2007).

V.3. Brca2

V.3.1. Acteur de la RH

Brca2 a été relié à la RH grâce à son interaction montrée avec la recombinase spécifique de la RH, Rad51. L'interaction directe entre Brca2 et Rad51 a été observée en premier chez la souris en 1997 grâce à un test double hybride (Sharan et al., 1997b). Dans ce test, il a été montré que les interactions impliqueraient d'une part la région C-terminale de

Brca2 (de 100 acides aminés) et d'autre part la région N-terminale de Rad51. L'interaction entre Brca2 et Rad51 a ensuite été confirmée par co-immunoprécipitation dans une lignée cellulaire humaine (Chen et al., 1998b ; Marmorstein et al., 1998). Rad51 et Brca2 co-localisent dans le noyau en foyers dans les cellules somatiques après irradiations gamma (Tarsounas et al., 2004). Cette formation de foyers Rad51 après dommages de l'ADN a été montrée comme dépendante de la présence de protéine fonctionnelle Brca2 (Sharan et al., 1997b ; Yuan et al., 1999). Davies et al. en 2001, ont montré qu'en absence de Brca2, Rad51 était localisé uniquement dans le cytoplasme, alors qu'en présence de Brca2, Rad51 est localisé principalement dans le noyau (Davies et al., 2001). Cette participation de Brca2 au transport de Rad51 au niveau nucléaire a été consolidée par Lee *et al.* en 2009. Cette étude montre que la déficience de la RH, dans une lignée cellulaire murine déficiente pour Brca2, est restaurée par la surexpression nucléaire de Rad51 (Lee et al., 2009). Brca2 participe donc au transport de Rad51 vers le noyau et ainsi vers les sites de CDB de l'ADN. De plus, Davies *et al.*, ont également montré par microscopie électronique que Brca2 est requis pour la formation du nucléofilament de Rad51 sur l'ADN simple brin au niveau des CDB (Davies et al., 2001).

Ce rôle de Brca2 dans la RH est cohérent avec le fait que les lignées cellulaires de souris contenant des allèles tronqués de *BRCA2* sont très sensibles aux stress génotoxiques (Sharan et al., 1997b ; Patel et al., 1998) et présentent une accumulation d'aberrations chromosomiques (Patel et al., 1998).

L'interaction entre Brca2 et Dmc1 a été identifiée pour la première fois chez *Arabidopsis* par un test double hybride par Siaud *et al.*, 2004. De plus, les plantes dont l'expression génique de *BRCA2* a été inactivée par ARN interférence lors de la méiose présentent une stérilité résultant de défauts chromosomiques méiotiques. L'interaction entre ces deux protéines ainsi que le phénotype méiotique observé en absence de Brca2 ont permis de relier Brca2 à la méiose lors de la réparation par RH des CDB engendrées par Spo11 (Siaud et al., 2004). Plus récemment, cette interaction entre Brca2 et Dmc1 a également été retrouvée chez l'humain (Thorslund et al., 2007).

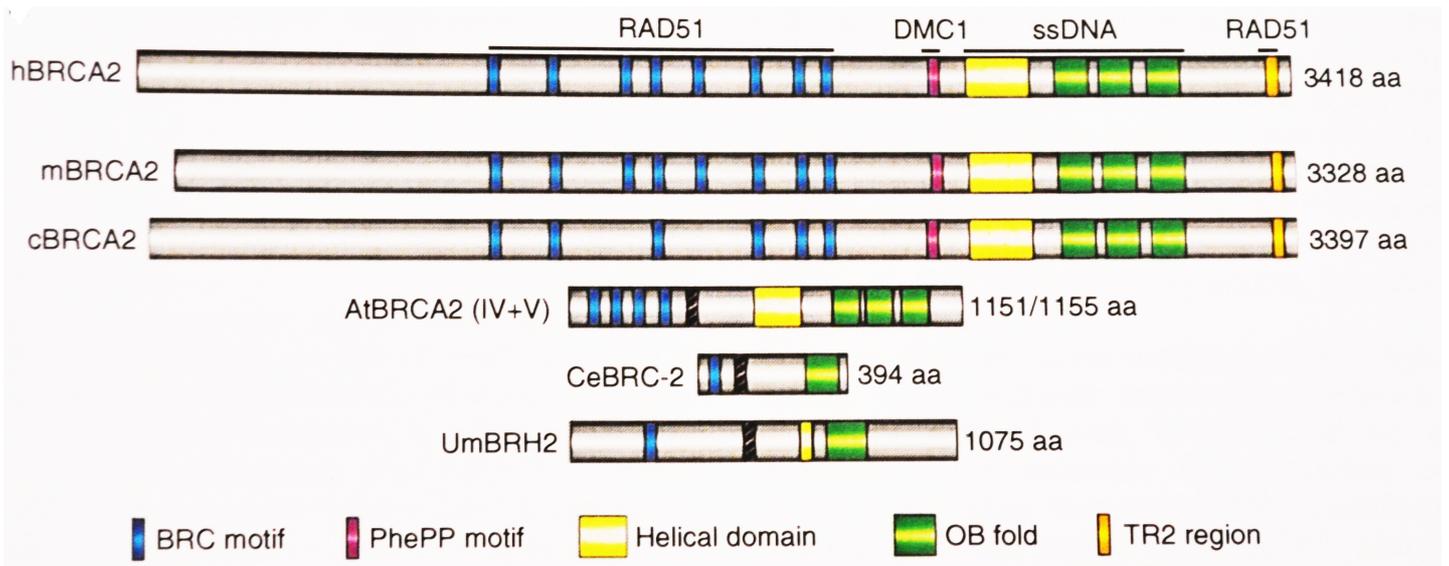


Figure 16: Les protéines Brca2 à travers les espèces

Représentation schématique des protéines Brca2 de l'humain (hBrca2), la souris (mBrca2), le poulet (cBrca2), *A. thaliana* (AtBrca2), *C. elegans* (CeBRC-2), et *U. maydis* (UmBRH2). Les différents domaines sont indiqués et soumis à un code couleur, le domaine hachuré chez AtBrca2, CeBRC-2 et UmBRH2 montre les motifs divergents de PhePP.

(d'après Thorslund and West, 2007)

V.3.1.2. Brca2 : conservée chez la plupart des espèces

Brca2 est une protéine conservée et ses principaux domaines sont retrouvés entre les espèces (Figure 16). Le gène *BRCA2* a été identifié chez *Ustilago maydis* (*UmBRH2*) (Kojic et al., 2002b), le nématode *Caenorhabditis elegans* (*CeBRC-2*) (Martin et al., 2005a), la plante *Arabidopsis thaliana* (*AtBRCA2*) (Siaud et al., 2004) et chez les vertébrés comme le poulet (*cBRCA2*) (Takata et al., 2002) et l'humain (Yang et al., 2002). En revanche il n'a pas été retrouvé de Brca2 chez la levure (*Sc*), et c'est Rad52 qui amènerait Rad51 au niveau de la CDB (San Filippo et al., 2008a).

Chez l'Homme, la protéine Brca2 est de grande taille, elle contient 3418 acides aminés. Elle n'a été que récemment purifiée dans son intégralité (Jensen et al., 2010b ; Liu et al., 2010b ; Thorslund et al., 2010a). Les protéines Brca2 de *Ustilago maydis* (*U. maydis*) et d'*Arabidopsis* par exemple sont plus petites et sont donc plus facilement étudiables. Chez *U. maydis*, Brh2 comporte 1075 acides aminés. Chez *Arabidopsis*, il existe deux gènes *BRCA2*, localisés sur le chromosome IV, pour *BRCA2a* et sur le chromosome V pour *BRCA2b* (Siaud et al., 2004). Les deux séquences présentent 96,8% d'identité. Cette forte identité est probablement le résultat d'une duplication récente dans le génome d'*Arabidopsis* dont *BRCA2b* serait l'original. En effet, *BRCA2a* contient une séquence supplémentaire de 450pb insérée dans l'intron 13. Les gènes *BRCA2a* (At4g00020/10) et *BRCA2b* (At5g01630) sont constituées respectivement de 6258 et 5795 nucléotides qui produisent des protéines de 1151 et 1155 acides aminés respectivement. Les deux protéines d'*Arabidopsis* sont identiques à 94,5% et sont dites redondantes au niveau méiotique. En effet, pour obtenir un phénotype de stérilité résultant de l'absence de Brca2, il faut éteindre l'expression simultanée des deux gènes *BRCA2* (Siaud et al., 2004).

V.3.1.3. Interactions et structure de Brca2

Interaction avec Rad51

La région conservée N-terminale contient des domaines qui sont spécifiques à la protéine Brca2 : les motifs BRC. Ces motifs sont constitués d'environ 20 acides aminés chacun conservés. Si leur structure est conservée en revanche le nombre de ces domaines diffère

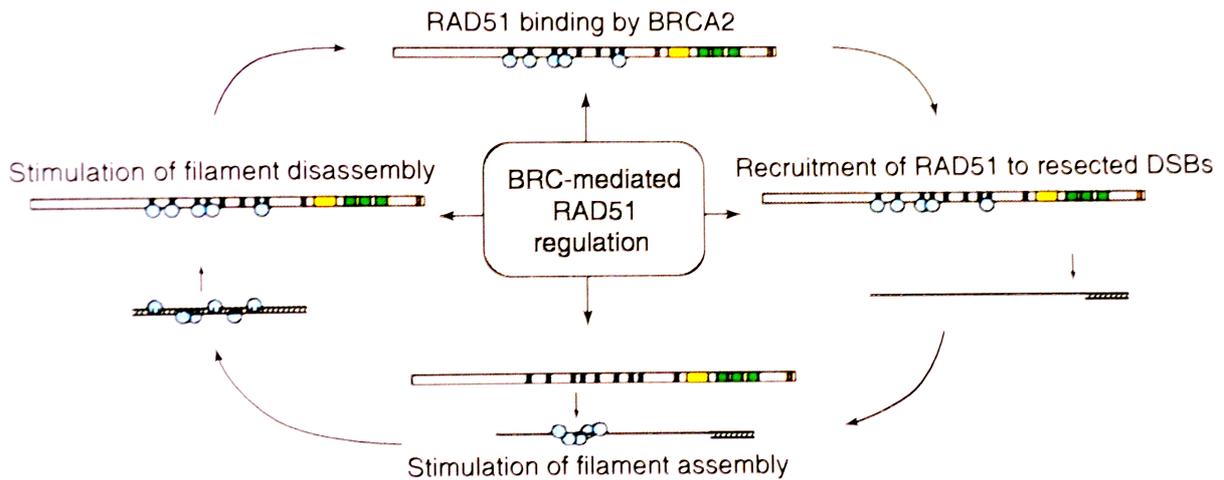


Figure 17 : Les motifs BRC de Brca2 et la régulation de Rad51.

Les monomères de Rad51 se lient aux motifs BRC de Brca2 permettant sa séquestration et donc son inactivation en absence de dommages de l’ADN. Lors d’une CDB de l’ADN, le complexe Brca2/ Rad51 se localise au niveau du dommage grâce au domaine de liaison à l’ADN simple brin de Brca2. Les protéine Rad51 liées aux motifs BRC se polymérisent au niveau de l’ADN formant ainsi le nucléofilament. Après l’invasion de brin, le nucléofilament est désassemblé et Rad51 se lie aux motifs BRC de Brca2.

Les différents motifs sont légendés comme dans la Figure 16 (d’après Thorslund and West, 2007)

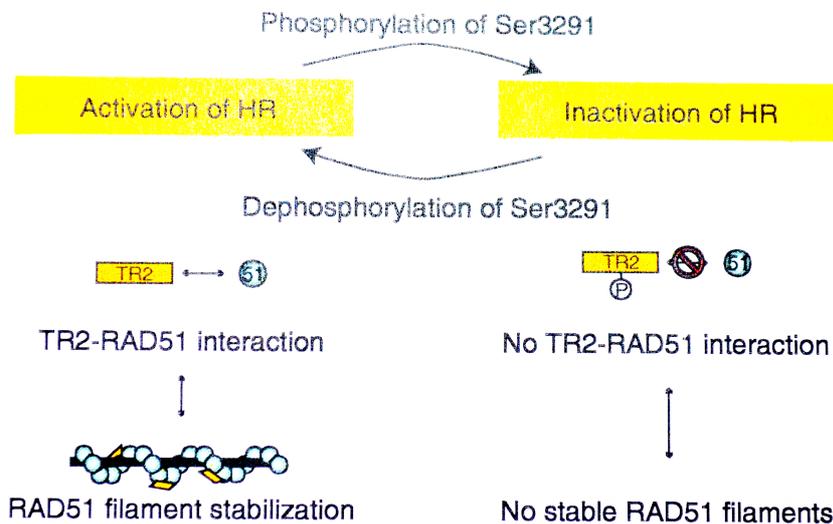


Figure 18 : Stabilisation du filament de Rad51 par le domaine C-terminal de Brca2.

Lors de la phase S ou en début de phase G2 du cycle cellulaire, ou après un dommage fait à l’ADN, le domaine TR2 de Brca2, non phosphorylé au niveau de la serine 3291, est capable d’interagir avec Rad51. L’interaction entre Rad51 et le domaine TR2 stabilise le nucléofilament, ainsi la RH est active pour réparer les CDB résultant des erreurs produites lors de la réplication ou par des stress génotoxiques. A l’approche de la mitose, la serine 3291 de TR2 est phosphorylée, l’interaction entre Brca2 et Rad51 n’est plus possible au niveau de ce domaine, le filament de Rad51 est donc instable, régulant ainsi négativement la RH.

(d’après Thorslund and West, 2007)

selon les espèces (Bork et al., 1996 ; Wong et al., 1997a ; Chen et al., 1998b). La protéine Brca2 humaine comporte huit motifs BRC, il y en a six chez le poulet, quatre chez *Arabidopsis* et seulement un chez *U. maydis* et *C. elegans*. C'est par ces motifs qu'à lieu l'interaction de Brca2 avec Rad51, interaction qui est essentielle pour le bon déroulement de la RH (Figure 16).

Des tests d'interaction en double hybride ont été réalisés pour trouver quels étaient les motifs BRC de Brca2 qui sont nécessaires à l'interaction avec Rad51. Tous les motifs BRC ne sont pas égaux en ce qui concerne l'interaction entre Brca2 et Rad51 et donc dans la régulation de ce dernier. Chez l'homme, il a été montré par exemple que les motifs BRC de 1 à 4 sont indispensables à l'interaction avec Rad51 (Chen et al., 1998b ; Thorslund and West, 2007).

Les monomères de Rad51 se lieraient aux motifs BRC de Brca2 et seraient ainsi séquestrés en absence de dommage de l'ADN. Lorsqu'une CDB est engendrée, le complexe Brca2-Rad51 se relocalise au niveau du dommage grâce au domaine de liaison à l'ADN simple brin. Les protéines Rad51 ainsi amenées au niveau de la cassure se polymérisent sur l'ADN pour former le nucléofilament. Après l'invasion de brin, le nucléofilament est désassemblé, les protéines Rad51 se lient de nouveau à Brca2 (Figure 17).

Avant que ne soit identifié l'interaction entre Rad51 et Brca2 au niveau des motifs BRC, Rad51 avait été montré comme interagissant avec le domaine C-terminal de Brca2 chez la souris (Sharan et al., 1997b). Ce domaine a ensuite été nommé TR2 (Galkin et al., 2005). TR2, présent dans la région codée par l'exon 27, est conservé chez les vertébrés mais n'est pas retrouvé chez les autres espèces. L'interaction entre les deux protéines au niveau du domaine TR2 aurait un rôle de régulation dans la RH (Figure 18). Par un jeu de phosphorylation (par les kinases cyclines dépendantes) et déphosphorylation de la sérine 3291 du domaine TR2 de Brca2, la RH serait activée ou inhibée respectivement. La déphosphorylation de la sérine 3291 du domaine TR2 de Brca2 permettrait son interaction avec Rad51 et la stabilisation du nucléofilament et est donc associée à l'activation de la RH. Ceci est le cas, par exemple, en phase S et début de phase G2 ou en réponse à un stress exogène, comme les irradiations, ayant causés des dommages à l'ADN (Esashi et al., 2005 ; Thorslund and West, 2007). La forme phosphorylée de la ser3291 du domaine TR2 de Brca2 empêcherait en revanche son interaction avec Rad51 et est donc associée à une inhibition de la RH (Thorslund and West, 2007). Cependant il a été montré qu'en méiose, ce motif TR2 n'était pas requis pour la stabilisation de Rad51 donc pour le bon déroulement de la RH, chez la souris (McAllister et

al., 2002 ; Atanassov et al., 2005). D'autres facteurs interviennent peut être dans la stabilisation du nucléofilament en méiose ou c'est peut être la présence de Dmc1 qui stabiliserait Rad51.

Interaction avec Dmc1

L'interaction entre Brca2 et Dmc1 a été mise en évidence chez *Arabidopsis* par Siaud *et al.* en 2004 en utilisant un test double hybride. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation toujours chez *Arabidopsis* et il a été montré qu'elle s'effectuait *via* les motifs BRC de Brca2 (Dray et al., 2006). Ces deux études montrent que le motif BRC-4 permettrait plus particulièrement l'interaction entre Brca2 et Rad51, alors que le motif BRC-2 serait responsable de l'interaction entre Brca2 et Dmc1. Cette interaction entre Brca2 et Dmc1, recombinaise spécifique de la méiose, a permis de suggérer un rôle de Brca2 en méiose.

L'interaction entre Brca2 et Dmc1 découverte chez *Arabidopsis* a également été retrouvée chez l'humain (Thorslund et al., 2007). Cependant, il apparaît que l'interaction, chez l'humain, ne s'effectue pas au niveau des motifs BRC mais par un site spécifique de Brca2 nommé le motif PhePP (Figure 16). Ce motif est conservé chez les vertébrés puisqu'il a également été retrouvé chez la souris et le poulet. Ce motif est absent chez *Arabidopsis*, *U. maydis* et *C. elegans* mais quelques acides aminés contenus dans ce motif sont conservés et formeraient un motif dégénéré chez ces organismes. Cette observation peut être corrélée avec l'absence de Dmc1 chez *U. maydis* et *C. elegans*. Il a été montré chez *C. elegans* que c'est Rad51 qui interagit avec le domaine dégénéré de PhePP et cette interaction joue un rôle important dans la stabilisation du nucléofilament (Petalcorin et al., 2007).

Interaction avec l'ADN et avec Dss1

La partie C-terminal de Brca2 est conservée, elle contient la région de liaison à l'ADN simple brin nommée DBD (binding domain) composé d'un domaine HD (helical domain) constitué d'hélices et de trois domaines OB (OB1, OB2, OB3 pour Oligonucleotide Binding) (Figure 16). Les trois domaines OB ont une structure caractéristique des protéines de fixation à

l'ADN simple brin (comme la protéine Rpa). Ainsi *via* ces domaines, Brca2 entrerait en compétition avec Rpa, fixé sur l'ADN simple brin au niveau des CDB. Cette compétition permettrait le déplacement de Rpa afin de faciliter la mise en place de Rad51 pour former le nucléofilament (Shivji and Venkitaraman, 2004).

Dss1 a été identifiée, par test double hybride, comme interagissant avec l'extrémité C-terminale de la protéine Brca2 humaine (Marston et al., 1999). Dss1 est une petite protéine de 70 acides aminés qui interagit avec les domaines OB1 et HD de Brca2. Cette interaction est nécessaire pour la stabilité de Brca2 (Yang et al., 2002). Dss1 a été décrit en 1996 comme un des gènes potentiellement responsable du syndrome Split Hand/Split Foot chez l'Homme (Crackower et al., 1996), une maladie dont les symptômes morphologiques ne semblent pas être en lien direct avec la recombinaison homologue. Le lien entre Dss1 et la RH et donc la stabilité génétique a été trouvé lors d'une étude sur le champignon *U. maydis*, chez lequel il a été montré que l'homologue de Dss1 interagit avec l'homologue de Brca2, nommé Brh2 (Kojic et al., 2003). Cette étude montre que le mutant *dss1* d'*U. maydis* est sensible aux radiations ionisantes et présente des remaniements chromosomiques, phénotype retrouvé chez les mutant de la RH. Dans les cellules humaines, il a également été prouvé que l'absence de Dss1 affecte la prolifération cellulaire et entraîne la formation d'aberrations chromosomiques après exposition à des stress génotoxiques, de la même manière que dans les cellules où *BRCA2* est muté. De plus, en absence de Dss1, la formation des foyers Rad51 n'est pas observée indiquant l'importance de Dss1 dans la localisation de Rad51 au niveau des CDB *via* Brca2 (Gudmundsdottir et al., 2004).

La présence de Dss1 chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, alors que Brca2 est absent chez la levure, indique que Dss1 a également un rôle indépendant de Brca2, il aurait un rôle dans la différenciation cellulaire (Jantti et al., 1999).

V.3.1.4. Rôle de Brca2 autre que dans la RH

Rôle dans la prolifération cellulaire

Le rôle de Brca2 dans la prolifération cellulaire a été montré par différentes études.

Une première étude montre que l'embryon mutant *brca2* de souris ne survit pas au delà de 9,5 jours et présente de sévères défauts de développement caractérisés par un retard de croissance, une absence de gastrulation et une augmentation de l'expression d'un inhibiteur de CDK (p21), sans augmentation de l'apoptose (Suzuki et al., 1997). Une autre étude effectuée dans une lignée cellulaire fibroblastique d'embryon de souris comportant un gène *Brca2* tronqué, ne contenant que les 3 premiers motifs BRC, montre que le cycle cellulaire n'est pas arrêté lors de la première génération. En revanche, au cours des générations cellulaires suivantes, des cellules en G2/M s'accumulent, elles présentent des anomalies de polyploïdie reflétant des aberrations de séparation des chromosomes en mitose. Ce défaut d'entrée en phase S est associé à une augmentation de l'expression de p53 et p21 qui est ainsi responsables du blocage au niveau des checkpoint (Patel et al., 1998). Enfin, une autre étude effectuée sur une lignée cellulaire humaine soumise aux irradiations gamma, a permis de montrer que la disruption de l'interaction entre *Brca2* et *Rad51* entraînait la poursuite du cycle cellulaire en abolissant le checkpoint G2/M. Ainsi l'interaction entre *Brca2* et *Rad51* semble essentielle pour qu'il y ait un arrêt du cycle cellulaire en G2/M après irradiations gamma (Chen et al., 1999).

Rôle dans la cytokinèse

Brca2 a également un rôle dans la cytokinèse, qui est la division du cytoplasme pour permettre la séparation entre les deux cellules filles. Dans les cellules Hela, *Brca2* colocalise avec une protéine spécifique de la cytokinèse (Aurora B) lors de la division cytoplasmique (Daniels et al., 2004). Dans les fibroblastes d'embryon de souris, la disruption de *Brca2* entraîne un retard dans la progression vers la cytokinèse et l'absence de division cytoplasmique aboutit à une cellule binucléée (Daniels et al., 2004). De plus, dans une lignée cellulaire HeLa, dont l'expression de *BRCA2* a été inactivé par ARNi et dans une lignée cellulaire épithéliale cancéreuse CAPAN, isolée d'un patient comportant une protéine *Brca2* non fonctionnelle, l'organisation de la myosine est anormale lors de la division cellulaire avec une absence de formation du fuseau mitotique. Les résultats de cette étude suggèrent donc un rôle de *Brca2* lors de la cytokinèse (Daniels et al., 2004).

V.4. Compétition et collaboration entre les différentes voies de réparation des CDB de l'ADN

Lorsque les CDB de l'ADN sont génétiquement programmées, la réparation se réalise par un mécanisme préférentiel. Ainsi, les CDB engendrées lors de la recombinaison V(D)J dans les gènes d'immunoglobuline sont réparées par NHEJ. Et en méiose, les CDB effectuées par Spo11 sont réparées par la RH.

Dans le cas de CDB accidentelles, le mécanisme de réparation de l'ADN utilisé est dépendant du cycle, du tissu cellulaire et des acteurs moléculaires présents. Il avait été proposé que chez la levure, ayant une efficacité très forte du ciblage génique, le mécanisme de réparation des CDB utilisé soit la RH alors que chez les mammifères, l'efficacité du ciblage génique étant faible, ce soit le NHEJ qui soit employé. Cette observation n'est pas tout à fait vraie, les mécanismes n'ont pas d'action exclusive mais sont complémentaires. Ainsi, il a été montré que, dans les cellules de vertébrés, 30 à 50% des CDB de l'ADN sont réparées par RH et donc 70 à 50% par le NHEJ et chez la levure, 70% des CDB de l'ADN sont réparées par la RH et le reste par NHEJ (Liang et al., 1998 ; Haber, 2000). Ces deux mécanismes de réparation des CDB de l'ADN co-existent et le choix de faire intervenir l'un ou l'autre est régulé par de nombreux facteurs incluant la nature de la lésion, la phase du cycle cellulaire et le type cellulaire (Daboussi et al., 2002; Valerie and Povirk, 2003). Ainsi, la RH est utilisée lors des phases S/G2 du cycle cellulaire, car la réplication nécessite qu'il y ait le moins d'erreur possible. La réparation s'effectue alors en recopiant la séquence sur la chromatide sœur qui est présente à ce stade. Le NHEJ, sollicité pour réparer les CDB causées par des agents endogènes ou exogènes, est utilisé en phase G1 et en début de phase S (Lee et al., 1997 ; Takata et al., 1998 ; Rothkamm et al., 2003). Cette distribution temporelle coïncide avec l'expression des acteurs de ces mécanismes. En effet les protéines Rad51 et Rad52, acteurs de la RH, sont exprimées chez l'homme en phase S/G2 (Flygare et al., 1996), chez *Arabidopsis* en phase S (Doutriaux et al., 1998) et chez *E. coli*, RecA est aussi exprimé à cette même phase (Seigneur et al., 2000). Le stade de développement intervient également dans le choix de la voie de réparation utilisée. Ainsi la RH semble être privilégiée dans les cellules embryonnaires. De plus, la présence des acteurs des différentes voies de réparation au niveau de la CDB est importante dans le choix du mécanisme de réparation. Il a été montré, dans des

cellules de souris, que la présence de Ku, acteur du NHEJ, au niveau de la cassure permettait le recrutement des autres acteurs du NHEJ et de Mre11. En l'absence de Ku, le complexe MRX recruté au niveau de cette cassure effectuait la dégradation de la CDB engendrant des extrémités 3'OH simple brin, substrat de la RH et du SSA (Goedecke et al., 1999). Ensuite, en fonction de la présence ou de l'absence de Rad51, la réparation se dirige vers la RH ou le SSA respectivement (revue par (Kass and Jasin, 2010)).

Cependant si le mécanisme adéquat ne peut pas être utilisé du à l'absence d'un de ces acteurs, un autre mécanisme de réparation peut prendre le relais pour la survie de la cellule. Ainsi des études ont montré que la RH et le NHEJ étaient utilisés de façon complémentaire si l'un des deux était absent. Delacote *et al.* en 2002, ont étudié l'utilisation des différents mécanismes de réparation dans des lignées cellulaires de hamster mutantes *xrcc4* ou dont l'activité de la DNA-PKcs a été inactivée par ajout de wortmannine. Dans ces cellules soumises aux irradiations gamma, la RH, mesurée grâce à un substrat de recombinaison, est stimulée par rapport aux cellules sauvages. De plus, chez ces cellules soumises aux irradiations gamma, il a été montré la présence de foyers Rad51 confortant le fait que la RH est utilisée dans ces cellules déficientes pour le NHEJ afin de réparer les CDB de l'ADN (Delacote et al., 2002). Allen *et al.* en 2002, ont étudié l'implication du NHEJ et de la RH dans la réparation d'un substrat de recombinaison dans une lignée cellulaire de hamster (CHO) déficiente pour la DNA-PKcs. Dans cette lignée cellulaire le défaut de DNA-PKcs est complété par l'ajout de l'ADNc de la DNA-PKcs humaine. Chez ces cellules, où la DNA-PKcs est fonctionnelle, la réparation du substrat de recombinaison par RH est diminuée par rapport à cette même lignée cellulaire déficiente pour la DNA-PKcs (Allen et al., 2002). De plus dans des lignées cellulaires tumorales humaines ou de souris contenant une protéine Brca2 tronquée ont un niveau de RH réduit. Des remaniements chromosomiques sont observés dans ces cellules contenant une protéine Brca2 non fonctionnelle, suggérant que les CDB semblent réparées par les autres mécanismes de réparation de l'ADN, le NHEJ et le SSA (Tutt et al., 1999 ; Yu et al., 2000b ; Moynahan et al., 2001 ; Xia et al., 2001).

Ces exemples montrent qu'en absence du NHEJ, la RH peut être utilisée pour permettre la réparation de CDB de l'ADN et vice versa. Si cette coopération a été montrée dans les cellules somatique, en revanche elle n'a jamais été observée lors de la méiose.

Chapitre V : Les ADN-ligases

I. Présentation

Les cassures simple ou double brin (CSB et CDB) causés à l'ADN nécessitent leur réparation par différents mécanismes utilisant tous une étape finale de religation des extrémités d'ADN effectuée grâce à une ADN-ligase. Si certaines ligases intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN ont été identifiées, d'autres restent encore inconnues. Ainsi les ligases intervenant dans la réparation des CSB par NER et par BER sont la Ligase I et la Ligase III. Lors de la réparation des CDB par NHEJ, c'est la Ligase IV qui a été identifiée pour intervenir lors de l'étape finale de ligation. En revanche les ligases intervenant dans les autres mécanismes de réparation de l'ADN cités, le MMR, la RH et le SSA, n'ont pas encore été clairement identifiées.

Les ADN-ligases sont des nucléotidyltransférases (NTases) qui utilisent un cofacteur (NAD⁺ ou ATP), pour catalyser la formation d'une liaison phosphodiester entre un groupement 5'P et un groupement 3'OH de deux nucléotides adjacents. Chez les eucaryotes, les archaées et les virus, les ADN-ligases sont ATP dépendantes alors que chez les bactéries, certaines utilisent l'ATP d'autres le NAD⁺ comme cofacteur. La réaction de ligation se déroule en trois étapes. La première étape consiste en un transfert d'une adénosine 5'-monophosphate (AMP) de l'ATP sur la lysine réactive du site catalytique de la ligase. En second lieu, cet AMP est transféré de la ligase au 5' phosphate libre de la cassure d'ADN. Enfin, l'adénylation de l'ADN en 5' phosphate permet sa liaison au 3'OH par déplacement de l'AMP et ainsi les deux extrémités de l'ADN se lient covalamment.

Il a été identifié six ligases différentes qui ont un rôle spécifique et sont donc non redondantes. L'analyse de séquence et de structure des différentes ligases montre qu'elles ont toutes deux domaines en commun. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui se lie à l'ADN en amont et en aval de la zone endommagée, et le core catalytique. Ce core catalytique comprend d'une part un domaine nommé OB-fold domain (OBD) qui permet de dérouler l'ADN légèrement pour une meilleure action de la ligase, et d'autre part le domaine dit

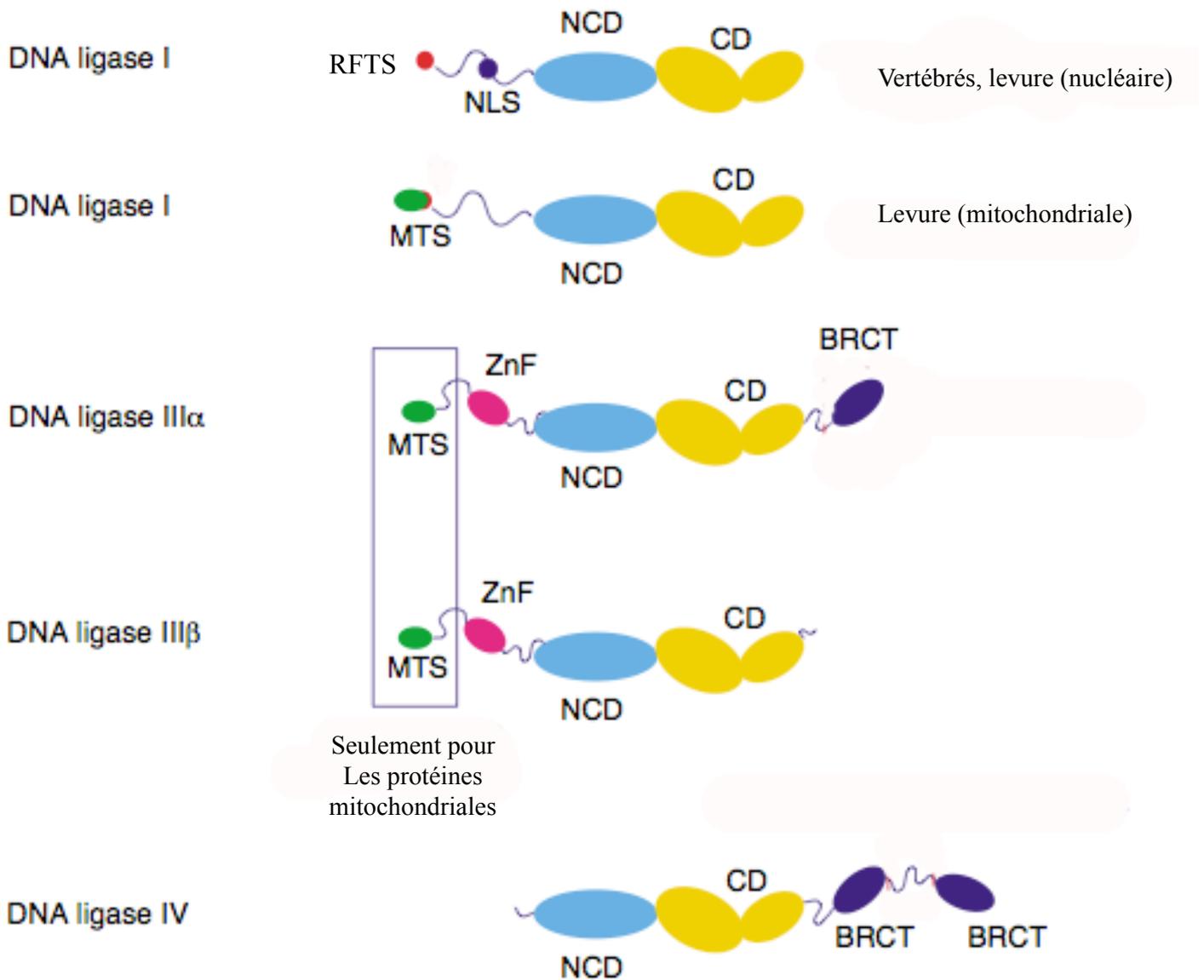


Figure 19: Représentation de la structure et des différents domaines des ADN ligases

Le domaine catalytique (CD) conservé chez toutes les ADN ligases contient le site actif. La région NCD représente le domaine non catalytique conservé chez toutes les ligases. La région du NLS de la Ligase I, permet sa localisation au niveau nucléaire. Le domaine RFTS (replication foyers targeting) de la Ligase I permet son interaction avec PcnA. Le domaine MTS (mitochondrial targeting sequence) permet la localisation au niveau mitochondriale de la Ligase I, la Ligase III α et la Ligase III β . La Ligase III (α et β) possède un motif en doigt de zinc en N-terminal. La Ligase III α a de plus un domaine BRCT en C-terminal. La Ligase IV contient, elle, deux domaines BRCT qui ont été identifiés comme interagissant avec Xrcc4.

(d'après Martin et MacNeill, 2002)

d'adénylation qui contient la lysine catalytique du site actif permettant la ligation (Martin and MacNeill, 2002) (Figure 19). La spécificité des différentes ligases vient des autres régions.

II. La Ligase I

La Ligase I est impliquée dans la ligation des fragments d'Okazaki, constituant du brin répliqué discontinu, pendant la réplication en interagissant avec PcnA (Montecucco et al., 1998). Elle intervient également dans des mécanismes de réparation de l'ADN simple brin, le Base Excision Repair (BER) chez tous les eucaryotes et a également un rôle dans la réparation des cassures double brin, le B-NHEJ chez les animaux et les plantes (Prigent et al., 1994 ; Klungland and Lindahl, 1997 ; Audebert et al., 2004).

Chez la levure, l'orthologue de la *LIGASE I*, *CDC9* code pour deux isoformes, résultat d'un épissage alternatif, ayant des localisations différentes : nucléaire ou mitochondriale (Willer et al., 1999). Chez les vertébrés, la Ligase I n'est que nucléaire.

La Ligase I comporte les deux domaines des ligases, le DBD et le core catalytique mais également en région N-terminale, une séquence nommée RFTS (replication foyers targeting) permettant l'interaction de la Ligase I avec PcnA et ainsi sa localisation au niveau de l'ADN lors de la réplication (Figure 11) (Ellenberger and Tomkinson, 2008).

Chez *S. Cerevisiae* (Johnston, 1979) le mutant de cette ligase est non viable, il en est de même chez *Arabidopsis* (Sunderland et al., 2006 ; Waterworth et al., 2009) et les mammifères (Petrini et al., 1995 ; Bentley et al., 1996). Le gène *LIGASE I* est donc essentiel pour la viabilité en accord avec son rôle dans la réplication.

Il a été identifié chez *Arabidopsis* un gène présentant 47,8% d'identité nucléotidique avec le gène *LIGASE I*, qui a été nommée *LIGASE I-like* au sein de notre laboratoire en raison de leur forte similitude. Il a été nommée *LIGASE Ia* dans une récente publication (Andreuzza et al., 2010). Le rôle de cette Ligase I-like reste inconnu, mais il pourrait s'agir d'un pseudogène puisque son expression n'a pu être déterminée (Andreuzza et al., 2010).

III. La Ligase III

La Ligase III existe uniquement chez les vertébrés et génère plusieurs polypeptides différents. Deux isoforme de la Ligase III ont donc été identifiées résultant d'un épissage alternatif, la Ligase III α et la Ligase III β qui existent chacune sous une forme nucléaire et sous une forme mitochondriale (Lakshmipathy and Campbell, 1999). La forme nucléaire de la Ligase III α est retrouvée de façon ubiquitaire et intervient dans la voie du short patch du BER en interagissant avec Xrcc1. Récemment, il a été montré que ce complexe intervenait aussi dans le NER (Moser et al., 2007). La forme mitochondriale de la Ligase III α interagit avec l'ADN polymérase mitochondriale, suggérant qu'elle intervient dans la réplication mitochondriale. La Ligase III β est présente uniquement dans les testicules chez les mammifères et pourrait ainsi jouer un rôle dans la recombinaison méiotique (Timson et al., 2000a).

Les deux polypeptides possèdent les deux domaines des ligases, le DBD et le core catalytique mais également des domaines qui leur sont spécifiques (Figure 11). Les deux isoformes de la Ligase III comportent un domaine en doigt de zinc en N-terminal, semblable au motif retrouvé chez les Parp, qui permettrait son recrutement au niveau des CSB de l'ADN. De plus, l'ADN-Ligase III α possède un domaine BRCT (Breast and ovarian cancer susceptibility protein 1 C-terminal) retrouvé chez d'autres protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme Brca1 et la Ligase IV. Ce motif BRCT est souvent impliqué dans l'interaction protéine-protéine. La forme nucléaire de la Ligase III α interagit donc avec Xrcc1 *via* son motif BRCT.

Chez la souris, les mutants *xrcc1* et *lig3* sont létaux à l'état embryonnaire (Tebbs et al., 1999 ; Puebla-Osorio et al., 2006). Et les lignées cellulaires de hamster (CHO) déficientes pour Xrcc1 sont hypersensibles à différents agents alkylants ainsi qu'aux irradiations gamma (Tebbs et al., 1999). Chez *Arabidopsis*, la Ligase III n'a pas été identifiée. Si la Ligase I la remplacerait lors du NER en revanche il n'a pas encore été défini quelles autres ligases la remplaceraient dans la voie du short patch du BER (Waterworth, 2009). Le mutant d'*Arabidopsis* pour la voie du short patch du BER, *xrcc1*, présente un développement normal mais une sensibilité aux irradiations gamma (Charbonnel et al., 2010a).

IV. La Ligase IV

La ligase IV intervient spécifiquement dans le NHEJ chez entre autres, les mammifères, la levure et *Arabidopsis*. (Elle a été décrite dans le paragraphe III.2.3 du chapitre IV). Elle comporte également les domaines DBD et le core catalytique mais en plus deux domaines BRCT permettant son interaction avec Xrcc4 (Figure 19).

V. La Ligase 6

La Ligase 6 est spécifique des plantes mais son rôle est encore peu connu (Bonatto et al., 2005a). La Ligase 6 a été retrouvée chez le Riz (*Oryza sativa*) et *Arabidopsis* mais pas chez la mousse *Physcomitrella patens*. Chez *Arabidopsis*, la Ligase 6 a un taux d'expression plutôt faible dans tous les tissus mais est exprimé à un taux élevé dans les inflorescences et le méristème (Waterworth et al., 2010b).

Chez *Arabidopsis*, le gène *LIGASE 6* possède une forte identité de séquence avec le gène *LIGASE I* au niveau des domaines conservés chez les Ligases (le domaine de liaison à l'ADN et le core catalytique) se situant dans la région N-terminale. Un alignement protéique de ces régions conservées a permis de définir que la Ligase 6 d'*Arabidopsis* présente 38% d'identité avec la Ligase I d'*Arabidopsis* et 36% avec la Ligase I de l'homme (Waterworth et al., 2010b).

La Ligase 6 se différencie des autres ligases par la présence d'un motif additionnel, le domaine β -lactamase qui n'est retrouvé chez aucune autre ligase (Waterworth et al., 2010b). Le domaine β -lactamase de la Ligase 6 inclut un domaine spécifique des protéines des mécanismes de réparation de l'ADN, le domaine β -metallo-lactamase (β -CASP domain). Ce domaine β -CASP a été identifié chez les protéines Artemis et Pso2 (Callebaut et al., 2002b ; Bonatto et al., 2005a). Chez la levure et les mammifères, la protéine Pso2 est impliquée dans la réparation inter-brin de l'ADN et Artemis est une nucléase qui intervient dans le NHEJ (déjà traité dans le paragraphe III.2.2 du chapitre IV). La présence de ce domaine pourrait suggérer un rôle de la Ligase 6 dans la réparation de l'ADN.

Le mutant *ligase 6* d'*Arabidopsis* présente un développement normal de croissance et est fertile indiquant que ce gène n'est pas essentiel pour la survie et la fertilité de la plante. Ce mutant a été soumis à différents stress génotoxiques (UV-C, MMS, mitomycine C, menadione et bleomycine et irradiations gamma) et ne présenterait qu'une sensibilité légère à une dose de 100 Gy d'irradiations gamma (Waterworth et al., 2010b). Ce potentiel de sensibilité suggérerait peut-être l'implication de cette ligase dans la réparation de l'ADN.

Une activité Ligase avait été identifiée dans les cellules de mammifères et nommée Ligase II (Soderhall and Lindahl, 1975 ; Timson et al., 2000a). Cette Ligase s'est en fait révélée être une des isoformes produite par le gène *LIGASE III*. De plus, une nouvelle Ligase nommée V aurait été partiellement purifiée et présenterait une activité de ligation des CDB *in vitro* mais il n'a pas été identifié de gène et son rôle *in vivo* reste inconnu. Cette Ligase V pourrait être dérivée d'une ligase déjà connue (Johnson and Fairman, 1997 ; Timson et al., 2000a).

Quoiqu'il en soit, il n'a pas été retrouvé ni de Ligase II ni de Ligase V chez *Arabidopsis*.

Chapitre VI : Contexte de la thèse

Mon travail de thèse fait suite aux travaux effectués par Nicolas Siaud et Eloïse Dray durant leur thèse. Chez *Arabidopsis*, par test double hybride et par co-immunoprécipitation, ils ont retrouvé l'interaction, déjà montré chez d'autres espèces, entre Brca2 (les deux) et Rad51. Cette interaction a permis de relier Brca2 à la recombinaison homologue. De plus, leurs travaux ont permis d'identifier un nouvel interactant de Brca2 : Dmc1. Cette interaction entre Brca2 et Dmc1 a permis de relier Brca2 à la recombinaison méiotique (Siaud et al., 2004 ; Dray et al., 2006). Cette implication de Brca2 en méiose a été consolidée par le phénotype méiotique observé chez la plante dont l'expression des deux Brca2 a été inactivée par ARNi spécifiquement à la méiose. Ces plantes, inactivées pour Brca2, ont une croissance normale mais s'avèrent stériles avec un déroulement anormal de la méiose. Les chromosomes apparaissent emmêlés, avec une absence de bivalent, puis lors des divisions I et II de méiose, les chromosomes s'étirent, forment des ponts et se fragmentent. Ces figures chromosomiques sont dépendantes de l'introduction des CDB méiotiques de l'ADN puisque chez le mutant *spo11*, en absence de CDB méiotiques, ces anomalies ne sont pas observées. Brca2 agit ainsi en aval de Spo11.

Mon hypothèse est qu'en absence de Brca2, les CDB créées seraient « réparées » par un mécanisme de réparation n'ayant pas encore été identifié. Mon travail de thèse repose sur la vérification de cette hypothèse par l'étude de l'implication de différents mécanismes de réparation de l'ADN dans ces anomalies chromosomiques observées en méiose en l'absence de Brca2. En effet, nous avons vu qu'en phase somatique, les mécanismes de réparation pouvaient se substituer les uns aux autres, mais cette collaboration n'a jamais encore été montrée en méiose.

Mes travaux de thèse ont permis de montrer que le NHEJ et/ou le SSA, mécanismes de réparation des CDB somatiques dont l'intervention en méiose n'a jamais été montré, n'intervenait dans la formation de ces anomalies chromosomiques. Toujours dans l'hypothèse où les anomalies méiotiques observées en méiose en absence de Brca2 soient le résultat de liaisons covalentes entre chromosomes, j'ai ensuite poursuivi mon étude vers une possible implication d'une ADN-Ligase. Cette étude m'a permis d'utiliser les outils du laboratoire,

c'est à dire aussi bien le double mutant *brca2*, obtenu au cours de ma thèse, que les plantes ARNi Brca2. Ces deux possibilités d'éteindre l'expression des gènes Brca2 donnent le même phénotype : des plantes viables avec un phénotype développemental normal mais stériles avec les mêmes figures chromosomiques lors de la méiose. Après avoir caractérisé le mutant *ligase 6*, dont la méiose est normale, j'ai inactivé Brca2 par ARNi dans ce contexte mutant et pu observer que la Ligase 6 n'intervient pas dans les anomalies méiotiques observées en absence de Brca2. Mes études sur la Ligase I, ne m'ont pas permis de définir si cette ligase avait un rôle dans les anomalies méiotiques observées en absence de Brca2. J'ai aussi réalisé l'étude des mutants *xrcc4* et *xrcc4-like* qui m'a permis de confirmer le rôle de Xrcc4 dans le NHEJ et d'exclure par contre une implication de Xrcc4-like dans la réparation de l'ADN.

Résultats

Chapitre I : Le SSA et le NHEJ ne sont pas impliqués dans la formation des aberrations chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2

I. Résumé de l'Article

Lors de la méiose, des cassures double brin (CDB) de l'ADN sont introduites de façon programmée par Spo11. Ces CDB sont réparées par la recombinaison homologue dont les acteurs principaux sont Rad51 et Dmc1 aidées de Brca2 ou d'autres effecteurs. Les résultats obtenus par Siaud *et al.* (2004) montrent que la déplétion de Brca2 en méiose chez *Arabidopsis thaliana* par ARN interférence aboutit à la stérilité de la plante, du fait de défauts chromosomiques intervenant lors du déroulement méiotique. La recombinaison homologue n'étant plus fonctionnelle en l'absence de Brca2, les anomalies chromosomiques observées pourraient être le résultat de réparation aberrante des CDB méiotiques de l'ADN effectuée par des mécanismes de réparation qui interviennent normalement dans les cellules somatiques. Nous avons donc étudié l'implication, dans ces anomalies chromosomiques, de différents mécanismes et protéines connus pour leur action dans la réparation de l'ADN.

Dans cet article, j'ai tout d'abord montré que les figures chromosomiques méiotiques anormales étaient similaires chez la plante dont l'expression génique de Brca2 a été inactivée par ARNi et chez le double mutant contenant une insertion d'un ADN-T dans les gènes *AtBRCA2a* (At4g00020) et *AtBRCA2b* (At5g01630). De plus, l'introduction d'un transgène contenant l'ADNc de *AtBRCA2a* sous le contrôle du promoteur méiotique *pDMC1* est suffisant pour compléter le phénotype de stérilité du double mutant *brca2a brca2b*. Ces résultats ont permis de consolider l'approche ARNi utilisée au laboratoire et d'appuyer le fait que les anomalies méiotiques observées étaient bien dues à l'absence de Brca2.

Afin de vérifier si les autres mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN sont impliqués dans les anomalies méiotiques observées, nous avons caractérisé des mutants d'insertion pour la voie de réparation du Non homologous End Joining (NHEJ) et du Single Strand Annealing (SSA). Les mutants déficients pour le NHEJ sont les mutants *ku80* et *ligase IV*. Pour ce dernier, la lignée d'insertion utilisée à déjà été publiée, et le mutant déficient pour le SSA est *ercc1*, également déjà caractérisé (Dubest et al., 2004a). La lignée d'insertion du

mutant *ku80* utilisé n'a jamais été caractérisée, en revanche d'autres lignées mutantes affectées pour ce gène ont été décrites (West et al., 2002; Friesner and Britt, 2003; van Attikum et al., 2003). Par RT-PCR, j'ai vérifié que les mutants du NHEJ et du SSA ne comportent pas de transcrits intègres pour le gène muté, ce sont donc des mutants nuls. Ces mutants du NHEJ et du SSA ne présentent pas de phénotypes développementaux, j'ai donc étudié leur sensibilité à différents stress génotoxiques. Ainsi les mutants du NHEJ, *ku80* et *ligase IV*, présentent une hyper-sensibilité aux irradiations gamma ainsi qu'une sensibilité, même si elle est plus faible, au méthyl méthane sulfonate (MMS) mais ils sont résistants aux UV-C. En revanche, le mutant du SSA, *erccl1*, présente une hyper-sensibilité au MMS, aux UV-C et aux irradiations gamma bien que cette dernière soit plus faible que celle des mutants du NHEJ.

Le déroulement de la méiose est normal chez les mutants *ku80*, *ligase IV* et *erccl1*. Chez ces mutants, l'expression de *BRCA2* a ensuite été éteinte spécifiquement à la méiose par ARNi et le déroulement méiotique a été observé. Les chromosomes apparaissent emmêlés, puis s'étirent lors de la division méiotique et se fragmentent. Ce phénotype méiotique est typique des plantes déficientes pour Brca2 indiquant que ni le NHEJ ni le SSA n'interviennent dans la formation de ces aberrations chromosomiques.

L'hypothèse que nous avons ensuite voulu vérifier est la possible implication complémentaire de ces deux mécanismes. Ainsi en l'absence de l'un, l'autre pourrait prendre le relais. Pour vérifier cela, nous avons construit des doubles mutants du NHEJ et du SSA, *ku80 erccl1* et *ligase IV erccl1*. Les doubles mutants ont un phénotype normal en condition normale de croissance et leur méiose est également normale. Ils présentent une hyper-sensibilité aux stress génotoxiques similaire au simple mutant le plus atteint pour chaque stress. L'inactivation de Brca2 par ARNi en méiose chez ces doubles mutants n'entraîne pas de changement du phénotype « type *brca2* » indiquant qu'il n'y a pas non plus d'action complémentaire du NHEJ et SSA.

Nous nous sommes ensuite tournés vers un rôle possible d'une ADN-ligase qui ferait tout simplement une ligation entre les bouts cassés d'ADN. Nous avons déjà pu exclure un rôle de la Ligase IV du NHEJ dans ces anomalies. Il existe chez *Arabidopsis* d'autres ligases : la Ligase I, la Ligase Ia et la Ligase 6, qui est spécifique des plantes. Seul le mutant de la *LIGASE 6* est étudié dans cet article, les mutants de la Ligase I et de la Ligase Ia eux sont

présentés dans mon manuscrit de thèse. En contexte sauvage, la *LIGASE 6* est exprimée et détectable par RT-PCR. En contexte mutant *ligase 6*, un transcrit est détecté, par RT-PCR, en amont et en aval de l'insertion du T-DNA mais il n'y a pas de transcrit intègre chevauchant l'insertion. Le mutant *ligase 6* est donc un mutant nul. Il ne présente pas de phénotype développemental ni de sensibilité évidente aux stress génotoxiques testés (MMS, irradiations gamma et UV-C). L'inactivation de *BRCA2* dans ce contexte mutant ne change pas le phénotype méiotique « type *brca2* » indiquant que la ligase 6 n'aurait pas de rôle dans les aberrations chromosomiques observées en méiose.

Les résultats obtenus ne permettent pas de désigner le ou les responsables des aberrations chromosomiques observées en méiose en absence de *Brca2*. Cependant, ils permettent d'éliminer l'implication des voies classiques et principales de réparation des cassures double brin de l'ADN ainsi que la Ligase 6 dans ces figures méiotiques. En discussion, j'évoque qu'il est possible de contourner le fait que la mutation du gène *LIGASE I* soit létale, en utilisant un système ARNi pour éteindre l'expression de *LIGASE I* spécifiquement en méiose afin de définir si cette Ligase intervient dans la formation des anomalies méiotiques observées en absence de *Brca2*. Par la suite, nous verrons dans le chapitre II que les résultats obtenus ne nous ont pas permis de conclure sur une implication de la Ligase I, puisque l'efficacité de l'ARNi/*LIGASE I* n'a pas été démontrée.

II. Article (En presse à PLoS ONE)

Characterization of Brca2-Deficient Plants Excludes the Role of NHEJ and SSA in The Meiotic Chromosomal Defect Phenotype
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-11-10287R1
Article Type:	Research Article
Full Title:	Characterization of Brca2-Deficient Plants Excludes the Role of NHEJ and SSA in The Meiotic Chromosomal Defect Phenotype
Short Title:	brca2 meiotic phenotype in Arabidopsis
Corresponding Author:	Ariane GRATIAS, Ph.D Université Paris Sud-11, CNRS Orsay, FRANCE
Keywords:	arabidopsis; Brca2; DNA repair; double-strand breaks; homologous recombination; meiosis
Abstract:	In somatic cells, three major pathways are involved in the repair of DNA double-strand breaks (DBS): Non-Homologous End Joining (NHEJ), Single-Strand Annealing (SSA) and Homologous Recombination (HR). In somatic and meiotic HR, DNA DSB are 5' to 3' resected, producing long 3' single-stranded DNA extensions. Brca2 is essential to load the Rad51 recombinase onto these 3' overhangs. The resulting nucleofilament can thus invade a homologous DNA sequence to copy and restore the original genetic information. In Arabidopsis, the inactivation of Brca2 specifically during meiosis by an RNAi approach results in aberrant chromosome aggregates, chromosomal fragmentation and missegregation leading to a sterility phenotype. We had previously suggested that such chromosomal behaviour could be due to NHEJ. In this study, we show that knock-out plants affected in both BRCA2 genes show the same meiotic phenotype as the RNAi-inactivated plants. Moreover, it is demonstrated that during meiosis, neither NHEJ nor SSA compensate for HR deficiency in BRCA2-inactivated plants. The role of the plant-specific DNA Ligase6 is also excluded. The possible mechanism(s) involved in the formation of these aberrant chromosomal bridges in the absence of HR during meiosis are discussed.
All Authors:	Marilyn Dumont Sophie Massot Marie-Pascale Doutriaux Ariane GRATIAS, Ph.D
Suggested Reviewers:	Raphaël Mercier UMR1318, INRA-AgroParisTech, France raphael.mercier@versailles.inra.fr Simon Boulton Clare Hall Laboratories, London Research Institute, Cancer Research UK, simon.boulton@cancer.org.uk
Opposed Reviewers:	Charles White UMR CNRS 6247 - Clermont Université - INSERM U931, France personnal conflict Puchta Holger Botanical Institute II, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe, Germany. personnal conflict



1
2 **Dr. Ariane GRATIAS, Associate Professor Paris Sud-11**
3 Laboratoire de Recombinaison/Réparation de l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*
4 Institut de Biologie des Plantes, UMR 8618,
5 Bât.630, Université Paris Sud-11
6 91405 ORSAY, Cedex, France
7 e-mail: ariane.gratias-weill@u-psud.fr
8
9 Tel: 33(0)1 69 15 33 25 ; Fax 33(0)1-69-15-33-24

10
11
12
13 Orsay, Friday 9th of September, 2011
14
15

16
17 To: PLoS ONE – Dr Marco Muzi-Falconi
18 **PONE-D-11-10287**
19

20
21
22
23 Dear Editor,
24

25
26
27 Please, find our revised manuscript entitled “**Characterization of Brca2-Deficient Plants**
28 **Excludes the Role of NHEJ and SSA in The Meiotic Chromosomal Defect Phenotype**”
29 that we send again to PLoS ONE, after the demanded corrections were done.
30

31
32 Our work presents data that wish to help understanding the molecular mechanism
33 responsible for the aberrant chromosomal figures observed during meiosis in *Arabidopsis*,
34 when Brca2, a partner of the DNA recombinases required for homologous meiotic
35 recombination (Rad51 and Dmc1), is absent. It includes relevant mutants characterization,
36 with RT-PCR, analyses of meiocytes by DAPI staining, and genotoxic stress assay for the
37 mutant plants affected in different DNA repair pathways (NHEJ and SSA).
38

39
40 In our revised manuscript, as asked by the two referees, we have presented data that
41 were previously not shown, concerning the complementation of the *brca2a brca2b* double
42 mutant plants by the *BRCA2a* cDNA: these results have been included in Figure 3, a
43 paragraph has been added into the main text at the end of the « A *brca2* double mutant
44 exhibits the same meiotic phenotype as Brca2-inactivated plants » paragraph and a short
45 description of the construct is now presented in the Material and Methods part. The question
46 concerning the complementation by the *BRCA2b* cDNA is discussed in our Response to
47 Referees.
48

49
50 Following the reviewer#1's request, the RT-PCR experiments on *brca2* single and
51 double mutants have been reproduced and clearly showed that no general transcriptional
52 defect can be detected, as illustrated by the Actin expression control. These results are now
53 presented in a new Figure 2 added for convenience and that summarizes all the RT-PCR
54 experiments realized on the *brca2* (single and double) mutants. All the figures have
55 consecutively been renumbered. This new figure also includes additional RT-PCR that were
56 asked by reviewer#1 and that show that genes involved in NHEJ and SSA are still expressed
57 in floral buds of the *brca2* (single and double) mutants. The pertinence of studying alternative
58
59
60
61
62
63
64
65



1 DNA repair pathways during meiosis in the absence of Brca2 is discussed in our Response to
2 Referees.

3
4 In our Responses to Referees, we also discuss the fact the our *lig6* mutant plants do
5 not appear sensitive to gamma-rays and we expose our preliminary results tempting to
6 inactivate the DNA Ligase1 specifically during meiosis to study the consequence of such a
7 depletion on the meiotic *brca2* phenotype.
8
9

10
11 Thank you for re-considering our manuscript.

12
13 Sincerely,
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Ariane Gratias

1 **Characterization of Brca2-Deficient Plants Excludes the**
2 **Role of NHEJ and SSA in The Meiotic Chromosomal**
3 **Defect Phenotype**
4
5
6
7
8

9 Marilyn Dumont¹, Sophie Massot¹, Marie-Pascale Doutriaux¹ and Ariane Gratias^{1*}.
10
11
12
13

14 ¹ Institut de Biologie des Plantes, CNRS UMR8618, Bâtiment 630, Université Paris Sud-11,
15 91405 Orsay Cedex, France.
16
17
18
19
20
21

22 * Corresponding author : ariane.gratias-weill@u-psud.fr
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Short title** : *brca2* meiotic phenotype in *Arabidopsis*
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

23 **ABSTRACT**

1
2 24
3
4 25 In somatic cells, three major pathways are involved in the repair of DNA double-strand
5 26 breaks (DBS): Non-Homologous End Joining (NHEJ), Single-Strand Annealing (SSA) and
6
7 27 Homologous Recombination (HR). In somatic and meiotic HR, DNA DSB are 5' to 3'
8
9 28 resected, producing long 3' single-stranded DNA extensions. Brca2 is essential to load the
10
11 29 Rad51 recombinase onto these 3' overhangs. The resulting nucleofilament can thus invade a
12
13 30 homologous DNA sequence to copy and restore the original genetic information. In
14
15 31 *Arabidopsis*, the inactivation of Brca2 specifically during meiosis by an RNAi approach
16
17 32 results in aberrant chromosome aggregates, chromosomal fragmentation and missegregation
18
19 33 leading to a sterility phenotype. We had previously suggested that such chromosomal
20
21 34 behaviour could be due to NHEJ. In this study, we show that knock-out plants affected in
22
23 35 both *BRCA2* genes show the same meiotic phenotype as the RNAi-inactivated plants.
24
25 36 Moreover, it is demonstrated that during meiosis, neither NHEJ nor SSA compensate for HR
26
27 37 deficiency in *BRCA2*-inactivated plants. The role of the plant-specific DNA Ligase6 is also
28
29 38 excluded. The possible mechanism(s) involved in the formation of these aberrant
30
31 39 chromosomal bridges in the absence of HR during meiosis are discussed.

31 40
32
33 41 **KEYWORDS:** *Arabidopsis*; Brca2; DNA repair; double-strand breaks; homologous
34
35 42 recombination; meiosis

36 43
37
38 44 **INTRODUCTION**

39
40 45
41
42 46 One of the most cytotoxic DNA damage is chromosomal breakage, where a DNA double-
43
44 47 strand break (DSB) occurs in the duplex DNA. Failure to repair correctly even one DNA DSB
45
46 48 can result in the loss of genetic information, chromosome rearrangement, mutations and lead
47
48 49 eventually to cell death. In plants, as in other organisms, cells have developed powerful and
49
50 50 rapid cellular responses, leading to cell cycle arrest and DNA DSB repair. In eukaryotes,
51
51 51 DNA broken ends can be processed by three major DSB repair pathways that are tightly
52
53 52 regulated, depending on cell type and cell cycle phase: Non-Homologous End Joining
54
55 53 (NHEJ), Single-strand annealing (SSA), and Homologous Recombination (HR).

56 54
57
58 55 In the NHEJ pathway, DNA broken ends are simply joined with little or no further
59
60 56 processing. In mammalian cells, the Ku70-Ku80 heterodimer forms a ternary complex with

57 the DNA-PKcs, and binds to the DSB. The binding of this complex prevents excessive
58 degradation and promotes the recruitment of other factors involved in the processing of DNA
59 ends to make them suitable for the ultimate step of ligation by the LigaseIV-Xrcc4 complex
60 (reviewed in [1,2]). While no ortholog of DNA-PKcs has been found in *Arabidopsis*, *AtKu70*,
61 *AtKu80*, *AtLigIV* and *AtXrcc4* homologs have been identified [3,4,5,6]. Mammalian null
62 mutants affected in the NHEJ pathway present various orders of phenotype severity. For
63 instance, *ku* mutants are immunodeficient and exhibit an accelerated senescence (in
64 correlation with the deregulation of telomere length), while LigaseIV deficiency leads to
65 embryonic lethality in mice. In *Arabidopsis*, all characterized *nhej* mutants are viable but
66 hypersensitive to various DNA damaging agents, except UV [5]. The *ku* mutants are
67 hypersensitive to menadione (which causes oxidative damage), ionising radiations (X- and
68 gamma-rays) and bleomycin (a radiomimetic), methylmethanesulfonate (MMS, an alkylating
69 agent causing abasic sites and single-strand nicks) [4,5,7,8,9,10]. Hypersensitivity to MMS
70 and gamma-irradiation has also been described for *ligIV* mutants [5,11]. Direct evidence for
71 their involvement in NHEJ comes from plasmid rejoining assays. In protoplasts derived from
72 *ku80* and *ku70* mutant plants, the religation efficiency of plasmids linearized by enzymes
73 generating blunt or 5'overhang ends was significantly reduced [9,10].

74
75 The SSA and the HR pathways are homology-dependent processes for repairing DNA
76 DSB. Both are initiated by the 5' to 3' resection of the broken DNA ends in order to uncover
77 extensive single-stranded DNA (ssDNA) 3' overhangs, a critical intermediate in both SSA
78 and HR. These 3' ssDNA tails are coated by the single-stranded DNA binding protein, RPA.
79 After DNA resection, the central step of SSA consists of the annealing between
80 complementary single-stranded DNA sequences on either side of the DSB in a RAD52- and
81 RAD59-dependent, but RAD51-independent, manner. Unpaired non-homologous 3' tails are
82 then cleaved by the Rad1-Rad10 complex (XPF-ERCC1 in mammals), which is also involved
83 in DNA excision repair, in order to complete the DSB repair with DNA synthesis from the
84 newly cleaved ends and their final ligation. In *Arabidopsis*, mutants affected in *AtRAD1* (or
85 *UVH1*) or *AtRAD10* (also called *AtERCC1*) activities have been identified as gamma- and
86 UV-hypersensitive [12,13,14]. In contrast to XPF- or ERCC1-deficient mice, the
87 corresponding single mutant plants are viable in the absence of exogenous DNA damaging
88 agents, grow normally and are fertile. Using a plasmid recombination assay, it was shown that
89 each gene was required for the removal of 3'-ended non-homologous DNA single-stranded
90 tails from SSA intermediates, generated by annealing between direct repeats [15,16,17,18,19].

91

92 In contrast to NHEJ and SSA that are inherently error prone, HR is conservative, as it
93 proceeds *via* the copy of the missing sequence from a homologous template. Moreover, HR is
94 required during meiosis for correct chromosome segregation and the generation of genetic
95 diversity. Meiotic recombination is initiated by the introduction of programmed DNA DSB
96 catalyzed by the topoisomerase-like transesterase activity of dimeric Spo11. This leads to a
97 covalent link between the catalytic tyrosine of a Spo11 monomer and the 5' DNA end on both
98 sides of the DSB. In budding and fission yeast, removal of each Spo11 occurs by
99 endonucleolytic cleavage several nucleotides downstream from the 5' end, catalyzed by the
100 Mre11-Rad50-Xrs2 complex and Sae2. This releases a Spo11 monomer bound to an
101 oligonucleotide, sometimes called a "spolligo" [20,21,22,23].

102
103 The repair process of HR in somatic and meiotic cells is initiated by extensive
104 processing of DNA ends, uncovering 3' ssDNA stretches that become coated by RPA. This
105 resection is essential for the establishment of a recombinase-DNA nucleofilament on the 3'
106 single strand, which performs the homology search for a target DNA sequence to use as a
107 template to copy, either the sister chromatid in somatic cells or a homologous chromosome in
108 meiotic cells. Two recombinases can be loaded onto the ssDNA extension to mediate the
109 strand displacement and homology search: the ubiquitous Rad51, the eukaryotic RecA
110 homolog, and its homolog Dmc1 that has a specific role during meiosis. Once a homology is
111 found, DSB repair is completed by DNA synthesis using the homologous sequence as a
112 template and religation follows [reviewed in 24].

113
114 The displacement of RPA and its replacement by the recombinases rely on mediator
115 proteins, such as the Rad51 paralogs, Rad52 and/or Brca2, which exist in most eukaryotes. In
116 humans, *BRC A2* gene mutations are associated with hereditary breast cancer [25,26] and
117 genome instability [reviewed in 27,28]. In mice, the knockout of *BRC A2* leads to early
118 embryonic lethality associated with chromosomal rearrangements [29]. Structural and
119 biochemical studies have shown the interaction between Rad51 and Brca2 [30,31,32].
120 Together with their co-localization in nuclear foci, after DNA damaging treatment of the
121 cells, this definitively links Brca2 to homologous recombination [33].

122
123 Recently, the human Brca2 protein was purified [34,35,36]. It appears that one Brca2
124 molecule binds approximately six Rad51 monomers and that Brca2 stimulates the binding of

125 Rad51 onto ssDNA even when it is covered by RPA. This interaction is mediated through the
126 specific BRC domains which are present in all Brca2 proteins, but in varying numbers
127 depending on species. For example, eight BRC domains are found in human Brca2 [31],
128 whereas only one is present in Brh2 and Ce-BRC2, the Brca2 homologs of *Ustilago maydis*
129 and *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), respectively [37,38]. In *Arabidopsis*, two *AtBRCA2*
130 genes have been identified: on chromosomes IV (*AtBRCA2(IV)*, also named *AtBRCA2a*) and
131 V (*AtBRCA2(V)* or *AtBRCA2b*). They encode two proteins of 1511 (*AtBRCA2a*) and 1155
132 amino acids (*AtBRCA2b*), which share 94.5% identity and contain four BRC motifs each. The
133 two *Arabidopsis* genes are expressed in floral buds and the proteins they encode have been
134 shown to interact with both Rad51 and Dmc1, the meiotic-specific recombinase [39,40].
135 Recently, the Brca2-Dmc1 interaction has been confirmed in humans [41]. These data thus
136 linked Brca2 to meiotic recombination for the first time.

137
138 The understanding of Brca2 function has been considerably hampered by the early
139 embryonic lethality associated to knocking out BRCA2 in mouse. Clear evidence for the
140 meiotic role of Brca2 came from *A. thaliana* and *C. elegans* since the absence of the Brca2
141 function is viable and only leads to sterility due to meiotic defects in both models [38,39].
142 Indeed, RNAi-inactivation of both *Arabidopsis BRCA2* genes, specifically during meiosis,
143 caused sterile plants resulting from an improper meiosis with chromosomal aberrations:
144 absence of bivalent formation, chromosomal entangling, bridges and fragmentation. This
145 phenotype was dependent on the formation of meiotic DNA double-strand breaks as it was
146 alleviated in a *spo11* mutant [39]. We hypothesized that in *A. thaliana* the chromosomal
147 abnormalities observed upon depletion of Brca2 at meiosis could be the result of an
148 alternative repair of the meiotic DSB, in the absence of HR [39]. In *C. elegans*, Martin et al.
149 (2005) showed that the RNAi depletion of *LIGIV* significantly reduced meiotic chromosome
150 aggregation in *Cebrc-2* single mutants and could give rise to chromosomal fragmentation.
151 These observations suggested that NHEJ could be partially responsible for the aberrant
152 chromosome fusions in the absence of *CeBRC-2*.

153
154 In this study, the meiotic defects previously observed in Brca2-inactivated plants were
155 confirmed in *brca2* double mutant plants containing a T-DNA insertion in each *AtBRCA2*
156 gene. The potential role of alternative DNA repair pathways in the meiotic phenotype was
157 tested by inactivating Brca2 in *nhej* and/or *ssa* mutant backgrounds. We demonstrate that
158 neither NHEJ nor SSA were responsible for the observed cytological defects. Moreover,

159 based on the hypothesis that covalent repair is responsible for the observed meiotic
160 chromosomal defects in the absence of Brca2, we tested the role of a recently characterized
161 plant-specific DNA ligase, AtLigase6. Since the abnormal meiotic figures were maintained in
162 *lig6* plants inactivated for Brca2, the role of this DNA ligase during meiosis in the absence of
163 HR was excluded.

165 RESULTS

167 **A *brca2* double mutant exhibits the same meiotic phenotype as Brca2-inactivated plants.**

168 In a previous study, *AtBRCA2a* and *AtBRCA2b* expression was inactivated during meiosis by
169 RNAi using an inverted 510 pb-fragment of the *BRCA2* cDNA under the control of the
170 meiotic-specific promoter of *DMC1* (*pDMC1*) [39]. In this work, single and double T-DNA
171 insertion mutants for *AtBRCA2* were isolated and their phenotype compared to the RNAi-
172 inactivated plants (named *pDMC1::RNAi/BRCA2*). First, *brca2* plants mutated in the
173 *AtBRCA2* genes *via* either a T-DNA insertion located in the 10th intron of *AtBRCA2a* (in the
174 Cter DNA binding domain) or an insertion in the 4th exon of *AtBRCA2b* (in the Nter domain
175 of the protein, containing the BRC motifs) were isolated (Figure 1A and Figure 1B).
176 *AtBRCA2* transcripts were analysed by RT-PCR, using primers flanking the insertion sites in
177 wild-type and in *brca2* single mutant plants. Transcripts of the disrupted genes were not
178 detected in the corresponding mutant lines, whereas transcripts of each *AtBRCA2* gene were
179 amplified in wild-type plants. This strongly suggested that the two single *brca2* lines were
180 null mutants (Figure 2A). Each single mutant showed normal development and fertility. By
181 crossing the single mutants, the double *brca2a brca2b* mutant was obtained. These latter
182 plants showed no growth defect and behaved as the wild-type under normal greenhouse
183 conditions. However, they were partially sterile producing very short and mostly empty
184 siliques (Figure 3A). Moreover, the presence of meiotic defects was observed after DAPI
185 staining of the chromosomes in the meiocytes. Indeed, all meiotic figures showed
186 chromosomal entangling without bivalent formation, bridges and fragmentation, leading to
187 chromosomal missegregation (Figure 3B) as previously described for *pDMC1::RNAi/BRCA2*
188 plants. A transgene containing a full length *AtBRCA2a* cDNA under the control of the
189 promoter of the meiotic recombinase Dmc1 (*pDMC1::cDNA AtBRCA2a*) was introduced in
190 13 *brca2a brca2b* double mutant plants. 11 transformant plants presented a restored
191 phenotype: 9 were completely fertile as demonstrated by the observation of wild-type siliques
192 content and normal meiosis (Figure 3) and 2 were partially fertile (as they presented some

193 siliques that developed as sterile). Only 1 transformant was sterile with developmental
194 defects. As a control, 11 *brca2a brca2b* double mutant plants were transformed with a
195 transgene containing the pDMC1::RNAi/0 construct, corresponding to the “empty vector”
196 [see 39]: all of them were sterile (data not shown). These results reinforce the evidence for the
197 role of AtBRCA2 at meiosis, previously uncovered by our RNAi strategy.

199 **Characterization of *nhej* and *ssa* mutant plants by RT-PCR and under various** 200 **genotoxic stress.**

201 In order to identify the molecular pathways involved in the aberrant cytological phenotype
202 observed in the Brca2-deficient plants during meiosis, mutant plants deficient in either the
203 NHEJ (*ku80*^{-/-} and *ligIV*^{-/-}) or the SSA (*ercc1*^{-/-}) pathways were characterized. As shown in
204 Figure 2B, all these three genes, and thus the pathways they are involved in, were found
205 expressed in young flower buds, where meiosis takes place, in single as well as in double
206 *brca2* mutant plants. Two mutant lines have been previously described: SALK_044027,
207 where the T-DNA insertion is in exon 6 of the AtLIGIV gene [42,43] and SALK_033397
208 which contains a T-DNA insertion in exon 3 of AtERCCI [16]. The absence of transcripts
209 corresponding to the affected gene was confirmed for each mutant line by RT-PCR using
210 primers flanking each T-DNA insertion (data not shown). The *ku* mutant line used in this
211 study (SALK_112921) had not been characterized to date. It contains a T-DNA in the 6th
212 intron of the AtKU80 gene (Figure 4A). RT-PCR analysis of the 5' and 3' regions flanking
213 the T-DNA insertion revealed the presence of AtKU80 transcripts in both wild-type and *ku80*
214 mutant plants (Figure 4B). However, no transcripts could be detected in *ku80* mutant plants
215 when primers flanking the T-DNA insertion were used, suggesting that splicing of the 6th
216 intron did not occur in the *ku80* mutant. As the insertion site is positioned in the region
217 encoding the domain involved in hetero-dimerization with Ku70, it is most likely that a
218 putative protein, lacking this domain, would be non-functional. Thus, these *ku80* plants were
219 considered as functional null mutants. The mutant plants, whatever the affected DNA repair
220 pathway, exhibited no obvious developmental defects under normal growth conditions and
221 were fertile, as previously described for *ercc1*, *ku80* and *ligIV Arabidopsis* mutants [9,13,16].

222
223 We believed that in the absence of HR during meiosis, the different DNA DSB repair
224 pathways could compensate for each other. Thus, *nhej* mutant plants, *ku80* and *ligIV*, were
225 crossed with *ssa* mutant plants, *ercc1*, and double *ku80 ercc1* and *ligIV ercc1* mutants

226 affected in both pathways were isolated and genotyped. Both double mutants were viable,
227 presented no obvious developmental defects under normal growth conditions and were fertile.

228
229 Sensitivity to various DNA damaging agents is a classical assay to characterize DNA repair
230 mutant plants as most of them show no obvious somatic phenotype. To control that our
231 mutants were indeed affected in DNA repair, their sensitivity to MMS, gamma-ray and UV
232 irradiation was assayed. In comparison to wild-type plants, root growth was affected in the
233 *nhej* plants as well as in the *ssa* plants in the presence of MMS or after gamma exposure.
234 Indeed, the MMS hypersensitivity was visible at 50 ppm and gamma-ray hypersensitivity was
235 observed at 100 grays for each single mutant line. However, MMS-induced retarded growth
236 was more pronounced in *ercc1* than in *ku80* and *ligIV* plants (Figure 5A). MMS is a
237 methylating agent, and due to the occurrence and clustering of modified bases, it can generate
238 both SSB and DSB, which is reflected in the fact that *ercc1* mutants (deficient for both SSA
239 and BER) appeared to be more sensitive to this genotoxic treatment. Reciprocally, *ercc1*
240 plants were less sensitive to gamma irradiation when compared to *ku80* and *ligIV* (Figure 5B).
241 Ionising radiations mainly give rise to clustered DNA damages (modified bases and abasic
242 sites) that lead to DNA DSB. Such DNA strand breaks are mostly repaired by NHEJ as
243 suggested by the higher hypersensitivity of *ku80* and *ligIV* mutants to gamma-rays. Finally, as
244 expected, only the *ercc1* plants were hypersensitive to UV exposure (Figure 5C). All of these
245 results confirmed that the different mutant *Arabidopsis* lines were affected in DNA DSB
246 repair.

247
248 MMS and gamma-ray sensitivity of the double *nhej ssa* mutants were assessed in comparison
249 to the single mutant plants (Figure 5). For each stress, we noted that the sensitivity of the
250 double mutant was similar to that observed for the most affected single mutant: *ku80 ercc1*
251 and *ligIV ercc1* appeared to be hypersensitive to MMS and UV as was the *ercc1* single
252 mutant, whereas they showed a similar hypersensitivity to gamma-rays as the *nhej* single
253 mutant. Therefore, no cumulative effect was observed.

254 **The *brca2* meiotic phenotype is maintained during meiosis in *nhej* and *ssa* backgrounds.**

255 The Brca2 function was inactivated in the *nhej* and *ssa* mutant plants by transforming the
256 mutant plants with the previously used *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct. As a control, mutant
257 plants were also transformed with a *pDMC1::RNAi/0* construct containing no insert [see 39].
258 No somatic phenotype was observed in any of the transformed plants containing the “empty”
259

260 construct or the *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct. When flowers emerged, all plants
261 containing the control construct were fertile, whereas most of the mutant plants transformed
262 with *pDMC1::RNAi/BRCA2* were partially sterile in the single *nhej* or *ssa* mutants (between
263 67 to 80%) as well as in the double *nhej ssa* mutants (between 60 to 78%), as previously
264 observed for wild-type *pDMC1::RNAi/BRCA2* transformed plants.

265
266 The meiotic behaviour was examined after DAPI staining of the chromosomes in the
267 meiocytes of several independent transformed plants that were inactivated for the *Brca2*
268 function: 175 meiotic figures from two *ku80*, 170 meioses from two *ligIV* and 34 meioses
269 from two *ercc1* lines independently transformed with the *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct
270 were observed. As a control, they were compared to the meioses of one *ku80*, one *ligIV* and
271 one *ercc1* plant containing the *RNAi/0* construct. All of the observed control plant meiotic
272 figures were normal in the single mutants affected for either NHEJ (*ku80*, *ligIV*) or SSA
273 (*ercc1*), as well as in the *nhej ssa* double mutant (Supplementary Figure S1). On the other
274 hand, meiosis was profoundly disturbed in meiocytes of these same mutant lines transformed
275 with the *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct: chromosomal entangling without bivalent
276 formation, fragmentation, and missegregation of chromosomes (Figure 6). Such observations
277 have been previously reported in wild-type *pDMC1::RNAi/BRCA2* plants [39]. These
278 observations suggested that, contrary to our hypothesis, in the absence of *Brca2* during
279 meiosis, neither NHEJ nor SSA were responsible for an alternative meiotic DSB repair that
280 would have been revealed because of the absence of HR [39]. The impact of the inactivation
281 of both pathways in the absence of *Brca2* during meiosis was also examined. Meiotic figures
282 from one *pDMC1::RNAi/BRCA2* transformant for *ercc1 ku80* (257 meiotic events, among
283 them 80 were post-prophase) and two *pDMC1::RNAi/BRCA2* transformants for *ercc1 lig4*
284 (115 meiosis, including 63 post-prophase stages) were observed. In all double mutant plants
285 transformed with *pDMC1::RNAi/BRCA2*, the *brca2* meiotic phenotype remained unaltered
286 (Figure 6).

287
288 All of these results suggest that 1) the aberrant chromosomal figures observed in the absence
289 of *Brca2* during meiosis are not due to NHEJ or SSA and 2) the other major DNA DSB repair
290 pathways, in the absence of HR, do not compensate for each other during meiosis.

291 292 **DNA Ligases in *Arabidopsis***

293 Our initial hypothesis was that the chromosomal bridges detected in the “failed” anaphases in
1 294 the absence of Brca2 were due to covalent DNA links, probably between non-homologous
2 295 chromosomes. Since our data exclude the role of NHEJ and SSA, all DNA ligases apart from
3 296 LigaseIV (the NHEJ specific enzyme already studied in this work) could be potentially
4 297 incriminated. The *Arabidopsis* genome contains three other sequences encoding DNA ligases:
5 298 *AtLigase1* which is involved in replication and Base Excision Repair (BER), *AtLigase1a*
6 299 which shares 71% identity with *AtLigase1* but for which no transcripts could be detected (our
7 300 personal data and transcriptome analyses: [http://csbdb.mpimp-
8 301 golm.mpg.de/csbdb/dbxp/ath/ath_xpmsgg.html](http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/dbxp/ath/ath_xpmsgg.html)), suggesting that it may be a pseudogene, and
9 302 *AtLigase6*, a plant specific ligase that appears to be involved in seed longevity [44].
10 303 *AtLigase6* has a highly conserved DNA ligase catalytic domain and a beta-lactamase domain
11 304 containing a beta-CASP motif found in Artemis and other proteins known to play a role in
12 305 nucleic acid processing [45,46]}. Since *lig1* mutant plants are embryonic lethal [47,48], we
13 306 thus examined whether the plant specific *AtLigase6* could be involved in the meiotic
14 307 phenotype of the Brca2-deficient plants.
15 308

29 309 Homozygous *lig6* plants containing a T-DNA insertion in exon 11 of the gene were obtained
30 310 from the SALK collection (SALK_065307) (Figure 7A). All plants grew normally, they were
31 311 fertile and undertook normal meioses (data not shown). These observations are in agreement
32 312 with what was previously observed in a different *lig6* insertional line (Waterworth et al, 2010)
33 313 [44]. RT-PCR analyses detected transcripts on both sides of the T-DNA insertion but no
34 314 transcripts could be found when primers flanking the T-DNA insertion were used (Figure
35 315 7B). As the T-DNA insertion is positioned in an exon, 42 bp from the codon of the catalytic
36 316 lysine just upstream from the conserved motif II [49] lying in the core domain, and more
37 317 specifically around the nucleotide binding pocket responsible for the nucleotidyl transfer, the
38 318 catalytic activity of a putatively expressed protein in this mutant is probably non-functional.
39 319

40 320 **DNA Ligase6 is not responsible for the *brca2* meiotic phenotype**

41 321 Waterworth et al. (2010) observed a slight but significant growth hypersensitivity of *lig6*
42 322 plants after a 100 Gy X-ray irradiation, leading them to suggest that *AtLigase6* could play a
43 323 minor role in the repair of X-ray induced DNA damage. Transformation of our *lig6* mutant
44 324 plants with *pDMC1::RNAi/BRCA2* was performed to inactivate the Brca2 function in *lig6*
45 325 plants. 87% of the transformants (26/30) were partially sterile while *lig6* plants or
46 326 *pDMC1::RNAi/0* transformed plants (six transformed plants, 57 meioses observed from two
47 327

327 independent transformants) were normally fertile (Supplementary Figure S1). After DAPI
328 staining of the chromosomes in the meiocytes of seven *lig6* plants, independently transformed
329 with the *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct (426 meiotic figures, including 219 post-prophase
330 events), the *brca2* meiotic phenotype was consistently observed (Figure 6), thus excluding a
331 role of *AtLigase6* in this phenotype.

332 333 **DISCUSSION**

334 In *Arabidopsis*, RNAi-inactivation of *Brca2* during meiosis gave rise to a sterility phenotype
335 due to an aberrant meiosis characterized by an absence of bivalent formation, chromosomal
336 entangling, fragmentation and missegregation. Such defects were Spo11-dependant, therefore
337 an alternative DNA repair process was proposed to be responsible for an aberrant repair of
338 meiotic DSB in the absence of HR. In this study, we show that *brca2* double mutant plants
339 exhibit a similar meiotic phenotype when compared to the *pDMC1::RNAi/BRCA2*
340 transformed plants. Moreover, our data clearly exclude the role of NHEJ and SSA in the
341 aberrant meiotic chromosomal figures of *Brca2*-deficient plants.

342 343 **Phenotypic characteristics of *Brca2*-deficient plants**

344 In this study, double *brca2a brca2b* mutant plants were shown to have no obvious phenotype
345 in terms of vegetative growth, contrary to the occasional fasciation described by Abe et al.
346 (2009). This may be explained by the use of different ecotypes. However, the double *brca2*
347 mutant displayed the same meiotic phenotype as previously described for
348 *pDMC1::RNAi/BRCA2* transformed plants. Each single mutant was fertile, indicating the
349 functional redundancy of the two *AtBRCA2* genes at meiosis [50,51]. This could not have
350 been concluded from the *pDMC1::RNAi/BRCA2* transformed plants, as both *AtBRCA2* genes
351 were silenced by the RNAi construct. Previously it was found that *pDMC1::RNAi/BRCA2*
352 transformed plants produced a few seeds that could have arisen from a partial silencing of the
353 *AtBRCA2* genes. However, this does not appear to be the reason since in the present study, a
354 few seeds were also produced by the double mutant plants (Figure 3A). Preliminary
355 experiments showed that the seeds germinated, producing *brca2* double mutant plants that
356 developed normally, although not fertile. This could mean that in the absence of *Brca2*, HR
357 could be partially functional and give rise to some rare normal meiosis events that were not
358 detected in our observations. Alternatively, the abnormal meiosis we observed may not be
359 always detrimental to the chromosomes. It will be of interest to follow the *brca2* cumulative

360 phenotypes from generation to generation, to check if their meiotic (and somatic) phenotypes
1 361 become exacerbated.

3 362

5 363 **NHEJ and SSA do not compensate for HR deficiency during meiosis**

7 364 Our analyses of the chromosomes in the meiocytes by DAPI staining in the double *brca2a*
8
9 365 *brca2b* mutants revealed that the depletion of Brca2 during meiosis led to the absence of
10
11 366 bivalent formation and to chromosome aggregates, thus confirming our previous study of
12
13 367 plants transformed with the *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct. In anaphase I, aberrant bridges
14
15 368 between chromosomes were systematically observed. We hypothesized that these defects
16
17 369 were due to covalent repair of meiotic DBS. NHEJ was the main candidate pathway we
18
19 370 believed responsible for these aberrant chromosomal figures. FISH experiments would not
20
21 371 have proven that the chromosomes involved in these anaphase bridges were covalently linked,
22
23 372 just that they were occasionally aberrantly “associated”. Thus, the Brca2 function was
24
25 373 inactivated in NHEJ- but also in SSA-deficient plants. In contrast to *C. elegans*, a role of
26
27 374 NHEJ in these meiotic defects can now be excluded, since these aberrant chromosome
28
29 375 aggregates were still present in the meiocytes of plants defective in NHEJ [38]. A similar
30
31 376 conclusion can be drawn in the case of the SSA-deficient plants. Furthermore, the additive
32
33 377 disruption of both the NHEJ and SSA pathways did not modify the *brca2* meiotic phenotype.
34
35 378 This demonstrates that, in contrast to somatic cells where deletions and translocations can
36
37 379 occur in mutants defective in HR due to the error-prone repair of accidental DNA DSB *via*
38
39 380 NHEJ or SSA, neither of these two major DNA DSB repair pathways can compensate for the
40
41 381 absence of HR during meiosis in *Arabidopsis*. During meiosis, as the introduction of DNA
42
43 382 DSB is programmed, inhibition of the NHEJ and SSA pathways must be very strong to
44
45 383 prevent them to compete for or to replace HR. More generally, it is conceivable that the DNA
46
47 384 repair processes that are initiated by programmed DNA DSB must be very carefully
48
49 385 controlled. If neither NHEJ nor SSA are responsible for the meiotic defects of Brca2 deficient
50
51 386 plants, we cannot exclude the role of alternative DNA DSB repair pathways, such as the
52
53 387 backup end-joining pathway involving Xrcc1[52]. Hence, further studies should be addressed
54
55 388 to analyse meiosis in triple mutants, deficient for all three pathways, in Brca2-inactivated
56
57 389 plants. However, recent data suggest that DNA DSB are still repaired in somatic cells of
58
59 390 irradiated plants, defective for HR, SSA, NHEJ and backup end-joining, suggesting that other
60
61 391 DNA DSB repair process probably remain to be discovered [53].

58 392

60 393 **Covalent repair or not ?**

394 To better understand the molecular mechanisms responsible for the chromosomal bridges
1 395 observed during meiotic anaphases in the absence of Brca2, we investigated the putative role
2 396 of DNA ligases. Four potential DNA ligases have been identified in *Arabidopsis*: the essential
3 397 *AtLIGASE1* involved in DNA replication and BER, *AtLIGASE1a*, the NHEJ-specific
4 398 *AtLIGASEIV*, and the plant-specific *AtLIGASE6*. As *AtLIGASE1a* seems to be a pseudogene,
5 399 it was excluded from our study. Our results show that the NHEJ specific DNA LigaseIV and
6 400 the plant-specific Ligase6 were not involved in the meiotic chromosomal defects resulting
7 401 from the absence of Brca2. Thus, a putative role of a plant DNA ligase activity remains an
8 402 open question. It is difficult to study the role of DNA Ligase1 as it is essential to DNA
9 403 replication driving homozygous *lig1* mutant plants to be embryo-lethal [47,48]. In order to
10 404 by-pass the lethality of the *lig1* mutant, Waterworth et al (2009) reduced the expression of
11 405 *AtLIGASE1* using an RNAi construct that was set under the control of the ubiquitous
12 406 CaMV35S promoter [47]. The partially inactivated plants exhibited precocious flowering but
13 407 as their growth and development were strongly affected, it was difficult to describe them as
14 408 clearly fertile. Hence, it would be interesting to undertake a meiosis-specific inhibition of
15 409 *AtLIGASE1* expression using the *pDMC1* meiotic promoter, as previously carried out for
16 410 Brca2. Otherwise, another possibility to consider is that the chromosomes are not covalently
17 411 linked and that other proteins involved in chromatid cohesion and synapsis could help
18 412 maintain the aberrant chromosome associations observed in the absence of Brca2.

36 414 MATERIALS AND METHODS

40 416 Plant material and growth conditions

41 417 *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype were used in this study. Mutant lines were identified
42 418 in the T-DNA express database of the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
43 419 (<http://signal.salk.edu>). The insertional mutant affected in *AtERCC1* (line SALK_033397)
44 420 and in *AtLIGIV* (line SALK_044027) have been described previously [16,42,43] as well as
45 421 the *AtBRCA2b* insertion line (SALK_037617) [50]. The newly characterized mutant lines
46 422 were GABI_290C01 for *AtBRCA2a*, SALK_112921 for *AtKU80* and SALK_065307 for
47 423 *AtLIGASE6*. Wild-type and mutant *Arabidopsis* plants were cultivated in a greenhouse at 23
48 424 °C under long day conditions (16 h light, 8 h dark, humidity 75%).

58 426 Isolation of genomic DNA and genotyping of the plants

427 Plants were genotyped by PCR performed on genomic DNA extracted from leaves of 2-3
1 428 week-old plants in Edwards' buffer [54]. 1/50 of the extracted DNA was used as a template
2 429 for PCR with two gene-specific primers and one primer specific for the left border of the T-
3 430 DNA (Salk or Gabi-Kat, depending on the mutant lines) in separate reactions (see Table1 and
4 431 Figures 1, 3 and 6). The wild-type allele was amplified with oligonucleotides 721/722 for the
5 432 *AtBRCA2a* locus, 328/404 for *AtBRCA2b*, 177/178 for *AtKU80*, and 510/509 for
6 433 *AtLIGASE6*. The mutant allele was detected using primer 88 (LBa1) for SALK T-DNA lines
7 434 or 87 (08409) for Gabi-Kat T-DNA lines and primer 772 for the *AtBRCA2a* locus, 404 for
8 435 *AtBRCA2b*, 178 for *AtKU80*, or 509 for *AtLIGASE6*. PCR reactions were performed in a
9 436 20µl final volume, with 0.2mM of dNTPs, 5mM MgCl₂, 1µM of each primer, 1U of Taq
10 437 DNA polymerase (Invitrogen™). They were incubated in a 2720 Thermocycler (Applied
11 438 Biosystem) at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s and 72°C
12 439 for 1 min, except for the PCR on the *AtBRCA2* genes where the annealing step was performed
13 440 at 52°C for 30 s. The PCR samples were then visualized after migration on 0.7% agarose gels
14 441 in the presence of ethidium bromide.
15 442

29 443 **RNA isolation and RT-PCR analyses**

30 444 Total RNA was extracted from leaves or floral buds of 2-3 week-old individual plants with
31 445 the NucleoSpin® RNA Plant (Macherey-Nagel) according to the manufacturers'
32 446 specifications. 2 µg of total RNA was used as a template for reverse-transcription with the RT
33 447 ImProm II™ (Promega) and oligod(T) as a primer. 1/20 of the RT reactions were used as a
34 448 template for PCR in a total volume of 50 µl. The quality of the RT reaction was controlled by
35 449 examining actin expression by PCR using primers act-464 and act-465. For *AtBRCA2a* and
36 450 *AtBRCA2b* cDNAs, specific primers flanking the T-DNA insertion were designed:
37 451 873/798 and 328/799 respectively (see Table 1 and Figure 1). For *AtKU80*, specific primers
38 452 were designed 5' to the insertion (456/457), flanking the T-DNA insertion (454/455) and 3' to
39 453 the T-DNA (458/459) (see Table 1 and Figure 4). For *AtLIGIV* and *AtERCC1* cDNAs,
40 454 specific oligonucleotides were designed flanking their respective T-DNA insertion site: the
41 455 336/445 pair for *AtLIGIV* and the 452/453 pair for *AtERCC1* (see Table 1 for sequences). For
42 456 *AtLIGASE6*, specific primers were designed 5' to the insertion (637/638), flanking the T-
43 457 DNA insertion (686/640) and 3' to the T-DNA (641/642) (see Table 1 and Figure 7). The
44 458 PCR was as follows: 94°C for 3 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 50°C or 52°C for
45 459 30 s and 72°C for 1 min, except for the *ACTIN* gene (see Table1 for sequences of the ACT2
46 460
47 461
48 462
49 463
50 464
51 465

460 primers) where the elongation step was performed at 58°C for 30 s. 20 µl of the RT-PCR
1 461 reaction were then loaded onto a 3% agarose gel (NuSieve) in the presence of ethidium
2 462 bromide for visualization.
3
4

5 463 6 7 464 **pDMC1:: cDNA AtBRCA2a construct**

8
9 465 The full length cDNA of AtBRCA2a was previously cloned in pUC18 as described in [39]. It
10 466 was subsequently subcloned first into pKannibal [55] and then into the *XhoI*-*SpeI*-restricted
11 467 pPF408 to be set under the pDMC1 promoter control [39].
12
13
14

15 468 16 469 **In vitro assays for sensitivity to MMS, gamma-rays and UV**

17
18 470 Seeds were surface-sterilized with a solution containing 50% bleach diluted in EtOH.
19
20 471 Sterilized seeds were sown on MS 0.5 agar media (Kalys) containing 1% sucrose and
21
22 472 supplemented with 0, 50, 60, 70, 80 or 90 ppm of MMS and then set at 4°C in the dark for
23
24 473 48h to synchronize germination, before being placed vertically in the growth chamber for 14
25
26 474 days to allow the roots to grow along the agar surface. For irradiation experiments, sterilized
27 475 seeds stored at 4°C in the dark were exposed to 0, 100 or 200 Grays from a ¹³⁷Cs source at a
28
29 476 dose rate of approximately 50 gy.min⁻¹ (IBL-637 (CIS-BioInternational), Institut Curie,
30
31 477 Orsay). After irradiation, they were sown on MS 0.5 agar media and set vertically in a growth
32
33 478 chamber. After 11 days, root growth was observed. For UV experiments, sterilized seeds were
34
35 479 sown on MS 0.5 agar and after 4 days of vertical growth, the plantlets were exposed to 540
36 480 J.m⁻² of UV-C (254 nm). The plates were then 90 degrees rotated, set in the dark for 3 days to
37
38 481 avoid photoreactivation and then exposed 3 days to light to observe the recovery of main root
39
40 482 growth of each seedling during two weeks.
41
42

43 483 44 484 **Plant crosses**

45 485 Since all single mutants used in this study were fertile, double mutants were obtained by
46 486 crossing two homozygous mutants affected in the gene of interest. Double mutants were
47
48 487 identified by PCR of the F2 population obtained by self-fertilisation of F1 plants
49
50 488 heterozygous for both genes.
51
52

53 489 54 490 **Transformation of plants with RNAi constructs**

55 491 The RNAi constructs aimed at silencing both *BRCA2* genes and the control without any insert
56
57 492 were previously described in [39]. Plant transformations were carried out by floral dip as
58
59 493 described previously [56]. T1 transformants were selected on sand supplemented with Basta®
60
61
62
63
64
65

494 and transferred to soil pots. Approximately one to two weeks after, the selected transformed
1 495 plants were sprayed with Basta® (4% ammonium glufosinate) for a second control of their
2 496 resistance.
3
4

5 497
6

7 498 **DAPI staining and cytology**

8
9 499 The flower buds or the siliques were fixed in a solution of absolute ethanol and acetic acid
10
11 500 (3/1 v/v) at room temperature. Chromosome spreads were prepared as in [57]. Photographs
12
13 501 were captured using a Photometrics CoolSNAP EZ camera driven by Metavue 7.0 r4
14
15 502 software.

16 503 Fixed siliques were placed in ethanol 70% during 2 h, and then in a chloralhydrate solution
17
18 504 (8g/3ml glycerol 66%) during a night in the dark. Images were captured on a Zeiss stereo-
19
20 505 microscope Stemi SV1 with a SONY camera driven by Zeiss Axiovision Software.

21
22 506 All images were further processed with Adobe Photoshop CS2.
23

24 507

25 508 **ACKNOWLEDGEMENTS**

26 509
27
28

29 510 We are grateful to Thierry Lagrange and Sylvie Lamy for kindly providing the T-DNA
30
31 511 insertion line disrupted in *AtBRCA2a* (GK_290C01) and PCR genotyping conditions, Sophie
32
33 512 Blanchet for the *ACTIN* primers (*ACT2*) and PCR conditions for RT-PCR. The service of Dr
34
35 513 V. Favaudon at Institut Curie (Orsay) is thanked for access to the ¹³⁷Cs irradiator. We also
36
37 514 thank Michael Hodges and Mireille Bétermier for critical reading of the manuscript, and
38
39 515 Guillaume Blayo and Patricia Racine for their technical contribution. This work was
40
41 516 supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université Paris Sud-
42
43 517 11. M.D. is the recipient of a French Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la
44
45 518 Recherche doctoral fellowship.
46

47 519

48 520 **REFERENCES**

- 49 521
50 522 1. Daley JM, Palmboos PL, Wu D, Wilson TE (2005) Nonhomologous end joining in yeast.
51
52 523 Annu Rev Genet 39: 431-451.
53
54 524 2. Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the
55
56 525 nonhomologous DNA end-joining pathway. Annu Rev Biochem 79: 181-211.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 526 3. Tamura K, Adachi Y, Chiba K, Oguchi K, Takahashi H (2002) Identification of Ku70 and
1 527 Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA
2 528 double-strand breaks. *Plant J* 29: 771-781.
- 5 529 4. Riha K, Watson JM, Parkey J, Shippen DE (2002) Telomere length deregulation and
6 530 enhanced sensitivity to genotoxic stress in *Arabidopsis* mutants deficient in Ku70.
7 531 *Embo J* 21: 2819-2826.
- 10 532 5. Friesner J, Britt AB (2003) Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to
11 533 ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J* 34: 427-440.
- 14 534 6. West CE, Waterworth WM, Jiang Q, Bray CM (2000) *Arabidopsis* DNA ligase IV is
15 535 induced by gamma-irradiation and interacts with an *Arabidopsis* homologue of the
16 536 double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* 24: 67-78.
- 19 537 7. West CE, Waterworth WM, Story GW, Sunderland PA, Jiang Q, et al. (2002) Disruption of
20 538 the *Arabidopsis* AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in
21 539 efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant J* 31: 517-528.
- 25 540 8. Bundock P, van Attikum H, Hooykaas P (2002) Increased telomere length and
26 541 hypersensitivity to DNA damaging agents in an *Arabidopsis* KU70 mutant. *Nucleic*
27 542 *Acids Res* 30: 3395-3400.
- 30 543 9. Gallego ME, Bleuyard JY, Daoudal-Cotterell S, Jallut N, White CI (2003) Ku80 plays a
31 544 role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in
32 545 *Arabidopsis*. *Plant J* 35: 557-565.
- 36 546 10. Wang YK, Chang WC, Liu PF, Hsiao MK, Lin CT, et al. (2010) Ovate family protein 1 as
37 547 a plant Ku70 interacting protein involving in DNA double-strand break repair. *Plant*
38 548 *Mol Biol* 74: 453-466.
- 41 549 11. van Attikum H, Bundock P, Overmeer RM, Lee LY, Gelvin SB, et al. (2003) The
42 550 *Arabidopsis* AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the
43 551 integration of *Agrobacterium* T-DNA. *Nucleic Acids Res* 31: 4247-4255.
- 47 552 12. Preuss SB, Jiang CZ, Baik HK, Kado CI, Britt AB (1999) Radiation-sensitive *Arabidopsis*
48 553 mutants are proficient for T-DNA transformation. *Mol Gen Genet* 261: 623-626.
- 50 554 13. Hefner E, Preuss SB, Britt AB (2003) *Arabidopsis* mutants sensitive to gamma radiation
51 555 include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J Exp Bot* 54: 669-680.
- 54 556 14. Fidantsef AL, Mitchell DL, Britt AB (2000) The *Arabidopsis* UVH1 gene is a homolog of
55 557 the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiol* 124: 579-586.
- 58 558 15. Dubest S, Gallego ME, White CI (2002) Role of the AtRad1p endonuclease in
59 559 homologous recombination in plants. *EMBO Rep* 3: 1049-1054.

- 560 16. Dubest S, Gallego ME, White CI (2004) Roles of the AtErcc1 protein in recombination.
1 561 Plant J 39: 334-342.
- 3 562 17. McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW (1993) Mice with DNA repair
4 563 gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and
5 564 die before weaning. Nat Genet 5: 217-224.
- 8 565 18. Weeda G, Donker I, de Wit J, Morreau H, Janssens R, et al. (1997) Disruption of mouse
9 566 ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities
10 567 and senescence. Curr Biol 7: 427-439.
- 14 568 19. Tian M, Shinkura R, Shinkura N, Alt FW (2004) Growth retardation, early death, and
15 569 DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF.
16 570 Mol Cell Biol 24: 1200-1205.
- 19 571 20. Neale MJ, Pan J, Keeney S (2005) Endonucleolytic processing of covalent protein-linked
20 572 DNA double-strand breaks. Nature 436: 1053-1057.
- 23 573 21. Hartsuiker E, Mizuno K, Molnar M, Kohli J, Ohta K, et al. (2009) Ctp1CtIP and
24 574 Rad32Mre11 nuclease activity are required for Rec12Spo11 removal, but Rec12Spo11
25 575 removal is dispensable for other MRN-dependent meiotic functions. Mol Cell Biol 29:
26 576 1671-1681.
- 30 577 22. Milman N, Higuchi E, Smith GR (2009) Meiotic DNA double-strand break repair requires
31 578 two nucleases, MRN and Ctp1, to produce a single size class of Rec12 (Spo11)-
32 579 oligonucleotide complexes. Mol Cell Biol 29: 5998-6005.
- 36 580 23. Cole F, Keeney S, Jasin M (2010) Evolutionary conservation of meiotic DSB proteins:
37 581 more than just Spo11. Genes Dev 24: 1201-1207.
- 39 582 24. San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous
40 583 recombination. Annu Rev Biochem 77: 229-257.
- 43 584 25. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, et al. (1995) Identification of the
44 585 breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378: 789-792.
- 47 586 26. Scully R, Livingston DM (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1
48 587 and BRCA2. Nature 408: 429-432.
- 50 588 27. West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. Nat Rev
51 589 Mol Cell Biol 4: 435-445.
- 54 590 28. Jasin M (2002) Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA
55 591 connection. Oncogene 21: 8981-8993.

- 592 29. Yu VP, Koehler M, Steinlein C, Schmid M, Hanakahi LA, et al. (2000) Gross
1 593 chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous
2 594 chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* 14: 1400-1406.
- 5 595 30. Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regel E, et al. (1997) Embryonic
6 596 lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2.
7 597 *Nature* 386: 804-810.
- 10 598 31. Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL (1997) RAD51 interacts with
11 599 the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility
12 600 gene brca2. *J Biol Chem* 272: 31941-31944.
- 16 601 32. Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, et al. (2002) Insights into DNA
17 602 recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420: 287-293.
- 20 603 33. Tarsounas M, Davies AA, West SC (2004) RAD51 localization and activation following
21 604 DNA damage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 87-93.
- 23 605 34. Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC (2010) Purified human BRCA2 stimulates
24 606 RAD51-mediated recombination. *Nature* 467: 678-683.
- 27 607 35. Thorslund T, McIlwraith MJ, Compton SA, Lekomtsev S, Petronczki M, et al. (2010) The
28 608 breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to
29 609 single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1263-1265.
- 32 610 36. Liu J, Doty T, Gibson B, Heyer WD (2010) Human BRCA2 protein promotes RAD51
33 611 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* 17:
34 612 1260-1262.
- 37 613 37. Kojic M, Kostrub CF, Buchman AR, Holloman WK (2002) BRCA2 homolog required for
38 614 proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*.
39 615 *Mol Cell* 10: 683-691.
- 43 616 38. Martin JS, Winkelmann N, Petalcorin MI, McIlwraith MJ, Boulton SJ (2005) RAD-51-
44 617 dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein
45 618 during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 25: 3127-3139.
- 47 619 39. Siaud N, Dray E, Gy I, Gerard E, Takvorian N, et al. (2004) Brca2 is involved in meiosis
48 620 in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. *Embo J* 23: 1392-
49 621 1401.
- 52 622 40. Dray E, Siaud N, Dubois E, Doutriaux MP (2006) Interaction between *Arabidopsis* Brca2
53 623 and its partners Rad51, Dmc1, and Dss1. *Plant Physiol* 140: 1059-1069.
- 56 624 41. Thorslund T, Esashi F, West SC (2007) Interactions between human BRCA2 protein and
57 625 the meiosis-specific recombinase DMC1. *Embo J* 26: 2915-2922.

- 626 42. Heacock ML, Idol RA, Friesner JD, Britt AB, Shippen DE (2007) Telomere dynamics and
1 627 fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV. *Nucleic*
2 628 *Acids Res* 35: 6490-6500.
- 5 629 43. Tanaka S, Ishii C, Hatakeyama S, Inoue H (2010) High efficient gene targeting on the
6 630 AGAMOUS gene in an *Arabidopsis AtLIG4* mutant. *Biochem Biophys Res Commun*
7 631 396: 289-293.
- 10 632 44. Waterworth WM, Masnavi G, Bhardwaj RM, Jiang Q, Bray CM, et al. (2010) A plant
11 633 DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J* 63: 848-860.
- 14 634 45. Callebaut I, Moshous D, Mornon JP, de Villartay JP (2002) Metallo-beta-lactamase fold
15 635 within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Res*
16 636 30: 3592-3601.
- 19 637 46. Bonatto D, Revers LF, Brendel M, Henriques JA (2005) The eukaryotic
20 638 Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers.
21 639 *Braz J Med Biol Res* 38: 321-334.
- 25 640 47. Waterworth WM, Kozak J, Provost CM, Bray CM, Angelis KJ, et al. (2009) DNA ligase
26 641 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA
27 642 single and double strand breaks. *BMC Plant Biol* 9: 79.
- 31 643 48. Andreuzza S, Li J, Guitton AE, Faure JE, Casanova S, et al. (2010) DNA LIGASE I
32 644 exerts a maternal effect on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*
33 645 137: 73-81.
- 36 646 49. Timson DJ, Singleton MR, Wigley DB (2000) DNA ligases in the repair and replication
37 647 of DNA. *Mutat Res* 460: 301-318.
- 39 648 50. Wang S, Durrant WE, Song J, Spivey NW, Dong X (2010) *Arabidopsis* BRCA2 and
40 649 RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant
41 650 immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 22716-22721.
- 45 651 51. Abe K, Osakabe K, Ishikawa Y, Tagiri A, Yamanouchi H, et al. (2009) Inefficient double-
46 652 strand DNA break repair is associated with increased fasciation in *Arabidopsis*
47 653 BRCA2 mutants. *J Exp Bot* 60: 2751-2761.
- 50 654 52. Charbonnel C, Gallego ME, White CI (2010) Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA
51 655 double-strand break repair kinetics in *Arabidopsis* plants. *Plant J* 64: 280-290.
- 54 656 53. Charbonnel C, Allain E, Gallego ME, White CI (2011) Kinetic analysis of DNA double-
55 657 strand break repair pathways in *Arabidopsis*. *DNA Repair (Amst)* in press.
- 58 658 54. Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the
59 659 preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349.

- 660 55. Helliwell C, Waterhouse P (2003) Constructs and methods for high-throughput gene
1 661 silencing in plants. *Methods* 30: 289-295.
- 3 662 56. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated
4 663 transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743.
- 7 664 57. Couteau F, Belzile F, Horlow C, Grandjean O, Vezon D, et al. (1999) Random
8 665 chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of
9 666 a *dmc1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11: 1623-1634.

667 668 **FIGURE LEGENDS**

669 670 **Figure 1: The *brca2* single and double mutants**

671 **(A)** Position of the T-DNA insertions in *AtBRCA2a* and *AtBRCA2b*. The structure of the
672 *AtBRCA2a* and *AtBRCA2b* genes is represented by shaded boxes (exons) and thin lines
673 (introns). The T-DNA insertion position is indicated. Each primer pair used to identify the
674 mutants by PCR are compiled on the diagram in black and primer pairs used for RT-PCR
675 analyses are given in red; their localization is correct but not to scale.

676 **(B)** Schematically represented Brca2 protein with the position of the BRC repeats and the
677 NLS relative to the T-DNA insertions, as indicated by a star. For convenience, and because
678 they share 94.5% of identity, a single Brca2 protein is represented.

679 680 **Figure 2: Expression of *BRCA2* genes and of genes involved in NHEJ and SSA in floral 681 buds of *brca2* single and double mutants.**

682 RNA was extracted from young floral buds of wild-type plants (2 different plants, a and b) as
683 well as of *brca2a*, *brca2b* and *brca2a brca2b* (2 different plants, a and b) mutant plants and
684 was then reverse-transcribed. Double-stranded cDNAs were then PCR-amplified. The
685 constitutive *ACTIN* gene transcript, used as a control, is presented only in part A of the figure.

686 **(A)** RT-PCR analysis of *AtBRCA2* transcripts in the single and double *brca2* mutants.
687 Double-stranded cDNAs were PCR-amplified using the primer pairs represented in red in
688 Figure 1A.

689 **(B)** RT-PCR analysis of genes involved in NHEJ and SSA in the single and double *brca2*
690 mutants. Double-stranded cDNAs were PCR-amplified using primer pair 454/455 for
691 *AtKU80* (see primer positions in Figure 4 and sequences in Table1), 336/445 for *AtLIGIV* and
692 452/453 for *AtERCC1* (see Table 1 for sequences).

694

1
2 **695 Figure 3: Meiotic defects in *brca2a brca2b* mutant plants and in wild-type *Brca2-***
3 **696 *inactivated* plants.**

4
5 697 (A) Wild-type and *brca2* double mutant plants exhibit no growth defect except for sterility.
6
7 698 Chloralhydrate discolored siliques are full of seeds in wild-type plants in comparison with the
8
9 699 discolored siliques of the *brca2* double mutant plants.

10
11 700 (B) Observation of meiocytes by DAPI staining in *Brca2*-deficient plants, transformed or not
12
13 701 with the full length cDNA of *AtBRCA2a*, and in *brca2a brca2b* homozygous double mutant
14
15 702 plants. (A-E) Different stages of meiosis in the wild-type plants. Meiosis is normal. (A)
16
17 703 Prophase I stage, (B) diakinesis, the five bivalents are attached by a chiasma, (C) metaphase I
18
19 704 with five aligned bivalents, (D) anaphase I, bivalents segregate into two sets of five
20
21 705 univalents, (E) anaphase II, with four groups that contain five chromosomes each after sister
22
23 706 chromatid separation.

24
25 707 (F-J) Different stages of meiosis in wild-type plants transformed with the
26
27 708 *pDMC1::RNAi/BRCA2* construct. (F) Prophase I, (G) no normal diakinesis phase (H)
28
29 709 metaphase I with condensed and entangled chromosomes, (I) anaphase I, with entangled and
30
31 710 stretched chromosomes. (J) Anaphase II, with bridges extending between chromosomes.

32
33 711 (K-O) Different stages of meiosis in *brca2* double mutant plants. (K) Prophase I, (L)
34
35 712 anaphase I, entangled and stretched chromosomes. (M) Metaphase II with entangled
36
37 713 chromosomes. (N) anaphase II, fragmented chromosomes. (O) telophase II with
38
39 714 chromosome missegregation.

40
41 715 (P-T) Different stages of meiosis in *brca2* double mutant plants, transformed with the
42
43 716 *pDMC1::cDNA AtBRCA2a*. Meiosis is restored to normal. (P) Prophase I stage, (Q)
44
45 717 diakinesis, (R) metaphase I, (S) anaphase I, (T) anaphase II.

46
47 718 Bar 10 μ m.

48
49 719

50
51 **720 Figure 4: T-DNA insertion and expression in *ku80* mutant.**

52
53 721 (A) Position of the T-DNA insertion in *AtKU80*. The structure of the *AtKU80* gene is
54
55 722 represented by shaded boxes (exons) and thin lines (introns). The T-DNA insertion position is
56
57 723 indicated. Each primer pair used to characterize the mutant by PCR are indicated in black and
58
59 724 primer pairs used for RT-PCR analyses are given in red; their localization is correct but not to
60
61 725 scale.

62
63 726 (B) RT-PCR analysis of *AtKU80* transcripts in *ku80*^{-/-} mutant plants. RNA, extracted from
64
65 727 floral buds of wild-type or *ku* mutant plants was reverse-transcribed. Double-stranded cDNAs

728 were amplified by RT-PCR, performed with three different primer pairs: 5' or 3' to the T-
729 DNA and flanking the T-DNA insertion. For primer positions, see above (Figure 4A). The
730 constitutive *ACTIN* gene was used as a control.

731
732 **Figure 5: Hypersensitivity to MMS, gamma-rays and UV irradiation of *nhej*, *ssa* and *nhej***
733 ***ssa* plants.**

734 Before sowing, all seeds were surface-sterilized.

735 (A) MMS hypersensitivity, 11 days post-germination. Seeds were sown on MS 0.5 agar 1%
736 sucrose supplemented with MMS at various doses.

737 (B) Gamma-irradiation hypersensitivity, 7 days post-irradiation. After 48h at 4°C in darkness,
738 seeds were exposed to various doses of gamma-rays : 0, 100 and 200 grays before being sown
739 on MS 0.5 agar.

740 (C) UV hypersensitivity, 10 days post-irradiation. Seeds were sown in MS 0.5 agar. After 4
741 days of growth, the plantlets were exposed to UV-C, left in the dark for 3 days to avoid
742 photoreactivation, and then exposed to light.

743
744 **Figure 6: Observation of meiocytes by DAPI staining in *nhej*, *ssa*, *nhej ssa* and *lig6***
745 **mutant plants transformed with the pDMC1::RNAi/*BRCA2* construct.**

746 Different stages of meiosis were observed in plants transformed with pDMC1::RNAi/*BRCA2*
747 in *nhej* mutant plants, *ku80* (A-D) or *lig4* (E-H), and in *ssa* mutant plants, *ercc1* (I-L), in *nhej*
748 *ssa* double mutant plants, *ercc1 ku80* (M-P) or *ercc1 lig4* (Q-T) and in *lig6* mutant plants (U-
749 X). (A, E, I, M, Q, U) prophase I. (B, F, J, N, R, V) metaphase I. (C, G, K, O, S, W) anaphase
750 I. (D, H, L, P, T, X) anaphase II. Bar 10µm.

751
752 **Figure 7: T-DNA insertion and expression in *lig6* mutant.**

753 (A) Position of the T-DNA insertion in *AtLIG6*. The structure of the *AtLIG6* gene is
754 represented by shaded boxes (exons) and thin lines (introns). The T-DNA insertion position is
755 indicated. Each primer pair used to identify the mutants by PCR are indicated in black while
756 primer pairs used for RT-PCR analyses are given in red; their localization is correct but not to
757 of scale.

758 (B) RT-PCR analysis of *AtLIG6* transcripts in *lig6*^{-/-} mutant plants. RNA, extracted from
759 floral buds of wild-type or *lig6* mutant plants was reverse-transcribed. Double-stranded
760 cDNAs were amplified by RT-PCR, performed with three different primer pairs: 5' or 3' to

761 the T-DNA and flanking the T-DNA. The position of each primer is given above (Figure 7A).
 762 The constitutive *ACTIN* gene was used as a control.

763

764 SUPPORTING INFORMATION

765

766 **Supplementary figure S1: Observation of meiocytes by DAPI staining in *nhej*, *ssa*, *nhej* 767 *ssa* and *lig6* mutant plants transformed with the RNAi/0 control construct.**

768 Normal meiotic progression in plants transformed with pDMCI::RNAi/0 in *nhej* mutant
 769 plants, *ku80* (A-B) and *lig4* (C-D), in the *ssa* mutant *ercc1* (E-F), in double *nhej ssa* mutants
 770 *ku80 ercc1* (G-H) and *lig4 ercc1* (I-J), and in *lig6* mutant plants (K-L). Bivalents were
 771 correctly associated during the first meiotic phase (diakinesis (A-E-G-K) and metaphase I (C,
 772 I). Segregation of homologous chromosomes and during the second division, sister chromatid
 773 separation occurred normally without chromosomal bridges or fragmentation (metaphase II or
 774 early anaphase II (L), anaphase II (B-D-H-J) plants, and telophase II (F)). Bar 10µm.

775

776 TABLE

777

778 **Table 1 : Sequence and use of primers in this study.**

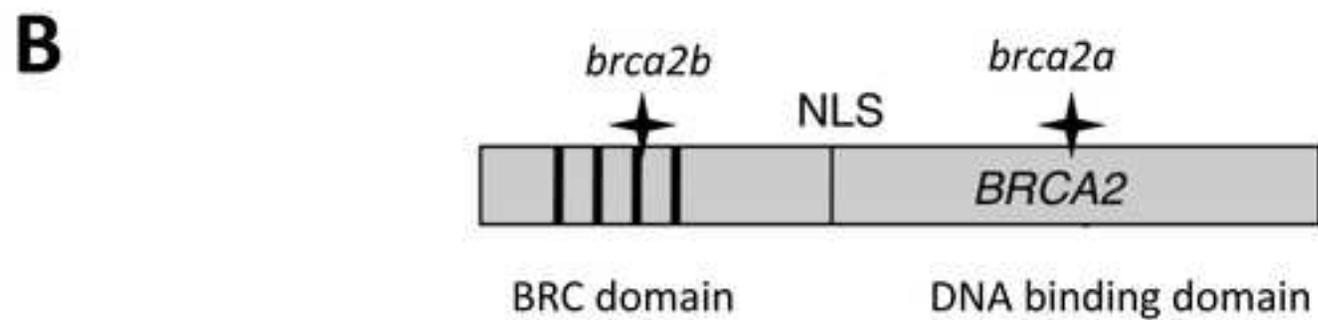
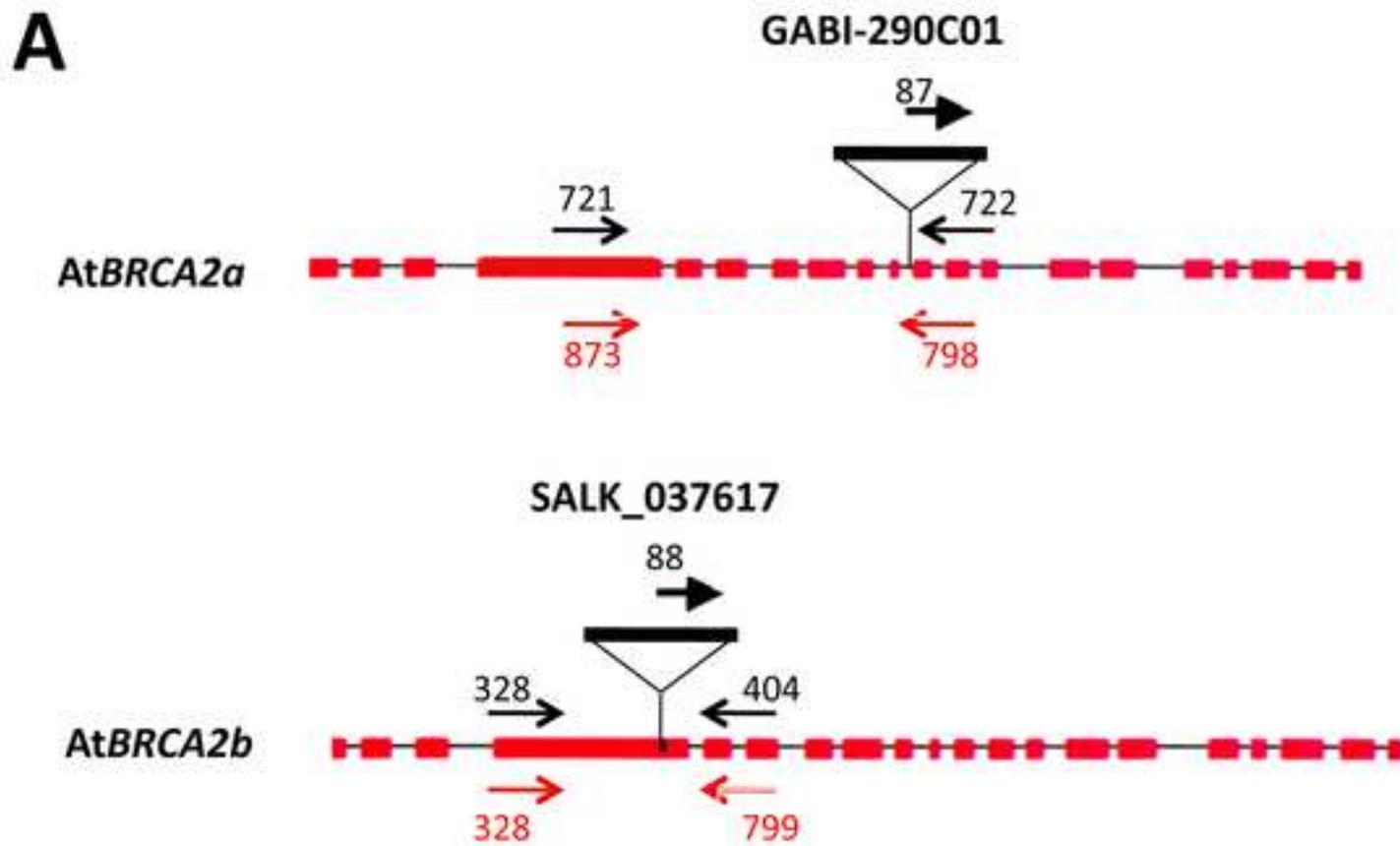
Name	Gene	DNA sequence (5'-3')	Use
87	Gabi T-DNA o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	genotyping
88	Salk T-DNA LBA1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	genotyping
721	<i>AtBRCA2a</i> (At4g00020/10)	GATTGTGCTCTGAATGCTAC	genotyping
722	<i>AtBRCA2a</i> (At4g00020/10)	CAATTTCTTTACCTTGAGGA	genotyping
873	<i>AtBRCA2a</i> (At4g00020/10)	ATGAGACCGATTGTGCTCTGAATGC	RT-PCR
798	<i>AtBRCA2a</i> (At4g00020/10)	CCAATTTCTTTACAGAAGCCTAGTCG	RT-PCR
328	<i>AtBRCA2b</i> (At5g01630)	GCTCTGAATATCAGTAAACCTGCT	genotyping and RT-PCR
404	<i>AtBRCA2b</i> (At5g01630)	TGTATCACACGATACAACAGACA	genotyping
799	<i>AtBRCA2b</i> (At5g01630)	TACAACAGACAAACCACTTGAAGCTTGCT	RT-PCR
177	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	TGTCTTTTGCTTGTGTCAG	genotyping
178	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	GCAGAAGGTGCAAGGTCAAG	genotyping
456	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	ATGGCACGAAATCGGGAGGGTTTG	RT-PCR
457	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	ACGATCAAGAAAGTCTCCAGCTAC	RT-PCR
454	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	GAAGATTAAGGTGTGGGTTTATAAG	RT-PCR
455	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	GTAAAACGAATCAGGAGTATCATCTC	RT-PCR
458	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	CAAGGAGAATCCAAAGTTGAAGAAGG	RT-PCR
459	<i>AtKU80</i> ((At1g48050)	CGTCTACTATATCACTGTCCGCTG	RT-PCR
510	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	TCATTGCAGAATTGCTAAGGG	genotyping
509	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	GAAGACGCAGACTTCAACCTG	genotyping
637	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	AGAGCACGCTTGTGGAGGG	RT-PCR
638	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	TAAATTACGGGCCAATGTTCTAACAAG	RT-PCR
686	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	GAGGGTGTCTGCTGCAGTAGTTGAGGCTTACAA	RT-PCR
640	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	AAGAGCCAACAGCTGTTCTCCA	RT-PCR
641	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	TTCATGGCTCAAGGTTAAGCGAGAT	RT-PCR

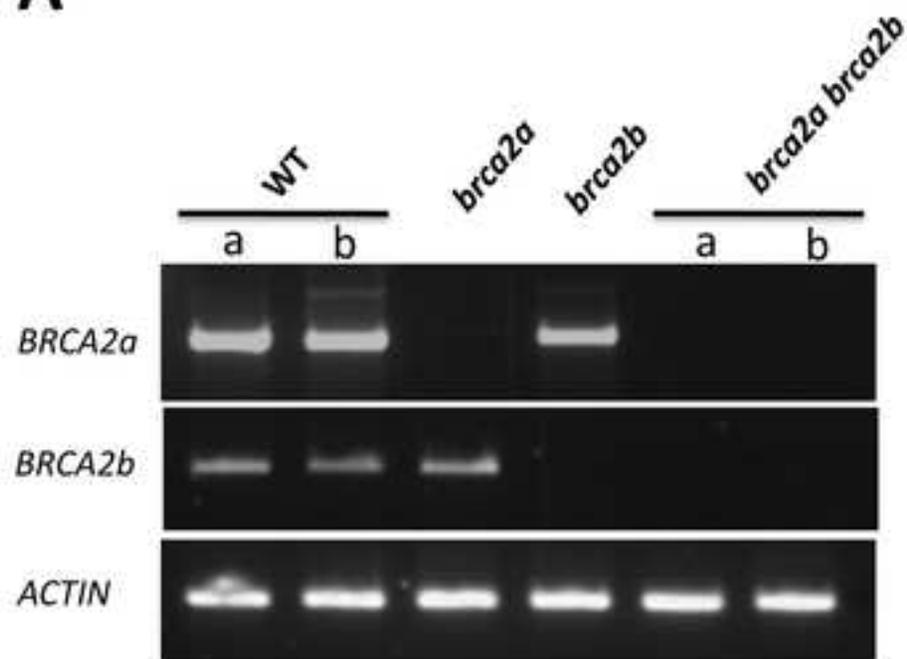
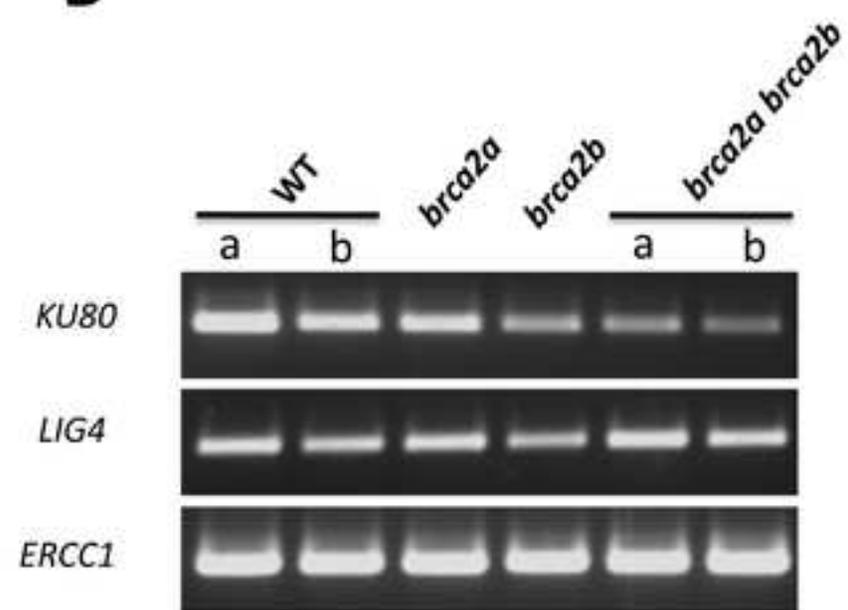
642	<i>AtLIGASE6</i> (At1g66730)	GTTTGAGCATGAAACATCTCTGCGA	RT-PCR
Act-464	<i>AtACT2</i> (At3g18780)	TGAGACCTTTAACTCTCCCG	RT-PCR
Act-465	<i>AtACT2</i> (At3g18780)	GATGGCATGAGGAAGAGAGA	RT-PCR
336	<i>AtLIGIV</i> (At5g57160)	TTGCTGCTGAGGTATTGCAACGTAGAC	RT-PCR
445	<i>AtLIGIV</i> (At5g57160)	CCATCAAGGATACACTTGTCCACCAAT	RT-PCR
452	<i>AtERCCI</i> (At3g05210)	CCCACAGTTCAAGCCAAACGCATC	RT-PCR
453	<i>AtERCCI</i> (At3g05210)	ACATTCTGTCATGCTCCAGGCAC	RT-PCR

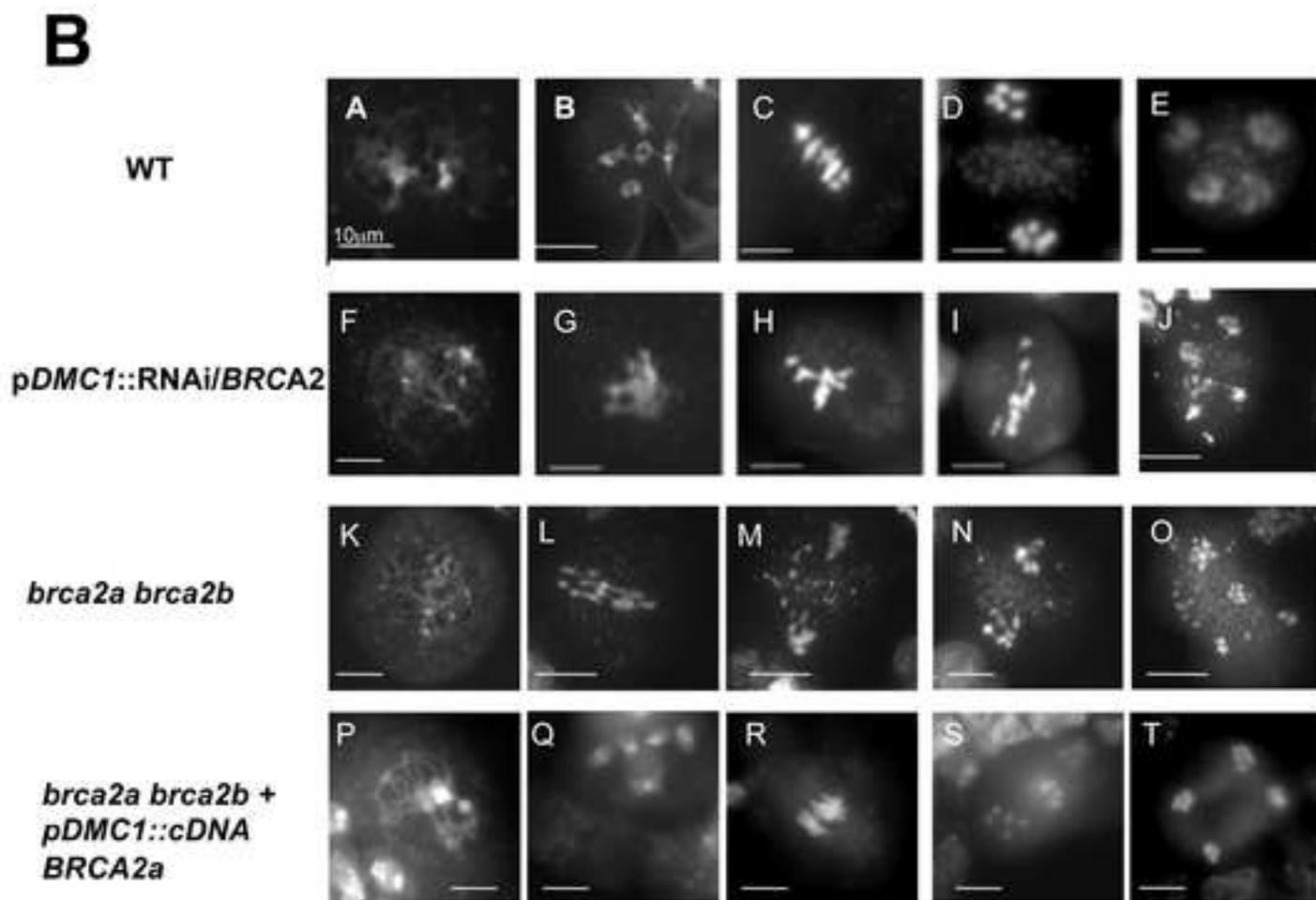
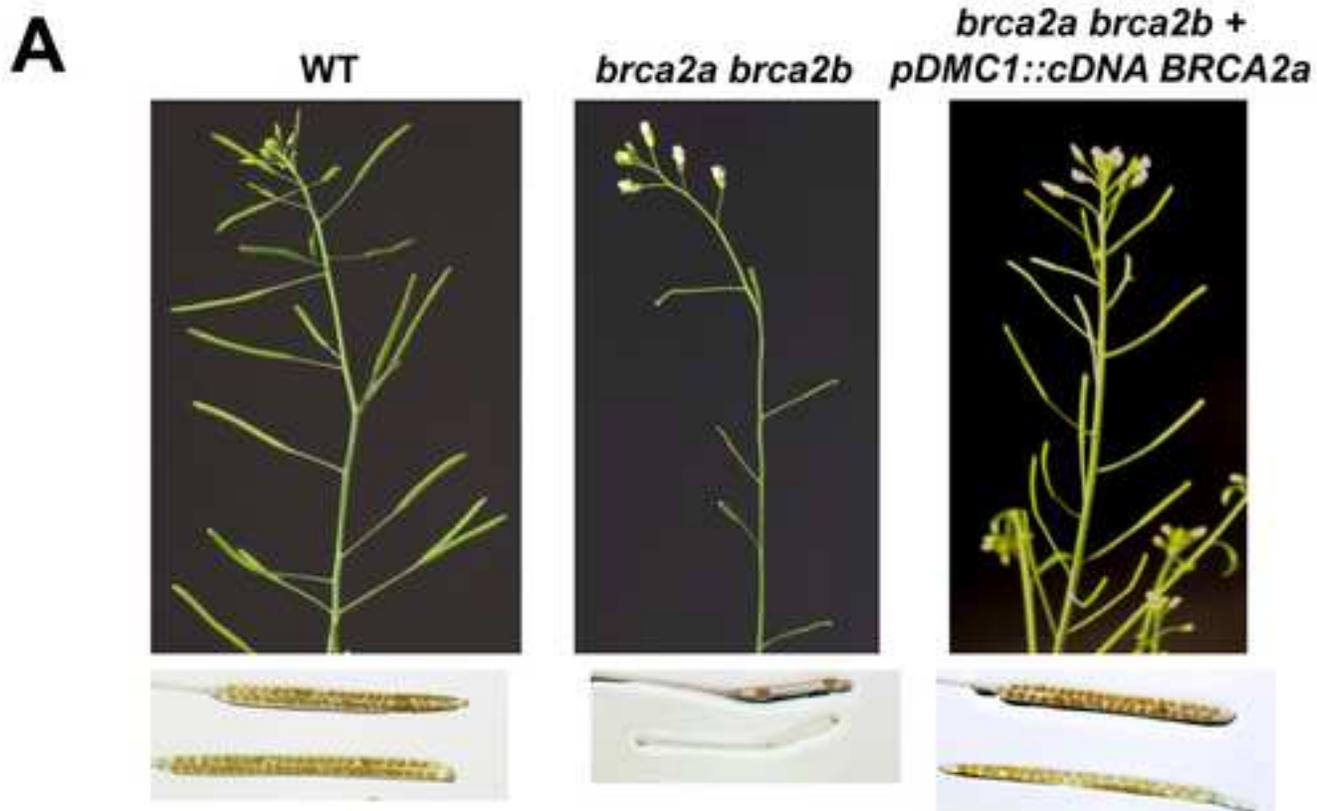
779

780 See figures 1, 4 and 7 for the relative position of the primers.

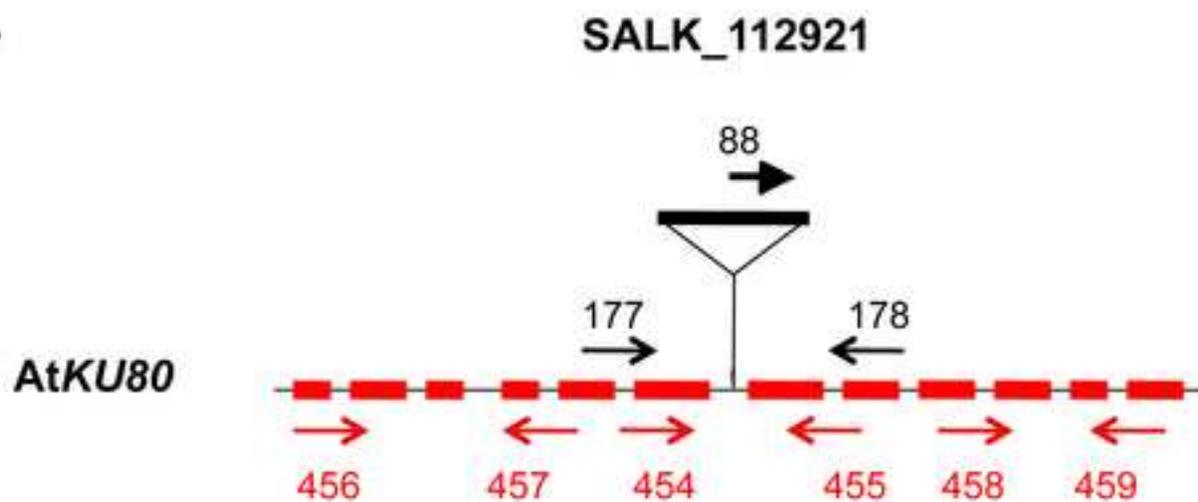
781



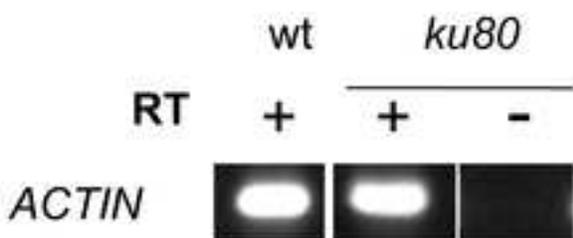
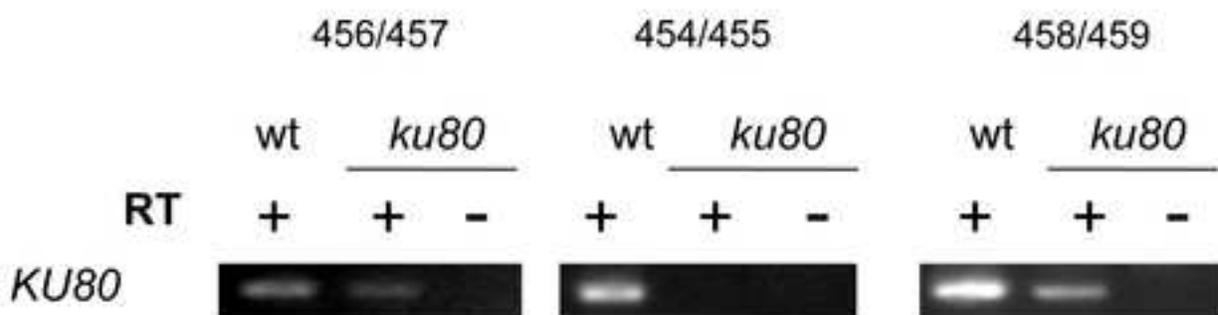
A**B**

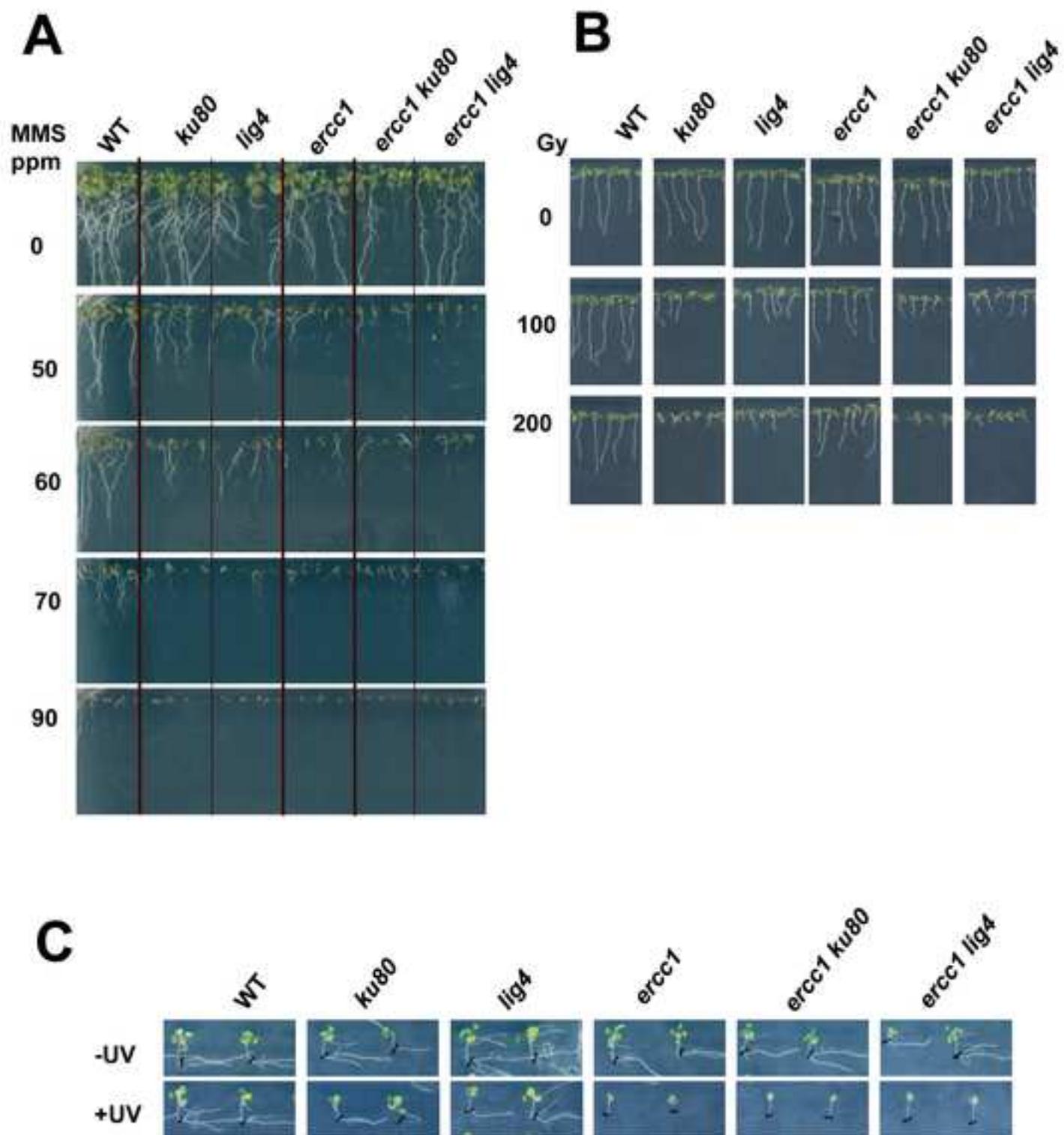


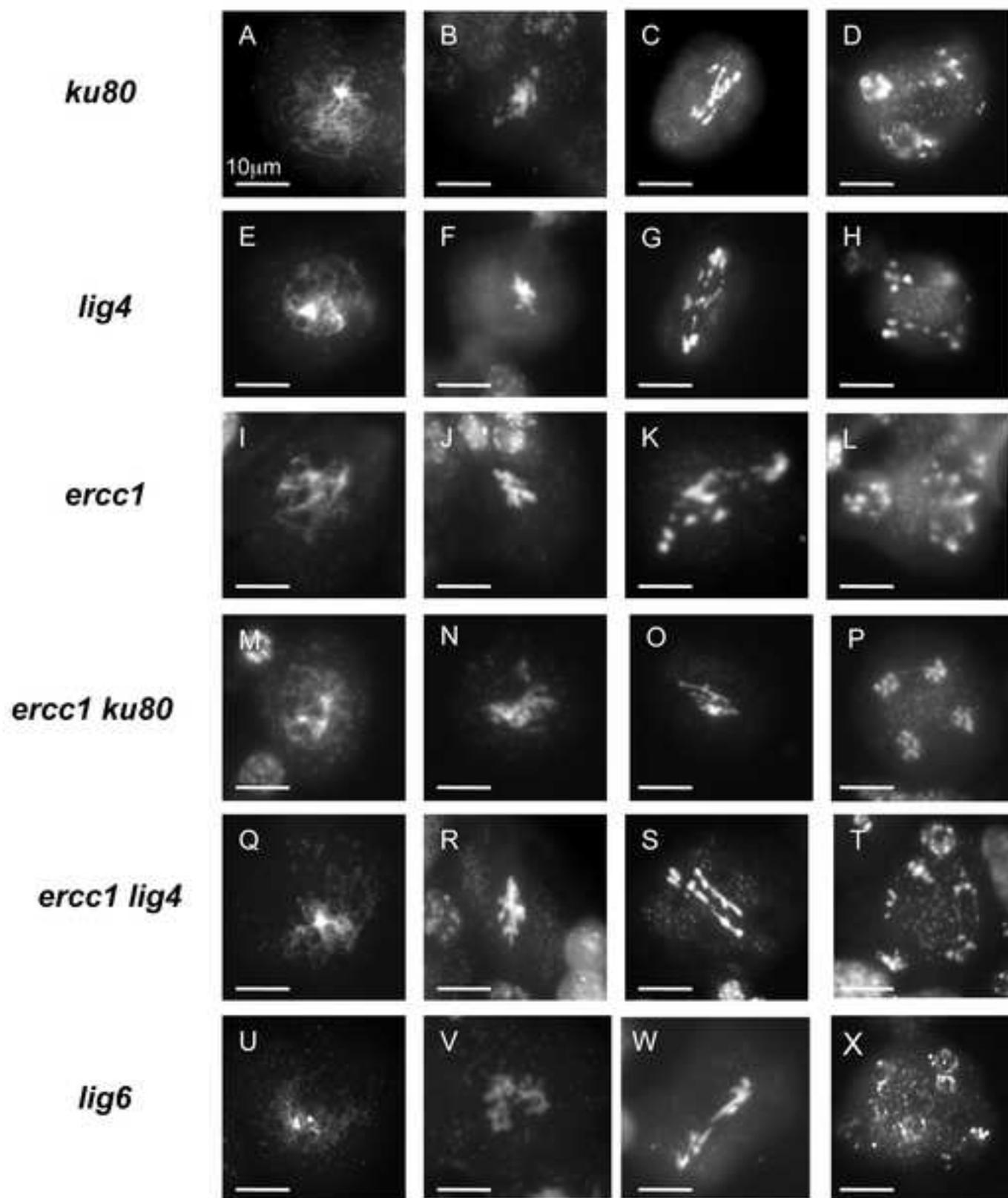
A

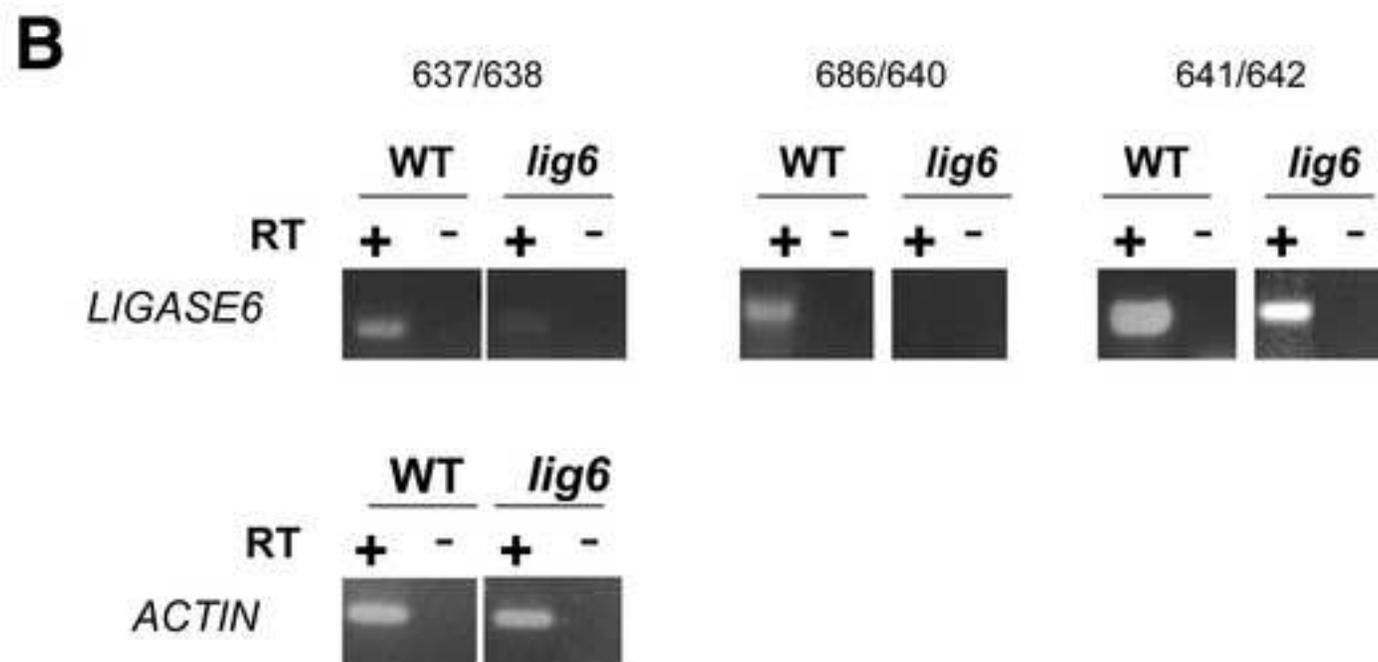
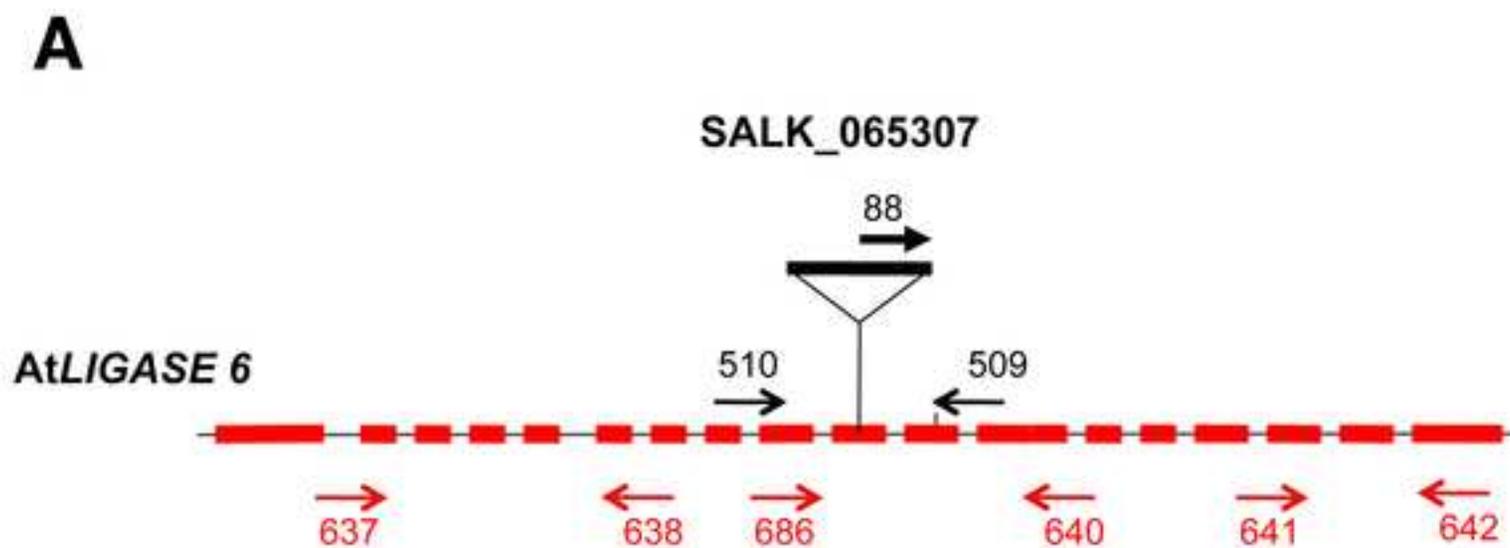


B









III. La technique TUNEL

L'essai TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) est une méthode utilisée pour détecter la fragmentation de l'ADN qui résulte de l'apoptose. Le test repose sur la présence de cassures de l'ADN qui sont identifiées par la terminale désoxynucléotidyl transférase, qui catalyse l'addition de dUTP couplé à un marqueur.

Lors de la méiose, Spo11 induit des cassures double brin de l'ADN, au stade leptotène de la prophase I. Lors des phases suivantes de la prophase I, les CDB de l'ADN sont réparées par recombinaison homologue. Ainsi, en métaphase I, il n'y a plus de CDB de l'ADN.

J'ai utilisé la technique du TUNEL sur les méiocytes d'*Arabidopsis*, afin de détecter si les cassures méiotiques de l'ADN engendrées par Spo11 sont réparées ou pas en absence de Brca2. Cette expérience pourrait permettre d'identifier si les anomalies observées en méiose en absence de Brca2 sont le résultat ou pas de liaisons covalentes dues à une réparation aberrante des cassures de l'ADN. En effet, si les CDB ne sont pas réparées de façon covalente, celles-ci devraient persister tout au long de la méiose.

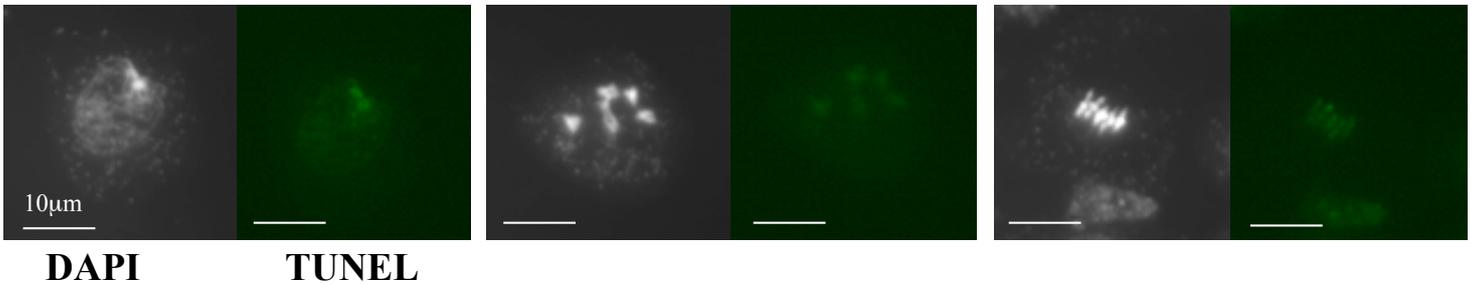
Les méiocytes de différentes plantes témoins ont tout d'abord été analysés. Chez une plante sauvage, les CDB de l'ADN sont introduites et pourraient donc être visualisables en début de prophase. Ces CDB de l'ADN étant réparées par la RH en fin de prophase, elles ne seraient donc plus visibles pendant le reste de la méiose. Lors de l'étape suivante la dissection des méiocytes, les lames peuvent être préparées de deux façons : soit elles sont uniquement lavées à l'eau soit en plus elles sont incubées dans du paraformaldéhyde (PFA) qui fixe le matériel biologique. Puis après une réhydratation des lames, le protocole utilisé est le même pour toutes les préparations. J'ai pu observer, en contexte sauvage, que le marquage TUNEL colocalisait avec les points de marquages les plus intenses de l'ADN au DAPI, lorsque le PFA n'a pas été utilisé pour fixer le matériel cytologique durant toutes les phases de la méiose (Figure 20). Cette colocalisation est donc toujours effective en métaphase I alors que les CDB méiotiques de l'ADN ont normalement déjà été réparées. En revanche, lorsque le PFA a été utilisé, je n'ai plus observé de marquage TUNEL de la chromatine dans aucune des phases méiotiques. Ainsi le marquage observé lorsque seule l'eau est utilisée, ne serait pas spécifique des cassures mais décorerait plutôt tout l'ADN. Et lorsque le matériel cytologique est fixé par du PFA, le marquage aspécifique semble vraisemblablement éliminé. Le témoin utilisé est le

Sauvage : CDB réparées = témoin

WT H2O

Prophase I

Métaphase I



WT H2O+ PFA

Prophase I

Télophase II

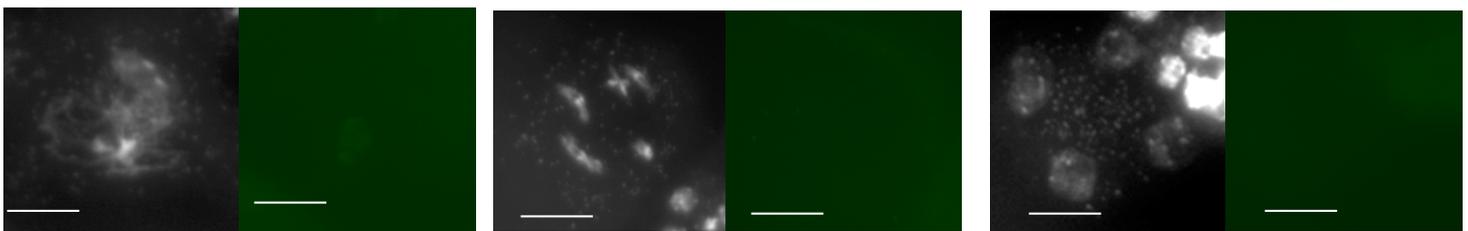
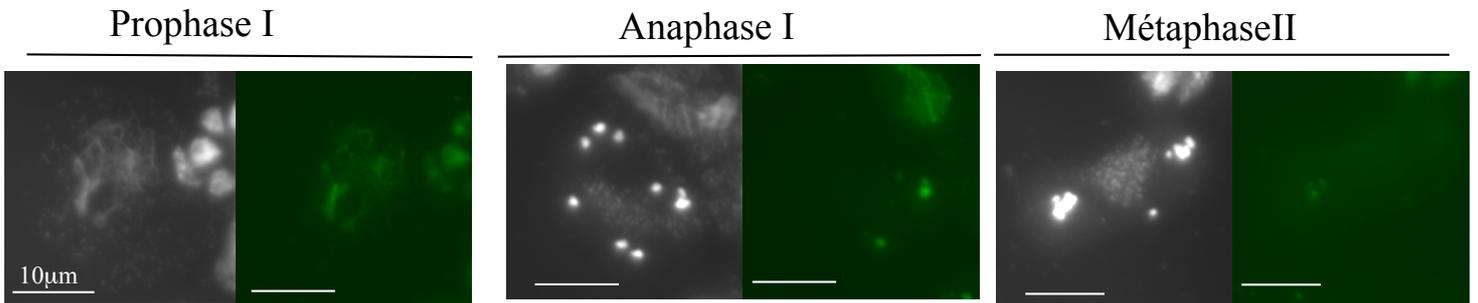
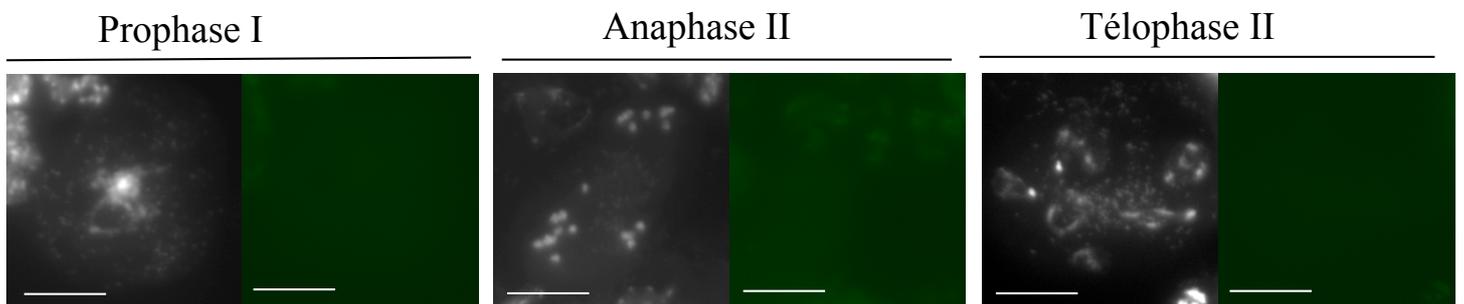
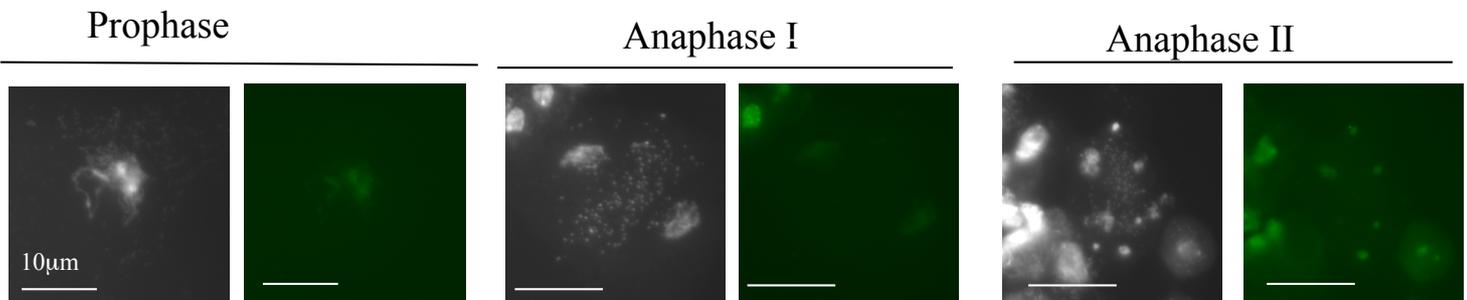


Figure 20 : Méiose d'une plante sauvage ayant été colorés au DAPI et par le réactif TUNEL

L'ADN des méiocytes d'une plante sauvage a été coloré avec les deux réactifs. Lorsque les lames ne sont pas fixées avec du PFA, un marquage au TUNEL est observé se superposant avec les spots les plus intenses du marquage des chromosomes au DAPI. En revanche, lorsque le PFA est utilisé pour fixer le matériel, il n'y a pas de marquage TUNEL dans les méiocytes.

A*Spo11* H2OMutant *spo11* : pas de CDB = témoin*Spo11* H2O + PFA**B***mre11* H2OMutant *mre11* : pas de réparation des CDB = témoin**Figure 21 : Méiose de plantes mutantes (*spo11* et *mre11*) ayant été colorés au DAPI et par le réactif TUNEL**

A- Les chromosomes des méiocytes d'une plante muté pour *SPO11* ont été coloré avec les deux réactifs. En l'absence de Spo11, il n'y a pas d'introduction de CDB méiotiques de l'ADN, les chromosomes restent sous forme d'univalents. Lorsque les lames ne sont pas fixées avec du PFA, un marquage au TUNEL est observé se superposant avec les spots les plus intenses du marquage des chromosomes au DAPI. En revanche, lorsque le PFA est utilisé pour fixer le matériel, il n'y a pas de marquage TUNEL dans les méiocytes.

B- Les chromosomes des méiocytes d'une plante mutée pour le gène *MRE11* ont été colorés avec les deux réactifs. En l'absence de Mre11, il n'y a pas de réparation de CDB méiotiques de l'ADN, les chromosomes sont fragmentés. Lorsque les lames ne sont pas fixées avec du PFA, un marquage au TUNEL est observé se superposant avec les spots les plus intenses du marquage des chromosomes au DAPI. Les photos avec une fixation au PFA n'ont pas été réalisées.

mutant *spo11*. Chez le mutant *spo11*, il n'y a pas d'introduction de CDB de l'ADN en prophase I de méiose, il ne devrait donc pas y avoir de marquage par TUNEL, si cette technique est spécifique entre nos mains. Lorsque les méiocytes disséqués sont rincés avec de l'eau, on observe un marquage de la chromatine durant toute la méiose alors qu'il n'y a pas de CDB de l'ADN dans ce contexte mutant *spo11* (Figure 21). Ce marquage n'est pas présent lorsque le PFA a été utilisé. L'autre témoin utilisé est le mutant *mre11* chez lequel les CDB méiotiques sont engendrées en prophase I mais ne sont pas réparées et restent présentes durant toute la méiose. Les observations effectuées pour ce mutant montrent que le réactif TUNEL décore l'ADN de façon non spécifique, lorsque seule l'eau est utilisée, comme il a déjà été observé pour les témoins précédents (Figure 21).

Cette différence de marquage du réactif TUNEL, au niveau de l'ADN en méiose, lorsque le PFA a été utilisé ou non pour la fixation du matériel, est généralisable aux trois contextes génétiques observés. Ainsi, cette technique ne permet pas d'obtenir des résultats sur la présence ou l'absence de CDB de l'ADN lors de la méiose pour les témoins utilisés. Aucun autre mutant n'a donc été analysé par cette technique.

Chapitre II : Etude des ADN-Ligases : la Ligase I, Ligase Ia (ou la Ligase I-like) et la Ligase 6

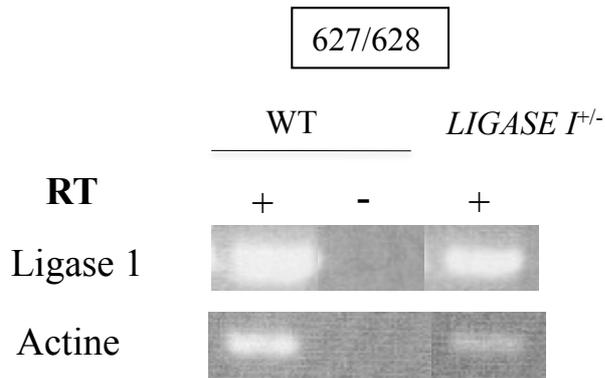
Mes résultats de thèse m'ont permis de conclure que les aberrations chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2 ne sont pas le résultat d'une réparation effectuée par le NHEJ ou le SSA, mécanismes agissant en phase somatique. Toujours dans l'hypothèse où ces figures chromosomiques seraient le résultat de liaison covalente entre chromosomes non homologues, j'ai voulu tester l'implication d'autres ADN-Ligases dans ces anomalies: la Ligase I et la Ligase Ia (ou Ligase I-like). L'étude sur l'implication de la Ligase IV et de la Ligase 6 a déjà été étudiée et décrite dans l'article : Characterization of Brca2-Deficient Plants Excludes the Role of NHEJ and SSA in The Meiotic Chromosomal Defect Phenotype.

Le gène *LIGASE I* est défini comme essentiel chez les mammifères, la levure et *Arabidopsis* puisque sa mutation est létale (Johnston, 1979; Petrini et al., 1995; Bentley et al., 1996; Sunderland et al., 2006; Waterworth et al., 2009). Cette létalité concorde avec le fait que la Ligase I joue un rôle important lors de la réplication.

I. Etude de la Ligase I

I.1. Analyse de l'expression génique de *LIGASE I* en contexte sauvage et hétérozygote

J'ai analysé l'expression du gène *LIGASE I*, *At1g08130*, par RT-PCR, sur des ARN totaux extraits de boutons floraux et de feuilles de plantes sauvages. Une reverse transcription (RT) a ensuite été effectuée afin d'obtenir les ADNc. Afin de vérifier l'intégrité des ADNc obtenus, j'ai réalisé une PCR sur le gène constitutif de la β -actine. Pour observer l'expression génique de *LIGASE I*, nous avons réalisé une PCR spécifique de l'ADNc de cette Ligase avec les oligonucléotides 627/628 (tableau des oligonucléotides en Annexe1). Il y a une forte amplification correspondant à l'ADNc du gène *LIGASE I* chez le sauvage, d'une taille de 346 pb (Figure 22, A). Ceci indique que ce gène est exprimé en contexte sauvage dans les organes étudiés : les inflorescences et les feuilles. Cette expression de la *LIGASE I* en contexte sauvage a également été présentée dans les travaux de Waterworth publiés en 2009

A**B**

Ségrégation de l'hétérozygote *LIGASE I*^{+/-}

-/+	+	-	
+	+/+	-/+	
-	-/+	-/- létal	

C

Figure 22 : Etude de la mutation Ligase I

A- Etude de l'expression du gène *LIGASE I*, par RT-PCR avec les oligonucléotides 627/628 en contexte sauvage et en contexte hétérozygote mutant (*LIGASE I*^{+/-}). La taille attendue de l'amplification est de 346 pb. Une RT-PCR est également réalisée sur le gène constitutif de l'actine afin de vérifier l'intégrité des ARN.

B- Ségrégation chez l'hétérozygote Ligase I, la mutation est létale à l'état homozygote.

C- Photos de siliques de plantes sauvage et hétérozygote pour le gène *LIGASE I* après une décoloration au chloralhydrate.

(Waterworth et al., 2009). Nous avons utilisé au laboratoire la lignée SALK hétérozygote S_013442 (Annexe 4) contenant une insertion de l'ADN-T dans le gène *LIGASE I*, déjà décrite (Waterworth et al., 2009). J'ai également étudié l'expression du gène *LIGASE I* chez l'hétérozygote. Ainsi j'ai pu observer qu'il y avait une amplification de l'ADNc du gène *LIGASE I* en contexte hétérozygote indiquant que ce gène est toujours exprimé chez la plante *LIGASE I*^{+/-} (Figure 22, A).

I.2. Etude de la ségrégation chez l'hétérozygote *LIGASE I*^{+/-}

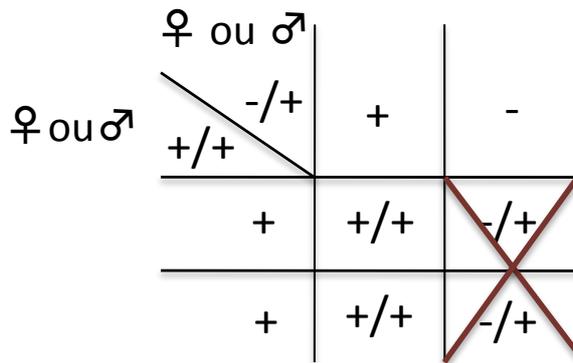
J'ai effectué deux études de la descendance de plantes définies comme hétérozygotes *LIGASE I*^{+/-}, par génotypage. Dans la première étude, 16 descendants ont été obtenus, 11 étaient homozygotes sauvages (*LIGASE I*^{+/+}) et 5 hétérozygotes (*LIGASE I*^{+/-}). Dans la seconde étude, 73 descendants ont été obtenus, 50 étaient homozygotes sauvages (*LIGASE I*^{+/+}) et 23 hétérozygotes (*LIGASE I*^{+/-}). En revanche, il n'a pas été trouvé de mutant homozygote ce qui confirme la létalité du mutant *ligase I* d'*Arabidopsis* (Figure 22, B). Cette létalité est corrélée avec le fait que la plante hétérozygote pour la mutation du gène *LIGASE I* est partiellement stérile, avec des siliques de taille moyenne. Lorsque l'on décolore les siliques d'un hétérozygote au chloralhydrate, on observe qu'elles contiennent peu de graines. La mutation de la *LIGASE I* étant létale à l'état homozygote, il devrait y avoir 1/4 de graines en moins par rapport à une plante sauvage. Or il y a beaucoup moins de graines que cela (Figure 22, C).

L'étude des descendants par génotypage des hétérozygotes *LIGASE I*^{+/-} révèle une ségrégation anormale. Dans le cas d'une ségrégation mendélienne pour un gène dont l'homozygote mutant est léthal, la descendance d'un hétérozygote devrait donner les proportions suivantes : 1/3 de sauvages et 2/3 d'hétérozygotes. Cependant, chez les descendants hétérozygotes pour la mutation Ligase I, ces proportions ne sont pas retrouvées, elles sont même inversées. En effet, on obtient 1/3 d'hétérozygotes et 2/3 de sauvages lors des deux études, présentées ci-dessus.

L'observation du contenu des siliques et les résultats de proportions des descendants obtenus par génotypage permettent de penser à un défaut de transmission de la mutation par l'un et/ou l'autre des deux gamètes. Afin de vérifier cette hypothèse et d'identifier si un des deux

A

Croisements réciproques



B

		+/+	-/+	Total plantes
♀ <i>LIGASE I</i> ^{-/+} X ♂ WT	1 ^{er} croisement	9	5	14
	2 ^{ème} croisement	5	2	7
	3 ^{ème} croisement	9	7	16
♀ WT X ♂ <i>LIGASE I</i> ^{-/+}	1 ^{er} croisement	3	3	6
	2 ^{ème} croisement	0	2	2

Figure 23 : Croisements réciproques

A- Schéma de croisements réciproques lors d'une non transmission par un des deux gamètes, il y a absence de descendants hétérozygotes pour la mutation.

B- Résultats des croisements réciproques. Trois croisements indépendants ont été effectués entre une plante femelle mutante et une plante male sauvage. On obtient pour les trois croisements des descendants sauvages et hétérozygotes. Deux croisements indépendants ont été effectués entre une plante femelle sauvage et une plante male mutante, on a obtenu des descendants sauvages et hétérozygotes.

gamètes ne transmet pas l'allèle mutant, j'ai effectué des croisements réciproques (Figure 23, A). J'ai effectué trois croisements et des plantes indépendantes entre une plante femelle hétérozygote *LIGASE I*^{+/-} avec une plante mâle sauvage. Ces trois croisements ont donné respectivement 14, 7 et 16 descendants dont respectivement 5, 2 et 7 hétérozygotes (Figure 23, B). Ces résultats indiquent que le gamète femelle transmet bien l'allèle mutant. J'ai également effectué deux croisements entre une plante femelle sauvage et une plante mâle hétérozygote *LIGASE I*^{+/-}. Ces croisements ont donné respectivement 6 et 2 descendants dont respectivement 3 et 2 hétérozygotes (Figure 23, B). Ces résultats montrent que l'allèle mutant est également transmis par le gamète mâle. Si les résultats de ces croisements réciproques montrent que l'allèle mutant est transmis par les deux gamètes en revanche, étant donné les faibles proportions obtenues, je n'ai pu effectuer de statistiques afin de savoir si l'un des deux gamètes transmettait moins que l'autre l'allèle mutant.

Ces résultats ont été approfondis et récemment publiés (Andreuzza et al., 2010). Le problème de ségrégation chez les hétérozygotes a été expliqué par le fait que l'apport de l'allèle mutant par le gamète femelle peut aboutir à l'avortement de la graine. La présence d'un allèle maternel mutant affecte le développement de l'endosperme (albumen) qui contient les ressources nécessaires au développement de l'embryon dans la graine entraînant l'arrêt de sa division. L'endosperme ne peut donc plus assumer le développement de l'embryon conduisant ainsi à l'avortement de la graine. Les auteurs concluent donc sur un effet maternel de la mutation *ligase I* puisque en présence de l'allèle mutant femelle, l'apport de l'allèle sauvage par le mâle ne suffit pas à sauver le phénotype de létalité embryonnaire. Ils supposent que l'absence de la Ligase I perturbe l'expression des gènes de l'empreinte parentale, au stade suivant la double fécondation. En effet, l'expression de certains gènes de l'empreinte parentale dépend d'une ADN glycosylase nommée DME, exprimée spécifiquement dans les cellules centrales et qui excise les cytosines méthylées, créant ainsi une cassure simple brin de l'ADN réparée par le BER dans lequel la Ligase I agit en étape finale de ligation (Andreuzza et al., 2010).

I.3. Inactivation de la Ligase I en méiose chez le double mutant *brca2*

En 2009, Waterworth et al., ont utilisé une approche ARN interférence, sous le contrôle d'un promoteur constitutif (p35S), pour réduire l'expression génique de la Ligase I. Ces

plantes sont viables et fertiles mais présentent un aspect chétif et les défauts de la réparation de l'ADN, observés par « Comet assay », sont augmentés par rapport à une plante sauvage.

Toujours afin d'identifier l'acteur responsable des anomalies chromosomiques observées en l'absence de *Brca2* et afin de contourner le fait que la mutation du gène *LIGASE I* soit létale à l'état homozygote, nous avons utilisé cette stratégie ARN interférence afin d'éteindre l'expression du gène *LIGASE I* spécifiquement à la méiose. J'ai ainsi construit, par clonage, un système ARN interférent qui contient deux fragments en répétition inverse, et séparés par un intron, de 449 paires de bases de l'ADNc de la *LIGASE I* (du nucléotide 1101 au 1550) sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la méiose, le promoteur du gène *DMC1*. Cette construction a été introduite dans *Agrobacterium tumefaciens*. Puis des plantes sauvages, utilisées comme témoin et des plantes mutantes pour les gènes *BRCA2a* et *BRCA2b* ont été transformées par la méthode « floral dip » afin d'introduire la construction ARNi Ligase I dans le génome d'*Arabidopsis*. Les plantes sauvages transformantes sont viables et fertiles. La méiose de ces plantes a un déroulement normal concordant avec la fertilité de la plante. Les transformants mutés pour les gènes *BRCA2a* et *BRCA2b* sont viables et stériles, puisque la mutation dans les deux gènes *BRCA2a* et *BRCA2b* entraîne la stérilité de la plante. Leur méiose est de « type *brca2* » présentant les anomalies chromosomiques déjà décrites.

Ces observations ne nous permettent donc pas de tirer de conclusion. En effet, le fait que l'ARNi Ligase I n'influe pas sur le déroulement méiotique en contexte sauvage ne nous permet pas de trancher entre le fait que la Ligase I n'agit pas au cours de la méiose ou le fait que l'ARNi n'est pas efficace. Ainsi, l'observation de figures chromosomiques, inchangées chez le double mutant *brca2a brca2b* contenant l'ARNi Ligase I, ne permet pas de conclure sur l'implication potentielle de la Ligase I dans la formation de ces aberrations méiotiques si l'ARNi n'est pas efficace comme il a été suggéré.

II. Etude de la Ligase Ia (Ligase I-like)

Nous avons identifié au laboratoire un gène comportant 47,8% d'identité de séquence avec la *LIGASE I*, nous avons donc nommé ce gène *LIGASE I-like*. Puis ce gène a été décrit dans les travaux d'Andreuzza et al., en 2010, qui l'ont nommé *LIGASE Ia* (Andreuzza et al.,

Ligase I

Ligase I
-like

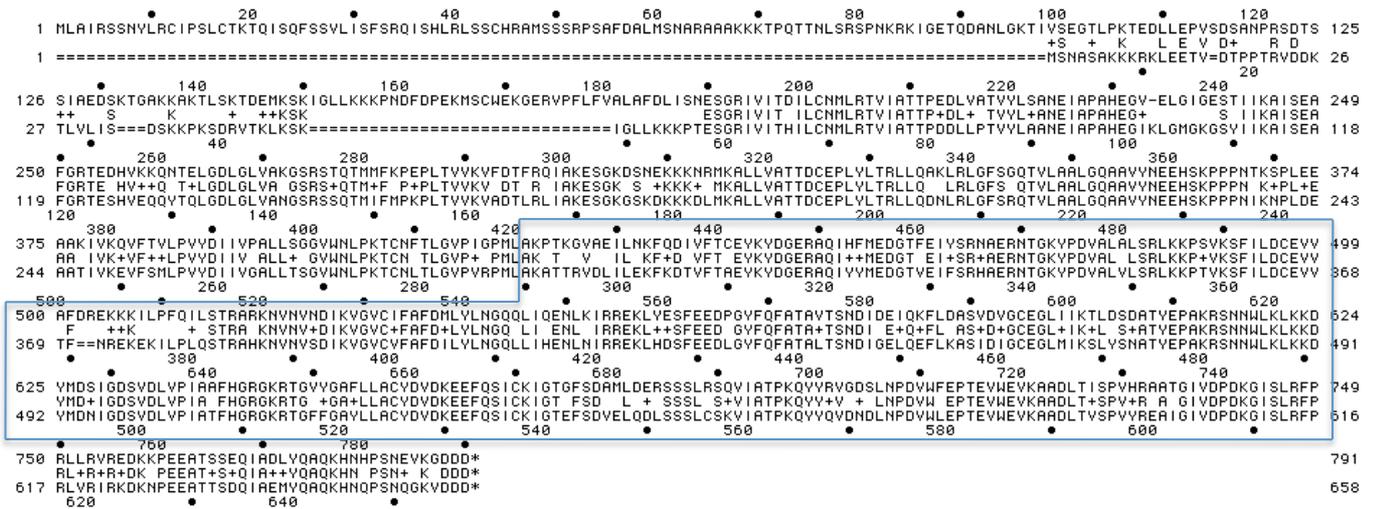


Figure 24: Alignement protéique de Ligase I et Ligase Ia (Ligase I-like) (61,1% d'identité). La séquence protéique de la Ligase I est en premier puis en dessous la séquence protéique de la Ligase I-Llike. La Ligase I et la Ligase I-like contiennent 61,1% d'identité protéique. La région protéique encadrée en bleu contient le domaine catalytique.

2010). Les protéines Ligase I et Ligase Ia (Ligase I-like) possèdent 61,1% d'identité (Figure 24)

II.1. Expression du gène *LIGASE I-like*

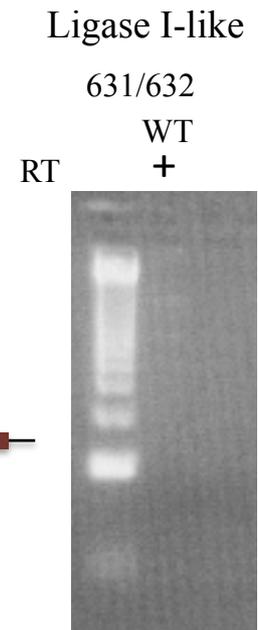
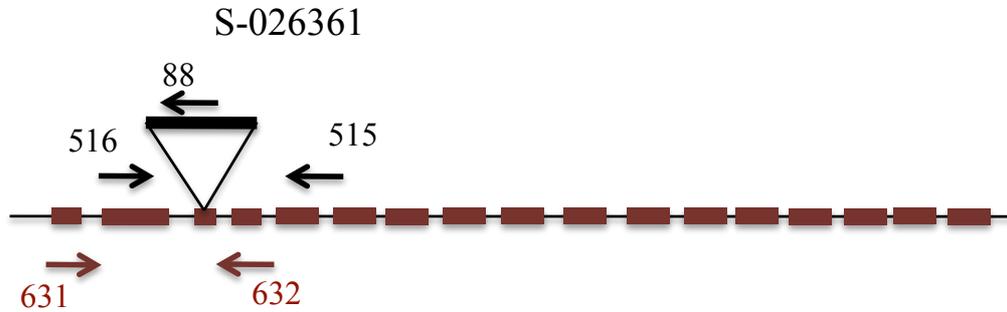
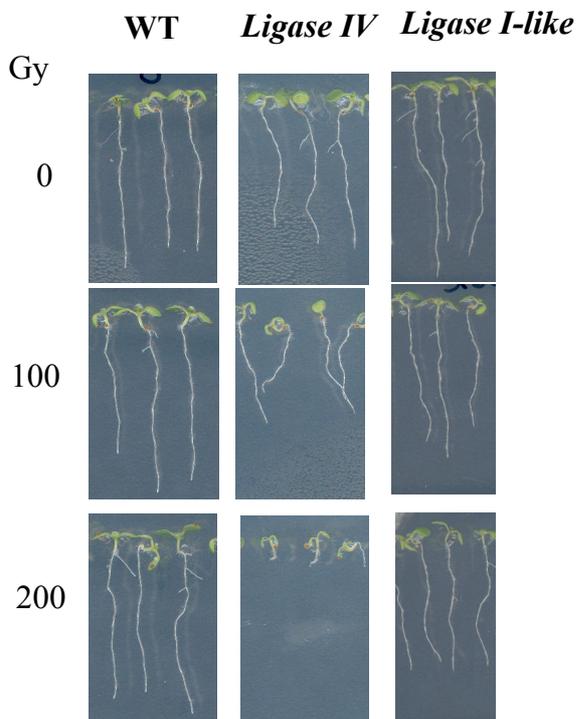
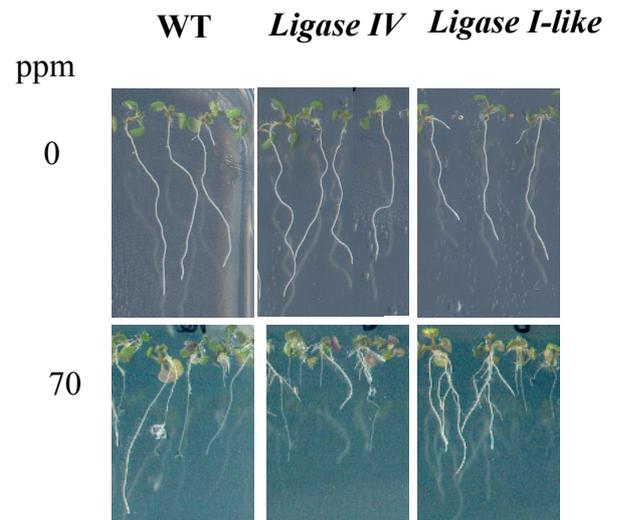
J'ai effectué une RT-PCR sur des ADNc issus de plantes sauvages avec les oligonucléotides 631/632, la taille attendue de cette amplification est de 457 pb (Figure 25, A). Je n'ai pas observé d'amplification, ainsi le gène *LIGASE I-like* (At1g49250) ne semble pas être exprimé ou serait exprimé très faiblement en contexte sauvage (Figure 25, A).

II.2. Obtention du mutant *ligase I-like*

A partir de la lignée d'insertion S_026361 contenant une insertion de l'ADN-T à l'état hétérozygote dans le gène *LIGASE I-like* (Figure 26, A), après auto-fécondation, nous avons identifié par génotypage (oligonucléotides 516/515) des plantes homozygotes pour la mutation *ligase I-like*. Ce mutant a un développement normal et est fertile. L'expression de ce gène n'étant pas visible par RT-PCR en condition sauvage, l'expression génique chez le mutant n'a pas pu être étudiée. Nous désignerons ainsi ce mutant *ligase I-like* avec des guillemets pour le différencier d'un réel mutant.

II.3. Test de sensibilité à des stress génotoxiques du mutant « *ligase I-like* »

Afin de voir si la Ligase I-like pourrait être impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN comme c'est le cas pour la Ligase I, nous avons soumis le « mutant *ligase I-like* », à différents stress génotoxiques. J'ai pu observer que ce « mutant » ne présentait pas de sensibilité ni aux irradiations gamma (Figure 25, B), ni au MMS (Figure 25, C) contrairement au mutant *ligase IV*. Ce résultat était prévisible et est compatible avec le fait que le gène *LIGASE I-like* ne semble pas être exprimé. Il s'agit sans doute d'un pseudo-gène. Cependant sa séquence est entièrement codante.

A*At1g49250*
LIGASE I-like**B****C****Figure 25 : Etude du « mutant » *ligase I-like***

A- A gauche, schéma du gène *LIGASE I-like*. Le trait noir représente l'ADN génomique, les rectangles rouges représentent les exons. Le triangle représente l'ADN-T à l'endroit où il est inséré dans le gène. Les oligos en noir sont utilisés pour le génotypage, ceux en rouge pour les RT-PCR. A droite, RT-PCR effectuée sur des ARN extraits d'une plante sauvage avec les oligonucléotides 631/632 (taille de la bande attendue : 457 pb). Ce couple d'oligonucléotide a été dessiné pour être positionné de part et d'autre de l'ADN-T inséré dans le gène *LIGASE I-like* chez le mutant.

B- Sensibilité du mutant *ligase I-like* aux irradiations gamma observée après 11 jours de croissance. Le mutant *ligase IV* est utilisé comme témoin. Après avoir été irradiées, les graines sont semées sur MS 0,5.

C- Sensibilité du mutant *ligase I-like* au MMS, observée après 7 jours de croissance. Les semis sont effectués sur MS 0,5 contenant 1% de saccharose et une dose de 0 ou 70 ppm de MMS.

II.3. Inactivation de Brca2 chez le « mutant *ligase I-like* »

Le « mutant *ligase I-like* » présente un déroulement normal de la méiose. Afin de tester l'implication de la Ligase I-like dans les figures chromosomiques observées en méiose en l'absence de Brca2, l'expression génique de *BRCA2* est éteinte par l'introduction de la construction ARNi chez le « mutant *ligase I-like* ». Chez ces plantes, les chromosomes des méiocytes sont coloré au DAPI pour observer le déroulement de la méiose. Ainsi, nous avons pu constater que les figures méiotiques étaient inchangées, de « type Brca2 ». Ces résultats étaient prévisibles puisque la Ligase I-like ne semble pas exprimée et ne semble pas avoir de rôle dans la réparation des cassures de l'ADN.

III. Etude de la méiose chez les doubles mutants *ligase6 mnd1* et *ligase6 rad51*

Le mutant *mnd1* présente le même phénotype « type *brca2* » que celui observé chez le double mutant *brca2a brca2b* et chez les plantes dont l'expression de *BRCA2* a été inactivée par ARNi. Chez le mutant *mnd1* également les chromosomes sont emmêlés et se fragmentent (Figure 26, A). Le mutant *rad51* présente un phénotype méiotique que l'on pourrait associer au phénotype observé en l'absence de Brca2. En effet lors des divisions méiotiques, il y a un appariement anarchique entre chromosomes et de la fragmentation (Figure 26, C). Rad51 et Mnd1 sont tous deux impliqués dans la recombinaison homologue méiotique. Ainsi, comme lorsque Brca2 est absent, on suppose que la recombinaison homologue est inactive chez ces mutants *rad51* et *mnd1*. Les CDB de l'ADN, chez les mutants *rad51* et *mnd1*, pourraient être réparées de façon anarchique ce qui induirait les figures chromosomiques observées. Nous avons vu que le NHEJ, le SSA et la Ligase 6 n'intervenaient pas dans la formation des anomalies méiotiques observées en absence de Brca2. Cependant, il peut être envisagé que les figures chromosomiques observées chez les mutants *rad51* et *mnd1* ne soient pas le résultat des mêmes mécanismes utilisés lorsque Brca2 est absent. J'ai donc voulu identifier si la Ligase 6, dont le rôle est encore inconnu, pouvait être impliquée dans les anomalies méiotiques formées chez les mutants *rad51* et *mnd1*. J'ai obtenu les doubles mutants *ligase6 rad51* et *ligase6 mnd1*. J'ai isolé les méiocytes par dissection des boutons floraux puis j'ai coloré les chromosomes au DAPI pour observer le déroulement de la méiose chez ces doubles mutants. Le déroulement de la méiose est inchangé dans ces doubles mutants, elle est de type

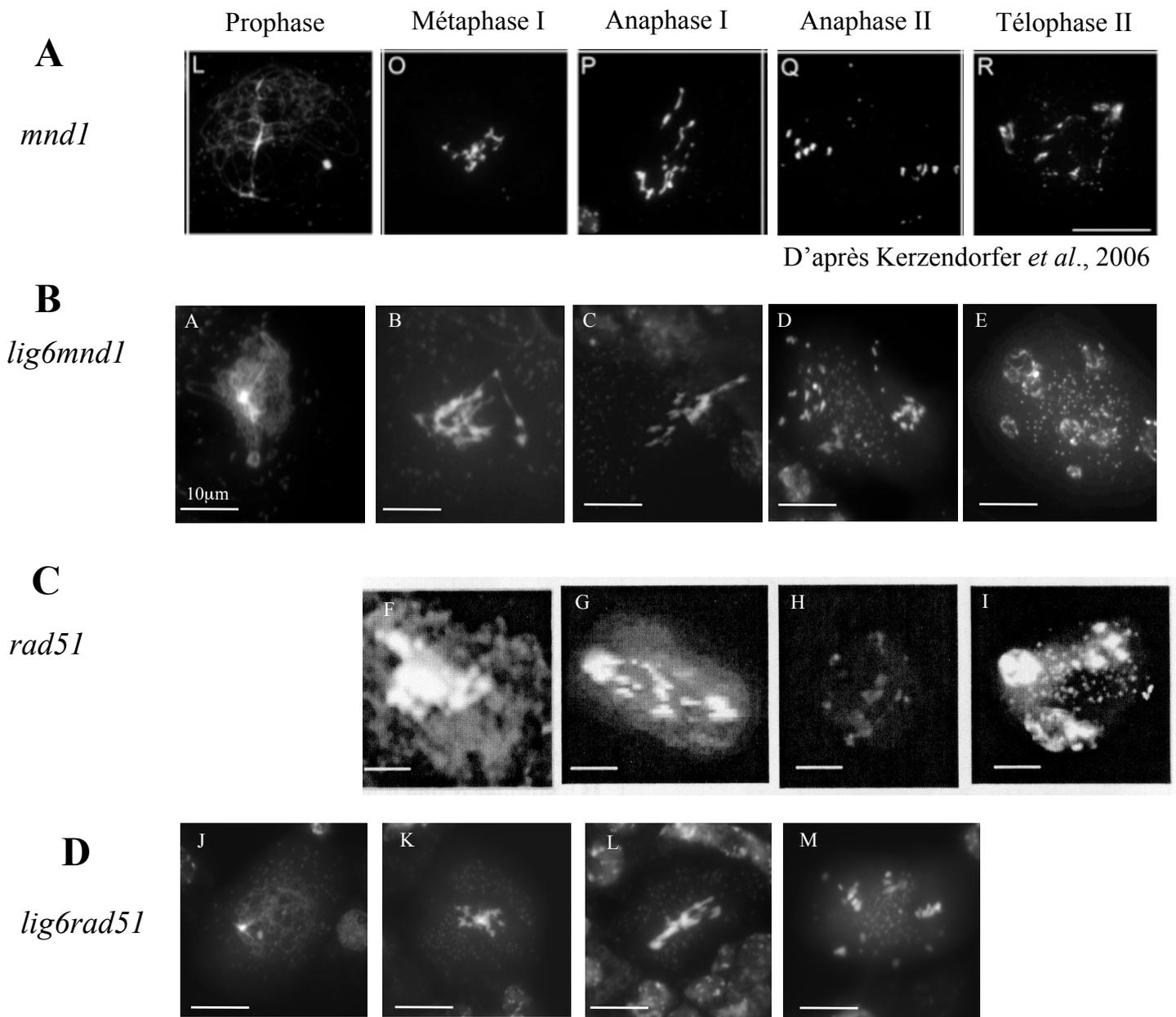


Figure 26 : Observation du déroulement de la méiose dans différents contextes mutants après coloration de l'ADN des méiocytes au DAPI

A- Déroulement de la méiose chez le mutant *mnd1* (L, O, P, Q, R) en prophase, métaphase I, anaphase I, Anaphase II et télophase II respectivement. Les photos sont issues des travaux de Kerzendorfer *et al.*, publiés en 2006.

B- Déroulement de la méiose chez le double mutant *lig6mnd1* (A, B, C, D) en prophase, métaphase I, anaphase I, Anaphase II et télophase II respectivement. Les photos sont issues de mes propres observations

C- Déroulement de la méiose chez le mutant *rad51* (F, G, H, I) en métaphase I, anaphase I, Anaphase II et télophase II respectivement. Les photos sont issues des observations de Marie-Pascale Doutriaux (non publiées).

D- Déroulement de la méiose chez le double mutant *lig6rad51* (J, K, L, M) en prophase, métaphase I, anaphase I et Anaphase II respectivement. Les photos sont issues de mes propres observations

mind1 et *rad51* (Figure 26, B et D). Ceci indique que la Ligase 6 n'intervient pas non plus dans la formation des anomalies chromosomiques observées chez les mutants *rad51* et *mind1*.

Chapitre III : Etude des gènes *XRCC4* et *XRCC4-like*, nouveaux acteurs du NHEJ ?

I. Obtention des mutants *xrcc4* et *xrcc4-like*

Lors de la réparation des CDB de l'ADN par NHEJ, l'étape finale de ligation est effectuée par le complexe Ligase IV-Xrcc4. Chez la levure, Xrcc4 est nommé Lif1. De plus, chez différents organismes comme la levure et les mammifères, ce complexe Ligase IV-Xrcc4 est aidé par un troisième facteur nommé Lif2 ou Nej1 chez la levure, Xlf chez les mammifères et Cernunnos chez l'humain. Chez *Arabidopsis*, l'homologue de *XRCC4* (At3g23100) a été identifié par homologie de séquence et grâce à son interaction avec la Ligase IV (West et al., 2000). En revanche le mutant d'insertion *xrcc4* n'a jamais été étudié.

Lors de l'étude menée par West et al., en 2000, la recherche par homologie de séquence chez *Arabidopsis*, a permis d'identifier en plus du gène *XRCC4*, un autre gène ayant 39,6% d'identité de séquence nucléotidique au niveau de l'ADN génomique avec le gène *XRCC4* (Figure 27), et dont le rôle est inconnu. Ce gène ne présente pas d'introns. Les ADNc de ces deux gènes présentent 69% d'identité de séquence et les protéines codées par ces deux gènes sont identiques à 78%. Nous avons nommé ce gène *XRCC4-like* (At1g61410) et nous nous sommes demandés s'il ne pouvait pas être le troisième partenaire du complexe de ligation qui a été identifié chez les mammifères.

Nous avons commandé, un mutant du SALK Institute (S_128480) contenant une insertion de l'ADN-T à l'état hétérozygote dans le quatrième intron du gène *XRCC4* (Figure 28, A). Après auto-fécondation, le mutant homozygote a été identifié par génotypage. Un mutant du SALK Institute (S_093939), contenant une insertion de l'ADN-T de façon hétérozygote dans l'exon du gène *XRCC4-like*, a également été commandé (Figure 28, A). Après auto-fécondation nous avons identifié par génotypage, un mutant homozygote *xrcc4-like*. Compte tenu de la forte identité de séquence nucléotidique des ADNc de *XRCC4* et *XRCC4-like*, l'étude de l'expression génique de ces deux gènes aurait été délicate si elle avait été réalisée sur les simples mutants *xrcc4* et *xrcc4-like*. C'est pour cela que l'étude sur l'expression génique par

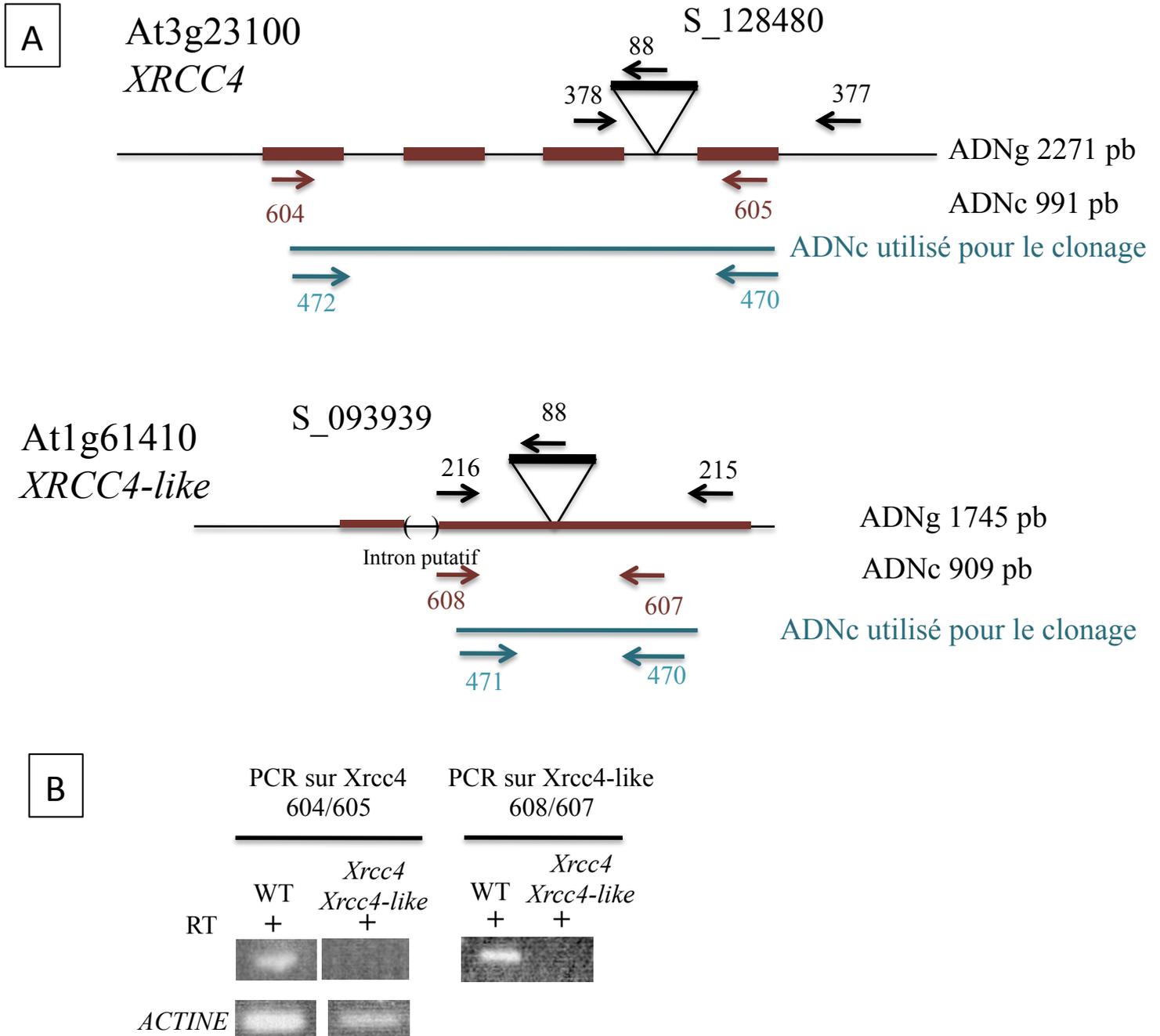


Figure 28 : Les mutants *xrcc4* et *xrcc4-like*

A- Schéma des gènes *XRCC4* et *XRCC4-like*. Le trait noir représente l'ADN génomique, les rectangles rouges représentent les exons. Le triangle représente l'ADN-T à l'endroit où il est inséré dans le gène. Les oligos en noir sont utilisés pour le génotypage, ceux en rouge pour les RT-PCR et ceux en vert pour le clonage en perspective d'un test de double hybride.

B- RT-PCR déterminant l'expression des gènes *XRCC4* et *XRCC4-like*. Un contrôle de RT-PCR est effectué sur l'actine afin de vérifier l'intégrité des ADNc. Une PCR utilisant les oligonucléotides 604/605 spécifiques de l'ADNc de *XRCC4*, et amplifiant un fragment de 888 pb, est effectuée sur des ADNc issus d'une plante sauvage et sur des ADNc issus d'une plante double mutante *xrcc4 xrcc4-like*. Une PCR utilisant les oligonucléotides 607/608 spécifiques de l'ADNc de *XRCC4-like*, et amplifiant un fragment de 660 pb, est effectuée sur des ADNc issus d'une plante sauvage et sur des ADNc issus d'une plante double mutante *xrcc4 xrcc4-like*.

RT-PCR a été effectuée sur le double mutant *xrcc4 xrcc4-like*. Ce double mutant a été obtenu au laboratoire après croisement entre les deux simples mutants.

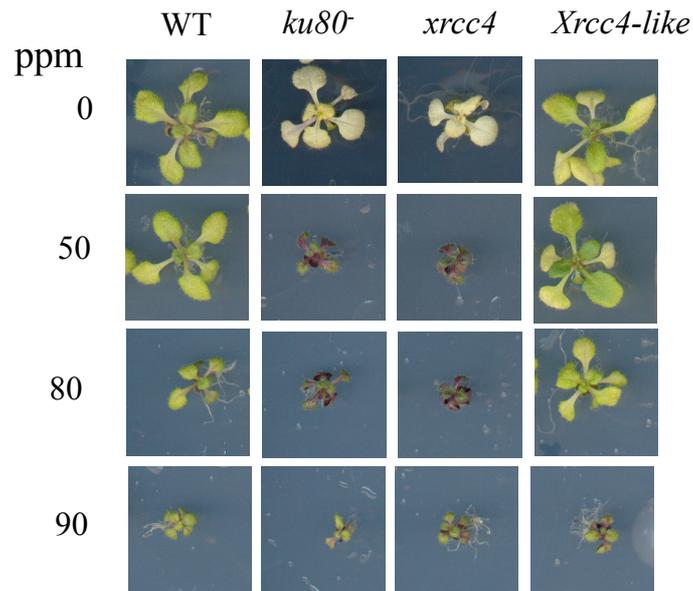
Par RT-PCR avec les oligonucléotides 604/605 (représentées dans la Figure 28, A), un transcrit de 888pb a été amplifié, correspondant à la séquence prédite de l'ADNc du gène *XRCC4* en contexte sauvage (Figure 28, B). Aucune amplification n'est obtenue, en RT-PCR, avec ce couple d'oligonucléotide dans le contexte double mutant *xrcc4 xrcc4-like* (Figure 28, B). Ceci indique que le mutant *xrcc4* est bien un mutant nul. Je ne présente pas les résultats de RT-PCR effectués en absence de RT, car la présence d'introns dans l'ADN génomique (ADNg) du gène *XRCC4* permet de différencier par la taille obtenue une amplification de l'ADNc (888pb) et de l'ADNg (1363pb). L'expression génique du gène *XRCC4-like* a tout d'abord été analysée en contexte sauvage. En RT-PCR, en utilisant les oligonucléotides 608/607 spécifiques pour cette séquence. J'ai obtenu une amplification de 660pb, correspondant à la taille prédite (Figure 28, B) mais nous ne pouvons pas distinguer si cette amplification provient de l'ADNc ou de l'ADNg, le gène *XRCC4-like* ne comportant pas d'intron. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'expression de *XRCC4-like* en contexte sauvage. Cependant, en contexte double mutant *xrcc4 xrcc4-like*, aucune amplification n'est obtenue, en RT-PCR, le mutant *xrcc4-like* est donc également un mutant nul.

II. Sensibilité des mutants *xrcc4* et *xrcc4-like* à différents stress génotoxiques

Les mutants *xrcc4* et *xrcc4-like* sont viables, ils ont une croissance normale et sont fertiles. J'ai donc testé la sensibilité du mutant *xrcc4* et du mutant *xrcc4-like* aux différents stress génotoxiques, qui ont déjà été utilisés sur les mutants du NHEJ ou du SSA.

Les graines provenant des mutants ont été stérilisées puis semées sur du milieu MS 0,5 supplémenté avec 1% de saccharose et contenant du MMS à différentes doses : 0, 50, 80 et 90 ppm. La croissance des feuilles a été observée après 21 jours de croissance. En présence de MMS, le mutant *xrcc4* présente une sensibilité, tout comme le mutant du NHEJ : *ku80*. Cette sensibilité se traduit par un retard du développement de la plante ainsi qu'un aspect anthocyané visible à une dose de 50 ppm après 21 jours de croissance (Figure 29, A). Un autre test a permis l'observation des racines. Après 14 jours de croissance, on a observé que le mutant *xrcc4* est légèrement sensible au MMS, à une dose de 70 ppm. Cette sensibilité est

A



B

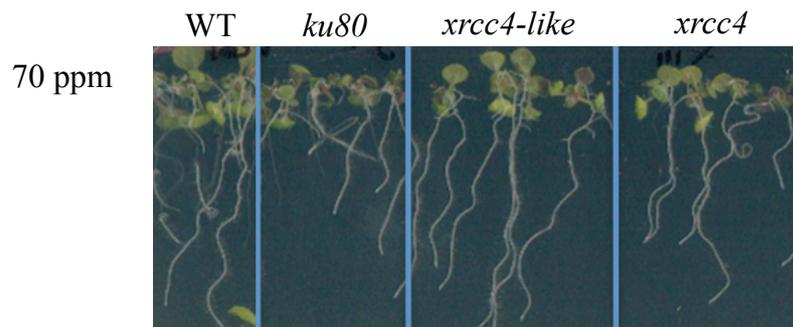


Figure 29 : Sensibilité des mutants *xrcc4* et *xrcc4-like* au MMS

A- Observation du développement des feuilles en présence ou en absence de MMS

Les graines stérilisées sont semées sur milieu MS 0,5 supplémenté par 1% de saccharose et contenant des doses de 0 à 90 ppm de MMS. Les semis sont laissés 48 heures à l'obscurité et à 4°C pour synchroniser la germination. Puis les semis sont mis en chambre de culture. Les photos ont été prises à J+21 après semis. L'effet est visible dès 50 ppm sur les mutants *ku80* et *xrcc4* par rapport au sauvage. Le mutant *xrcc4-like* ne présente pas de sensibilité au MMS.

B- Observation du développement des racines

Les graines stérilisées sont semées sur milieu MS 0,5 supplémenté par 1% de saccharose et contenant une dose de 70 ppm de MMS. Les semis sont laissés 48 heures à l'obscurité et à 4°C pour synchroniser la germination. Puis les semis sont mis en chambre de culture. Les photos ont été prises à J+14 après passage en chambre de culture. Le mutant *xrcc4*, comme le mutant du NHEJ *ku80*, présente une sensibilité au MMS, bien que plus atténuée. En revanche, le mutant *xrcc4-like* ne présente pas de sensibilité au MMS.

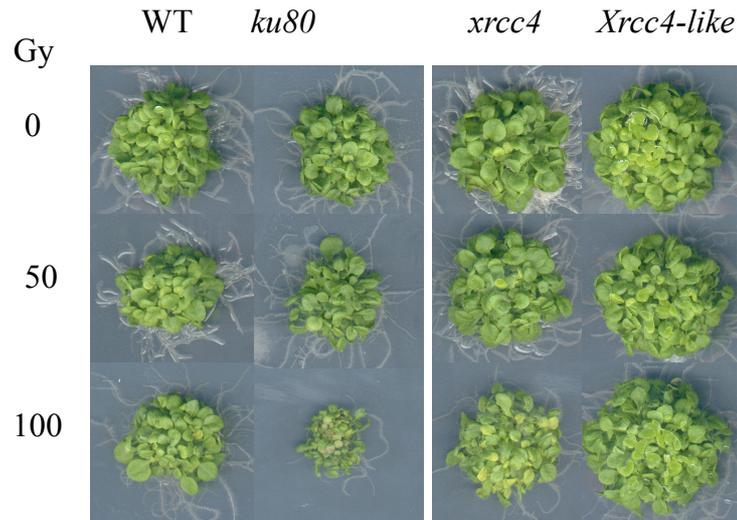
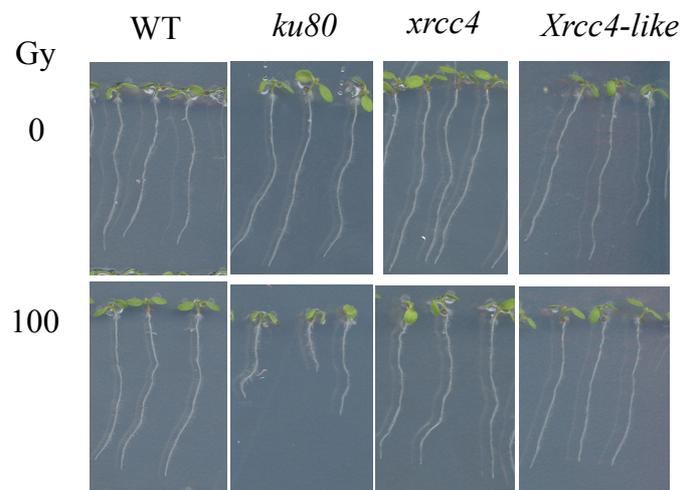
A**B**

Figure 30 : Sensibilité des mutants *xrcc4* et *xrcc4-like* aux irradiations gamma

A- Observation du développement des feuilles. Les graines stérilisées sont semées en semis dense et sur une faible surface. Après avoir été placés 48 heures à l'obscurité et à 4°C pour la synchronisation de la germination, les semis sont irradiés à des doses de 50 et 100 Gy ou sont non irradiés. L'effet est visible à 100 Gy pour le mutant *ku80* et plus légèrement pour le mutant *xrcc4* par rapport au sauvage. Le mutant *xrcc4-like* ne présente pas de sensibilité aux irradiations gamma. Les photos ont été prises à J+21 après semis.

B- Observation du développement des racines. Les graines stérilisées, sont irradiées à 100 Gy ou non irradiées puis placées 48 heures à l'obscurité et à 4°C pour la synchronisation de la germination. Les graines sont ensuite semées sur du milieu MS 0,5 et la croissance racinaire est observée après 8 jours de croissance.

toutefois plus faible que celle du mutant *ku80* (Figure 29, B). Le mutant *xrcc4-like* lui ne présente pas de sensibilité, au niveau des feuilles et des racines, au MMS, il a le même phénotype que le sauvage (Figure 29, A et B).

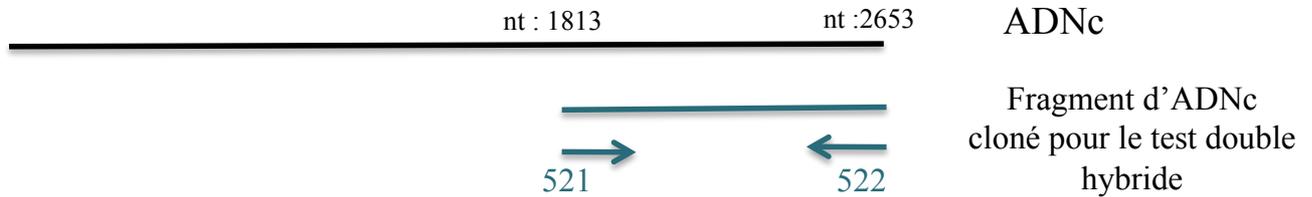
Puis un autre test est effectué cette fois pour observer la sensibilité de ces mutants aux irradiations gamma. Un semis dense est effectué sur du milieu MS 0,5 contenant 1% de saccharose, puis est irradié à 50, 100 Gy ou non irradié pour servir de témoin. La croissance du semis au niveau des feuilles a été observée après 14 jours de croissance (Figure 30, A). A 100 Gy, le mutant *xrcc4* présente une légère sensibilité observable par son retard de croissance par rapport au sauvage. Cette sensibilité est toutefois moindre par rapport au mutant *ku80*. En revanche le mutant *xrcc4-like* n'est pas sensible aux mêmes doses d'irradiation gamma. Un autre test permettant d'observer l'impact des irradiations gamma sur le développement des racines ne montre pas de sensibilité des mutants *xrcc4* et *xrcc4-like* alors que le mutant *ku80* est sensible (Figure 30, B).

Les résultats de sensibilité aux stress génotoxiques montrent que le mutant *xrcc4* semble sensible au MMS et aux irradiations gamma au niveau du développement des feuilles en revanche, sa sensibilité au niveau de la croissance racinaire semble plus ambiguë. Le mutant *xrcc4-like* lui ne présente pas de sensibilité aux stress génotoxiques utilisés. Ce résultat nous oriente vers le fait que *Xrcc4-like* ne serait pas un acteur de la réparation des cassures de l'ADN et donc pas l'homologue fonctionnel de Cernunnos.

III. Déroulement de la méiose chez les mutant *xrcc4* et *xrcc4-like* inactivé pour *Brca2*

Le déroulement de la méiose a été observé après dissection des méiocytes et la coloration des chromosomes au DAPI. Le mutant *xrcc4* présente une méiose normale avec formation de bivalents, ségrégation des chromosomes homologues et enfin séparation des chromatides sœurs. Lorsque *Brca2* est inactivé par ARN interférence spécifiquement à la méiose dans le mutant *xrcc4*, la méiose se déroule de façon anormale avec des figures chromosomiques typiques à celles observées en l'absence de *Brca2*. Ainsi, d'après ces observations, *Xrcc4*, comme les autres acteurs du NHEJ, ne semble pas intervenir dans la formation des aberrations chromosomiques observées à la méiose en absence de *Brca2*.

Ligase IV



Ligase IV



Figure 31 : Représentation du fragment de l'ADNc du gène *LIGASE IV* utilisé pour le test double hybride.
Le clonage de l'ADNc est réalisé à l'aide des oligonucléotides 521/522 amplifiant un fragment allant du nucléotide 1813 au nucléotide 2653. Ce fragment comporte la séquence codant pour les deux domaines BRCT de la Ligase IV décrit comme interagissant avec Xrcc4.

CD: domaine catalytique conservé chez toutes les ADN ligases qui contient le site actif.

NCD : région qui représente le domaine non catalytique conservé chez toutes les ligases.

(d'après Martin et MacNeill, 2002)

L'inactivation de Brca2 a également été réalisée dans le mutant *xrcc4-like* même si d'après les résultats déjà obtenus pour ce mutant, l'implication de Xrcc4-like dans ces anomalies semble proscrite. Le déroulement de la méiose est inchangé en absence de Brca2, elle comporte toujours les mêmes aberrations chromosomiques, confirmant que Xrcc4-like n'agit pas en méiose en absence de Brca2.

IV. Interaction entre la Ligase IV, Xrcc4 et Xrcc4-like

Il a été montré que la Ligase IV interagissait, *via* son domaine BRCT, avec Xrcc4 et Lif2 chez la levure. L'interaction entre Ligase IV et Xrcc4 a été également identifiée chez *Arabidopsis* grâce à un test en double hybride (West et al., 2000). Nous avons donc entrepris de retrouver ces interactions et de tester une interaction éventuelle entre la Ligase IV et Xrcc4-like et entre Xrcc4 et Xrcc4-like. Un test en double hybride a donc été réalisé afin de tester ces interactions.

La taille de l'ADNc de la Ligase IV étant trop importante (3555 pb), je n'ai pas réussi à amplifier l'ADNc en entier. Donc pour contourner cette difficulté, j'ai amplifié, à partir des RT-PCR en ma possession, avec les oligonucléotides 521/522 un fragment de l'ADNc de la Ligase IV de 840 pb allant du nucléotide 1813 au 2653 de l'ADNc. Ce fragment comporte les deux domaines BRCT décrits comme interagissant avec Xrcc4 (Figure 31).

Les clones U68145 et U86181, ont été commandés sur le site d'ABRC, ils contiennent respectivement les ADNc (non entier) de *XRCC4* (du nucléotide 90 au 834) et *XRCC4-like* (du nucléotide 400 au 755) (Figure 28). J'ai ensuite réalisé une amplification par PCR de l'ADNc de *XRCC4*, à partir du clone U68145, avec les oligonucléotides 472/470 contenant les sites de restrictions EcoRI et BamHI nécessaires pour la suite du clonage. J'ai suivi le même protocole pour *XRCC4-like*, à partir du clone U8181, avec les oligonucléotides 471/470. Les oligonucléotides et ADNc utilisés pour ce test double hybride sont représentés sur la Figure 28. Les trois amplifications obtenues, ont ensuite été introduites, indépendamment, par clonage dans le vecteur pGEM-T puis dans les vecteurs double hybride pGAD et pGBT9 (Annexe 3). Les levures Mat a ont été transformées avec le vecteur pGAD contenant soit l'ADNc de *LIGASE IV*, soit l'ADNc de *XRCC4*, soit l'ADNc de *XRCC4-like*. Et les levures Mat α ont été transformées avec le vecteur pGBT9 contenant l'un ou l'autre des

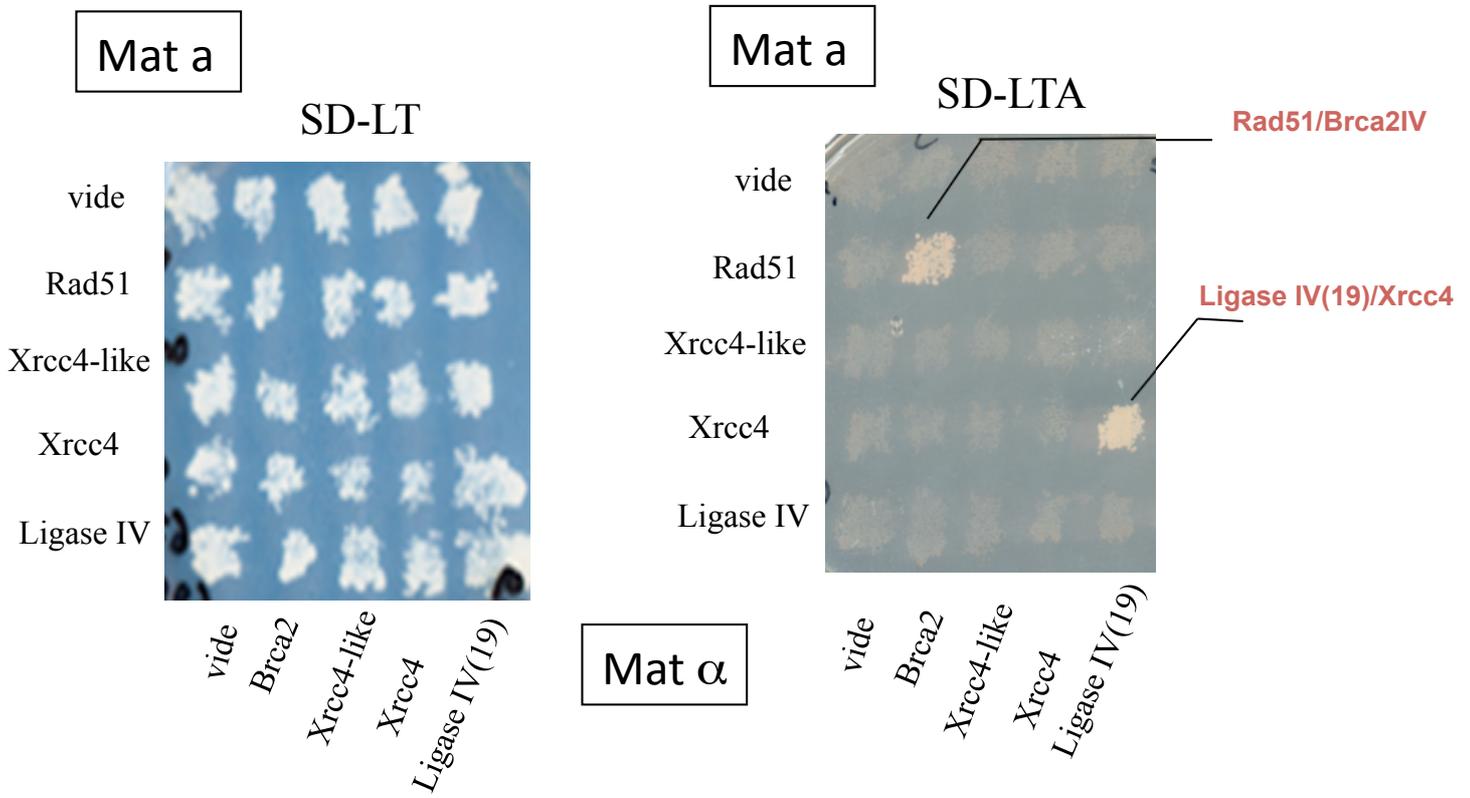


Figure 32 : Test double-hybride

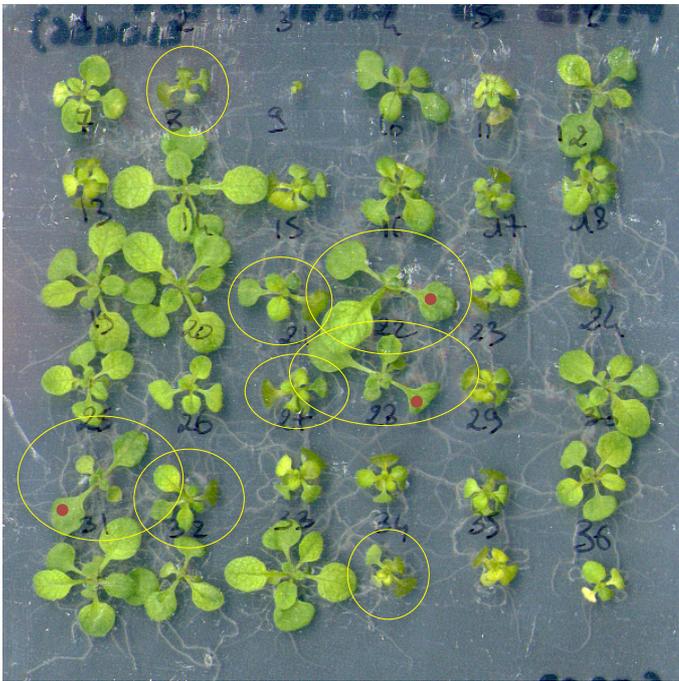
Les souches haploïdes Mat a et Mat α transformées avec les constructions contenant les ADNc des gènes *LIGASE IV*, *XRCCA4* et *XRCCA4-like*, fusionnés avec le domaine de fixation (BD) ou le domaine activateur (AD) de GAL4, sont croisées entre elles. Les souches diploïdes sont déposées sur un milieu synthétique sans leucine ni tryptophane (SD-LT) où elles poussent. Puis, on effectue une réplique sur un milieu synthétique sans leucine, tryptophane et histidine (SD-LTH) (non montré) ou sans leucine, tryptophane et adénine (SD-LTA). Sur ces deux derniers milieux, seuls les diploïdes où il y aura eu interaction entre les deux protéines de fusion se développeront. Le contrôle positif d'interaction correspond aux souches diploïdes contenant l'ADNc de *BRCA2* et de *RAD51*, dont les protéines codées ont déjà été montrées comme interagissant en double hybride. Les photos ont été prises après 2 jours de croissance dans une étuve à 30°C.

Ligase IV(19) : clone 19 contenant l'ADNc (non entier) de *LIGASE IV*

différents ADNc. Ceci afin d'effectuer le test en double hybride de façon réciproque. Puis les levures sont croisées afin d'obtenir des diploïdes, contenant ainsi les deux vecteurs d'intérêt et ces diploïdes sont mis à pousser sur des milieux restrictifs (Annexe 2). Les levures possédant les constructions double hybride contenant les ADNc de *RAD51* (Mat a) et *BRC A2* (Mat α) étaient déjà disponibles au laboratoire et servent de contrôle.

Le test de double hybride montre une interaction entre les témoins, entre Rad51 et Brca2 déjà identifiée au laboratoire (Siaud et al., 2004) validant ainsi ce test (Figure 32). Ce test en double hybride montre l'interaction, déjà identifiée par West *et al.*, 2000, entre la Ligase IV et Xrcc4 d'*Arabidopsis*. En revanche, ce test ne montre pas d'interaction entre Xrcc4 et lui-même alors qu'il est décrit comme agissant en dimère lors du NHEJ. Ce test n'a pas montré non plus d'interaction entre Xrcc4 et Xrcc4-like et entre la Ligase IV et Xrcc4-like. Ce défaut d'interaction est un argument de plus en faveur du fait que Xrcc4-like ne soit pas le troisième facteur du complexe de ligation et donc qu'il ne soit pas impliqué dans la réparation de l'ADN par NHEJ.

MMS 30 ppm



MMS 60 ppm

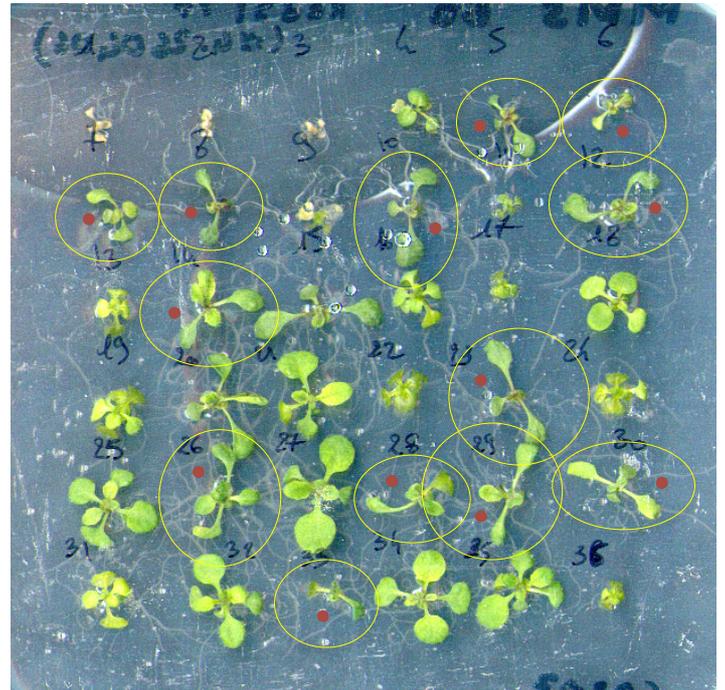


Figure 33 : Descendants d'une plante *RAD51*^{+/-} soumis au MMS

Les graines stérilisées sont semées sur milieu MS 0,5 contenant une dose de 30 ou 60 ppm de MMS. Les semis sont laissés 48 heures à l'obscurité et à 4°C pour synchroniser la germination. Puis les semis sont mis en chambre de culture. Les photos ont été prises à J+21 après semis. A 60 ppm de MMS, un phénotype de sensibilité, des plantes avec des tiges plus allongées et des feuilles recourbées et asymétriques (identifiées par un point rouge) est observé et est corrélé, après génotypage des plantes, au mutant *rad51* (entouré en jaune).

Chapitre IV : Sensibilité au MMS d'un mutant de la RH : *rad51*

Rad51 est un acteur de la recombinaison homologue et le mutant *rad51* d'*Arabidopsis* a déjà été caractérisé (Li et al., 2004). Le gène *RAD51* est également étudié au sein du laboratoire. Nous disposons d'un mutant *rad51* (GABI_134A01), déjà publié (Wang et al., 2010b), qui contient une insertion ADN-T dans le quatrième exon et qui peut être identifié par PCR grâce à des oligonucléotides spécifiques (Annexe 1). Le mutant *rad51* a un développement normal de croissance mais est totalement stérile. La stérilité de ce mutant est le résultat d'un mauvais déroulement de la méiose. En effet, chez le mutant *rad51*, les chromosomes ne s'associent pas en bivalent, ils fragmentent et la répartition chromosomique est inégale ce qui aboutit à la stérilité de la plante.

Nous avons donc testé la sensibilité du mutant *rad51* au MMS. Le mutant *rad51* étant stérile, c'est la descendance d'un hétérozygote, contenant un quart de mutant (*RAD51*^{-/-}), qui a été étudiée. Après stérilisation, les graines venant d'une plante hétérozygote pour *RAD51* ont été semées sur milieu supplémenté avec 30 ppm ou 60 ppm de MMS. Seul le développement des feuilles a été observé pour ce mutant (Figure 33). J'ai montré dans l'article présenté en chapitre I, que les mutants de réparation de l'ADN commençaient à présenter une sensibilité au MMS, visible au niveau des feuilles, à partir d'une dose de 50 ppm. En absence de MMS, les plantes descendantes d'un hétérozygote *RAD51*^{+/-} ne présentent aucun phénotype (non illustré). La dose de 30 ppm a été utilisée comme témoin car une dose si faible n'a normalement pas d'influence visible sur la croissance des feuilles. Les observations ont été effectuées après 20 jours de croissance en chambre de culture. Le génotype de chaque plante a ensuite été déterminé par PCR sur plante entière.

En présence de 30 ppm de MMS, la majorité des plantes, tous génotypes confondus, ont un phénotype développemental normal (Figure 33). Seules trois plantes sur 36 présentaient un léger phénotype comportant des tiges plus allongées et une asymétrie dans la croissance des feuilles (plantes marquées d'un point rouge sur la Figure 33). L'analyse par génotypage montre que ce phénotype, retrouvé chez ces trois plantes, est associé au génotype mutant *rad51*. Cependant, les résultats de génotypage montrent que les autres mutants *rad51*, hormis les trois plantes déjà décrites, présentent un phénotype normal, comme le sauvage et l'hétérozygote. Les plantes génotypées *RAD51*^{-/-} sont entourées en jaune sur la figure 33. De

plus, l'effet de sensibilité du mutant *rad51* semble visible pour une dose faible de 30 ppm suggérant que ce mutant serait plus sensible au MMS que les mutants du NHEJ et du SSA déjà testés. Pourtant, cette observation ne concerne qu'une minorité de plantes et donc à cette dose, les résultats des observation ne sont pas homogènes.

En présence de 60 ppm de MMS, on observe que certaines plantes présentent un phénotype aggravé par rapport à celui déjà observé en milieu contenant 30 ppm de MMS. Ce phénotype se caractérise par des tiges et des feuilles allongées, recourbées et présentant une asymétrie (plantes marquées d'un point rouge sur la Figure 33). Après génotypage de ces plantes, j'ai pu associer le phénotype observé au génotype homozygote mutant pour le gène *RAD51* (les plantes *RAD51*^{-/-} sont entourées en jaune). Ainsi, les plantes mutantes *rad51* et donc déficientes pour la recombinaison homologue présentent un phénotype anormal en présence de MMS.

Ces résultats concordent avec les expériences de stress menées dans les mêmes conditions sur des plantes transformées par un vecteur permettant la formation d'un ARN interférant avec l'expression de *RAD51*, sous contrôle du promoteur 35S. Ces plantes présentent le même phénotype, mais moins accentué, que les mutants *rad51* en présence de 60 ppm de MMS (E. Dubois, communication personnelle). La sensibilité au MMS du mutant *rad51* n'a jamais été décrite, en revanche ce mutant a déjà été présenté comme sensible à la Mitomycine et plus légèrement sensible à la bléomycine (Markmann-Mulisch et al., 2007).

*Discussion et
perspectives*

I. Le double mutant *brca2a brca2b* chez *Arabidopsis*

Siaud et al. (2004) ont montré que Brca2 joue un rôle essentiel en méiose chez *Arabidopsis* car l'inactivation de l'expression des deux gènes *BRC2* par ARNi entraîne une stérilité causée par des défauts méiotiques. L'interaction entre Brca2 et Dmc1 a été mise en évidence chez *Arabidopsis* (Siaud et al., 2004 ; Dray et al., 2006) puis confirmée chez l'humain (Thorslund et al., 2007), suggérant un rôle de Brca2 en phase méiotique. J'ai obtenu les simples mutants *brca2a* et *brca2b* dans l'écotype Columbia. Puis, par croisement, j'ai pu établir le double mutant *brca2a brca2b* au cours de ma thèse.

I.1. Etude du phénotype méiotique du double mutant *brca2a brca2b*

Les simples mutants *brca2a* et *brca2b*, que j'ai obtenus, sont viables et fertiles. Le double mutant *brca2a brca2b* obtenu, est lui aussi viable, il ne présente pas défaut de développement, mais il est stérile. Cette stérilité est le résultat d'un mauvais déroulement de la méiose qui présente les mêmes aberrations chromosomiques observées en méiose chez les plantes inactivées pour Brca2 par ARNi. Ces résultats valident l'efficacité de l'approche par ARNi utilisée précédemment puisque le phénotype méiotique est le même dans les deux cas. Étonnamment, l'étude effectuée par Abe *et al.*, en 2009, a montré que le double mutant *brca2a brca2b* est viable et ne présente pas de défaut de fertilité (Abe et al., 2009). Néanmoins, ces auteurs ont évoqué une stérilité partielle puisque après une coloration Alexander des anthères (ce qui permet de vérifier la viabilité des grains de pollen), ils ont observé que certaines anthères contenaient des grains de pollen non viables. Chez le sauvage et les simples mutants *brca2a* et *brca2b*, les anthères ne contiennent pas ou très peu de pollen non viable alors que les anthères du double mutant *brca2a brca2b* comportent 20% de pollen non viable. Ainsi, les auteurs ont conclu à une stérilité partielle du côté mâle mais n'influençant pas la fertilité de la plante. De plus, il avait été observé dans l'étude effectuée par Abe *et al.*, que par l'introduction d'un ARNi, sous contrôle du promoteur pCaMV35S, éteignant l'expression des deux *BRC2*, les plantes étaient partiellement stériles. Ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'il a été observé que ce promoteur, pCaMV35S, pouvait ne pas être totalement actif en méiose. Mes résultats ont montré que la mutation dans les gènes *BRC2* tout comme l'inactivation de l'expression de ces deux gènes (sous contrôle du promoteur méiotique *pDMCI*) induisaient une stérilité quasi-systématique et quasi-totale.

Cette différence entre mes résultats et ceux obtenus par Abe et al., peuvent peut être s'expliquer par différents faits. Tout d'abord les mutants que j'ai utilisés dans mon étude sont des lignées d'insertion différentes de celles utilisées par Abe *et al.* et n'appartiennent pas au même écotpe. Les mutants que j'ai utilisés sont d'écotype Columbia alors que ceux utilisés par Abe *et al.* sont d'écotype Nossen, établi par le RIKEN Institute. De plus, le mutant *brca2b* utilisé par Abe *et al.*, comporte une insertion de transposon en amont de l'ATG du gène ce qui pourrait ne pas entraîner une absence totale de la protéine. Le double mutant *brca2a brca2b* utilisé dans cette étude pourrait ne pas être un mutant nul et ainsi avoir un phénotype méiotique plus faible que le double mutant que j'ai obtenu. En effet, il n'a pas été montré ni même mentionné d'étude de l'expression des gènes *BRCA2* chez le double mutant *brca2a brca2b* par ces auteurs (Abe et al., 2009). En revanche, j'ai pu confirmer, dans mon étude, que le double mutant *brca2a brca2b* utilisé, est un mutant nul puisque j'ai vérifié par RT-PCR que les deux gènes *BRCA2* n'étaient pas exprimés dans ce double mutant. De plus, Wang et al., en 2010, ont montré depuis la stérilité du double mutant *brca2a brca2b* (Wang et al., 2010b).

Ainsi, mes résultats confirment que les deux gènes, *BRCA2a* et *BRCA2b*, sont redondants au niveau méiotique puisque les simples mutants *brca2a* et *brca2b* ne présentent pas de phénotype méiotique, et que la mutation des deux gènes est nécessaire afin d'observer une stérilité de la plante.

1.2. Etude du phénotype somatique du double mutant *brca2a brca2b*

Lors de mon étude, je n'ai pas observé de problème de développement des simples mutants *brca2a* et *brca2b* ni du double mutant *brca2a brca2b*. Cependant, Abe et al., montrent que le double mutant *brca2a brca2b* présente occasionnellement une fasciation des tiges et une mauvaise phyllotaxie au niveau des tiges secondaires (entre 5% à 40% des plantes). Ce phénotype est amplifié après irradiation gamma. De plus, Abe et al., montrent que les simples mutants *brca2a* et *brca2b* présentent une hypersensibilité, définie par un retard de croissance, au cisplatine et aux irradiations gamma par rapport aux plantes sauvage. Cependant la sensibilité du mutant *brca2b* est moindre par rapport à celle du mutant *brca2a* en ce qui concerne ces deux stress génotoxiques. Ainsi, seul le simple mutant *brca2a* présente une sensibilité aux irradiations gamma, visible à une dose de 200 Gy. Le double mutant *brca2a brca2b* présente une sensibilité plus forte à ces stress génotoxiques que les simples

mutants, révélant un effet additif. Ultérieurement, Wang *et al.*, ont montré que seul le simple mutant *brca2a* était sensible à la mitomycine C et à la bléomycine, contrairement au mutant *brca2b* (Wang et al., 2010b). Ces expériences de sensibilité portent à croire que la mutation du gène *BRCA2a* serait plus « grave » au niveau de la réparation des CDB de l'ADN en phase somatique, que la mutation du gène *BRCA2b*. Ainsi, les deux protéines codées par ces gènes ne seraient pas redondantes au niveau somatique alors qu'elles avaient été définies comme telles jusqu'à présent.

Il serait donc intéressant de soumettre les simples mutants *brca2a* et *brca2b* ainsi que le double mutant *brca2a brca2b* que j'ai obtenu, au MMS puisque la sensibilité de ces mutants à ce stress n'a jamais été testée. De plus, ces mutants pourraient être soumis aux irradiations gamma dans les conditions mises en place au laboratoire afin de comparer avec les résultats déjà publiés. La sensibilité des deux simples mutants pourra être comparée puisqu'il a été montré que le mutant *brca2a* présentait une plus forte sensibilité que le mutant *brca2b* à d'autres stress génotoxiques. De même, la sensibilité du double mutant *brca2a brca2b* serait à comparer avec la sensibilité d'un autre mutant de la recombinaison homologue, le mutant *rad51* par exemple dont j'ai montré qu'il présentait un phénotype de sensibilité au MMS. Afin d'effectuer ce test, le double mutant *brca2a brca2b* étant stérile, ce sont les graines d'une plante dont la mutation pour un des deux gènes est à l'état homozygote mutant et pour l'autre gène, à l'état hétérozygote mutant qui seront semées et soumises à ces deux stress génotoxiques (MMS et irradiations gamma). Puis après observation, les plantes seront prélevées et leur génotype sera établi. Il est nécessaire de faire cette expérimentation sur un grand nombre de plantes puisque seulement 1/4 des descendants seront des doubles mutants.

I.3. Descendants du double mutant *brca2a brca2b* !

J'ai indiqué dans le premier paragraphe que la mutation dans les deux gènes *BRCA2* induisait une stérilité quasi-totale. En effet, j'ai pu observer que le double mutant *brca2a brca2b* produisait quelques graines. Ces graines ont été semées et donnent des plantes, des descendants, qui ne présentent pas de problème de développement en première génération. Il serait intéressant d'observer le développement des générations successives afin de voir si un phénotype apparaît après plusieurs générations. J'ai observé le déroulement des méioses des descendants du double mutant *brca2a brca2b*. Les figures méiotiques des descendants de ce

double mutant sont de « type *brca2* » et ne présentent donc pas un phénotype aggravé. Il serait également intéressant de confirmer cela sur un plus grand nombre de méiose et de suivre les méiose des descendants après plusieurs générations.

Les descendants du double mutant *brca2a brca2b* étant viables, une étude du génome de ces descendants, par profils de digestion ou par électrophorèse en champ pulsé, permettrait d'observer les éventuels réarrangements chromosomiques qui auraient eu lieu au moment de la méiose anormale en absence de Brca2. Cette expérience d'électrophorèse en champ pulsé a été réalisée, chez *Ustilago maydis*, sur les descendants du mutant *brh2 (brca2)* (Kojic et al., 2002b). Les auteurs ont montré que la mutation de *BRH2 (BRCA2)* induit une instabilité chromosomique résultant de l'altération des chromosomes chez ces descendants.

II. Le NHEJ et le SSA n'interviennent pas en méiose dans les aberrations chromosomiques causées par l'absence de Brca2

Mes résultats ont pu montrer que chez *Arabidopsis*, les défauts méiotiques observés en l'absence de Brca2 n'étaient pas le résultat de réparation par les autres principaux mécanismes connus de réparation des CDB de l'ADN : le SSA et le NHEJ. Pourtant, une étude effectuée chez *C. elegans* montre que les figures méiotiques observées en absence de Cebrc-2 (l'homologue de Brca2 chez cet organisme) et qui sont similaires à celles observées chez *Arabidopsis*, sont causées en partie par la Ligase IV (Martin et al., 2005a). En effet, dans les cellules germinales mutantes pour *Cebrc-2*, lorsque l'expression de la Ligase IV est éteinte par ARNi, les figures « type *brca2* » sont différentes. Les chromosomes paraissent moins emmêlés et on peut distinguer des structures chromosomiques. *C. elegans* comporte 6 paires de chromosomes. Lors d'un déroulement normal de la méiose, les auteurs ont comptabilisé 6 structures chromosomiques correspondant aux 6 bivalents. En contexte mutant *Cebrc-2*, les auteurs ne comptent que 1 à 5 structures chromosomiques révélant l'aspect emmêlés des chromosomes. En revanche, chez le mutant *Cebrc-2* dont l'expression de la Ligase IV a été inactivée par ARNi, les auteurs ont dénombré entre 9 et 12 structures chromosomiques. Ce phénotype différent indique que la Ligase IV aurait un rôle dans la formation des anomalies observées en absence de Brca2 en méiose. En revanche, la méiose du mutant *rad51* contenant l'ARNi Ligase IV est inchangée par rapport au simple mutant *rad51*. Ceci indique que la

Ligase IV n'intervient pas dans la formation des figures chromosomiques observées dans un mutant *rad51*. Le mutant *CeBrc-2* est donc bien différent du mutant *rad51*.

Même si mes résultats ont permis d'écarter l'implication des voies du NHEJ et du SSA dans les figures chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2, il n'est pas exclu qu'un autre mécanisme de réparation soit impliqué. Ainsi, je n'ai pas testé l'implication du B-NHEJ, NHEJ alternatif n'utilisant pas les mêmes acteurs moléculaires que le NHEJ classique. Pour cela, il faudrait obtenir des mutants du B-NHEJ, le NHEJ alternatif, *xrcc1* par exemple, pour lesquels l'expression de Brca2 est inactivée en méiose par ARNi et observer le déroulement de la méiose. De plus, il se pourrait que le mécanisme de réparation de l'ADN pouvant être à l'origine de ces anomalies ne soit pas encore décrit ou soit non conventionnel, c'est-à-dire que plusieurs acteurs moléculaires de différentes voies de réparation pourraient être impliqués.

III. Intervention des Ligases dans les anomalies chromosomiques en méiose

Toujours dans l'hypothèse où les anomalies observées en absence de Brca2 résulteraient de liaisons covalentes entre chromosomes, j'ai continué cette étude toujours dans le but d'identifier l'acteur qui est responsable de ces anomalies. Ainsi, j'ai émis l'hypothèse que peut-être une ligase agirait seule pour réparer les CDB de l'ADN engendrées par Spo11 en méiose.

III.1. Intervention de la Ligase I ?

La Ligase I paraissait un bon candidat. Afin de contourner le fait que la mutation de la *LIGASE I* soit létale à l'état homozygote, j'ai construit un ARNi permettant d'éteindre l'expression de la Ligase I spécifiquement en méiose. Lorsque cette construction ARNi */LIGASE I* est introduite dans un contexte génétique sauvage, le déroulement de la méiose reste normal. Lorsqu'elle est introduite dans un contexte génétique double mutant *brca2a brca2b*, j'ai observé que la méiose était également inchangée, de « type *brca2* » avec des chromosomes emmêlés. Cependant, ces résultats ne peuvent pas nous permettre de conclure sur une absence d'implication de la Ligase I dans les aberrations chromosomiques observées

en méiose en absence de Brca2. En effet, d'après les résultats obtenus avec les plantes sauvages transformées, il est possible que l'ARNi ne soit pas fonctionnel ou pas fonctionnel au bon moment. Ainsi l'expression de la Ligase I ne serait pas éteinte en méiose ou pas éteinte au bon moment lors de la méiose.

Pour étudier si la Ligase I pourrait avoir une implication dans les anomalies méiotiques observées, on pourrait tenter une stratégie différente. Chez le mutant homozygote *ligase I*, l'introduction d'une construction contenant l'ADNc de la Ligase I sous contrôle du promoteur constitutif pCaMV35S pourrait permettre la complémentation de ce mutant. Ce mutant complémenté serait ainsi viable. Il a été constaté que le promoteur pCaMV35S n'est pas totalement actif en méiose, ainsi les constructions sous contrôle de ce promoteur ne sont pas systématiquement exprimées en méiose. Ainsi le mutant *ligase I* serait complémenté en phase somatique par l'introduction de cette construction et serait donc viable, mais ne le serait pas complètement en phase méiotique où la ligase I sera donc absente. Ainsi, nous pourrions tester l'implication éventuelle de la Ligase I en méiose, dans un contexte sauvage et dans un contexte double mutant *brca2a brca2b*.

III.2. Redondance des Ligases

Le phénotype méiotique observé en absence de Brca2 n'est peut être pas le résultat d'une seule ligase mais peut résulter de la coopération de celles-ci. Ainsi, afin d'identifier si les ligases ont un rôle redondant dans les anomalies méiotiques observées en absence de Brca2, il faudrait générer des doubles voire des triples mutants pour les différentes ligases. J'ai initié l'étude du double mutant pour les gènes *LIGASE IV* et *LIGASE 6*, en construisant tout d'abord ce double mutant. Il est viable et fertile. En revanche, je n'ai pas été plus loin dans sa caractérisation. Je n'ai pu construire le « triple mutant de Ligase » puisque la mutation de la Ligase I est létale à l'état homozygote et que l'inactivation de l'expression génique de celle-ci n'a pas donné de résultat. Ainsi, il serait intéressant d'obtenir des plantes ne contenant pas de Brca2 ni aucune des trois ligases afin d'observer si les anomalies chromosomiques sont maintenues ou non.

IV. Le rôle de la Ligase 6

La Ligase 6 est trouvée uniquement chez les plantes, et son rôle reste encore inconnu. Le fait qu'elle comporte un domaine β -metallo-lactamase, comme la protéine Artemis intervenant dans le NHEJ, nous avait permis de penser que cette ligase pourrait également être impliquée dans le NHEJ. Elle aurait donc pu avoir un double rôle, celui de maturer la cassures lorsqu'il y a des extrémités spécifiques et de religuer ensuite ces extrémités cassées.

D'après mes résultats, l'absence de la Ligase 6 ne semble pas engendrer de phénotype de sensibilité aux UV et aux irradiations gamma. Waterworth *et al.*, en 2010, ont également étudié le mutant Ligase 6, la lignée d'insertion utilisée n'est pas celle que l'on a étudiée. Ils ont identifié, à la différence de notre étude, une sensibilité du mutant aux irradiations gamma mais qui est minime par rapport à la sensibilité pour ce même stress observés chez le mutant du NHEJ : *ligase IV* (Waterworth et al., 2010b). Parallèlement nous avons testé la résistance du mutant *ligase 6* au MMS. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de conclure. En effet, j'ai pu observer une légère sensibilité à ce stress mais je n'ai pas pu le reproduire. Ainsi, le rôle de la Ligase 6 dans le NHEJ semble peu probable puisque les mutants du NHEJ et en particulier le mutant *ligase IV* sont sensibles aux MMS et aux irradiations gamma. Pourtant il n'est pas à exclure que la Ligase 6 pourrait avoir un rôle redondant avec d'autres protéines comme Snm3 qui comporte également un domaine β -metallo-lactamase et qui pourrait être l'homologue d'Artemis (Communication personnelle de Jean Molinier). Afin d'identifier si la Ligase 6 est impliquée dans le NHEJ pour intervenir dans l'étape de ligation lorsque les extrémités cassées comportent des « épingles à cheveux », il faudrait effectuer un test de religation de plasmide comportant ce type d'extrémité dans des protoplastes.

Dans un second temps, nous nous sommes demandé si la Ligase 6 ne pouvait pas remplacer la Ligase III, absente chez *Arabidopsis*. La ligase III intervient dans la voie du « short patch » du BER et dans le NER en association avec Xrcc1. Afin d'identifier si la Ligase 6 a le rôle de la Ligase III chez les plantes, il serait intéressant de réaliser un test d'interaction par double hybride entre la Ligase 6 et Xrcc1. J'ai voulu réaliser cette expérience mais l'ADNc de la Ligase 6 étant très grand (4254 pb), je n'ai pas réussi à le cloner entièrement. Cette expérience pourra être faite avec des fragments des différents domaines de la Ligase 6 afin de contourner la difficulté du clonage entier de l'ADNc.

Dans le but d'identifier le rôle de la Ligase 6, il serait intéressant de tester son implication dans le BER ou le NER. Ceci pourrait être possible en utilisant un système *in vitro* de réparation par BER par exemple permettant d'identifier si en l'absence de la Ligase 6, la réparation de ce système est fonctionnelle ou pas. Ce résultat nous permettra de conclure sur l'implication de la Ligase 6 dans le BER.

De plus, Emeline Dubois a travaillé sur des plantes dont l'expression du gène *DUTI*, qui code pour une protéine limitant l'incorporation de l'uracile dans l'ADN lors de la réplication, a été inactivée par ARNi. Ses travaux de thèse ont montré qu'en présence de 5-FU, un analogue de l'uracile, dans le milieu de culture, ces plantes présentaient un retard de croissance (Siaud et al., 2010). Ainsi, ce test montre que l'incorporation d'uracile dans l'ADN est toxique pour la plante bien que le système d'excision des uraciles par BER soit fonctionnel. Si la Ligase 6 est impliquée dans le BER, le mutant *ligase 6* pourrait montrer une sensibilité accrue au 5-FU chez une plante dont les uraciles sont incorporés dans l'ADN, résultat de l'inactivation de l'expression du gène *DUTI*, et dont le BER est inactif par l'absence de la Ligase 6. J'ai effectué un test qui a montré une légère sensibilité du mutant *ligase 6* mais ce résultat n'a pas été reproductible. En revanche, je n'ai pas testé la sensibilité du mutant *ligase 6* contenant l'ARNi/*DUTI*.

V. Rôle des cohésines, des acteurs du complexe synaptonémal dans les anomalies méiotiques observées en absence de Brca2 ?

J'ai montré que les mécanismes de réparation de l'ADN, le NHEJ et le SSA, ainsi que la Ligase 6 n'interviennent pas dans les aberrations chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2. D'après ces résultats, il est donc envisageable que ces structures chromosomiques ne soient pas le résultat de liaisons covalentes. Dans ce cas, le complexe cohésine et le complexe synaptonémal pourraient être impliqués dans ces anomalies chromosomiques. Ainsi, ces complexes qui se forment afin de synapser les chromosomes homologues, pourraient être déstabilisés en absence de Brca2 et induire des associations entre chromosomes non homologues. Il a été montré, chez la levure (Bishop et al., 1992) et la souris (Pittman et al., 1998b), que la mutation du gène *DMC1* entraînait un défaut dans la formation du complexe synaptonémal et donc dans l'appariement des bivalents. Ce résultat

indique que Dmc1, impliquée dans la recombinaison méiotique, a également un rôle dans la mise en place du complexe synaptonémal. Il est donc légitime de se demander si Brca2 n'aurait pas aussi un rôle dans la formation de ce complexe. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait observer le déroulement de la méiose chez des plantes où Brca2 et un ou plusieurs acteurs moléculaires du complexe cohésine et du complexe synaptonémal sont absents.

Chez *Arabidopsis*, l'absence de Rec8 ou de Scc3, cohésines intervenant lors de la méiose, entraîne des défauts de réparation des CDB caractérisés par une fragmentation des chromosomes (Chelysheva et al., 2005). Chez le riz également, l'absence de Rec8 entraîne une fragmentation des chromosomes à la méiose (Zhang et al., 2006). Ces observations suggèrent que la présence de Rec8 est importante pour la réparation des CDB de l'ADN, ce qui indique l'importance des cohésines dans la voie de réparation des CDB. Il serait donc intéressant de générer des mutants des cohésines, *rec8* et *ssc3* par exemple, d'introduire l'ARNi/*BRCA2* dans ce contexte mutant et d'observer le déroulement méiotique. Un changement dans le phénotype méiotique « type *brca2* » pourrait indiquer que la protéine absente chez le mutant serait responsable des anomalies chromosomiques observées.

Chez *Arabidopsis*, la protéine Asy1 est un composant de l'élément axial du complexe synaptonémal et en absence d'Asy1, le complexe synaptonémal n'est presque plus formé donc les bivalents ne s'apparient pas et les CDB de l'ADN sont donc réparées entre chromatides soeurs (Caryl et al., 2000). Ainsi, nous pourrions regarder si la protéine Asy1 est impliquée dans la formation des anomalies chromosomiques méiotiques observées en absence de Brca2. Pour ce faire, nous pourrions générer une plante chez laquelle Brca2 et Asy1 seraient absents (mutation ou ARNi), et nous pourrions observer si les figures chromosomiques « type *brca2* » sont toujours présentes. Cependant, la fonction des protéines du complexe synaptonémal pouvant être redondante, il pourrait être nécessaire de générer des doubles ou triples mutants afin d'inactiver complètement la fonction de la protéine en question. Par exemple, il a été identifié un homologue de *ASY1* chez *Arabidopsis* nommé *ASY2*, dont la protéine codée par ce gène pourrait avoir une fonction redondante avec Asy1 (Caryl et al., 2000). Le double mutant *asy1 rad51* a été décrit par Sanchez-Moran et al., en 2007 qui ont montré que ce double mutant avait le même phénotype méiotique que le simple mutant *rad51* (Sanchez-Moran et al., 2007). Ce résultat peut laisser penser que Asy1 n'a pas d'incidence dans la formation des anomalies chromosomiques observées chez le mutant *rad51*. Mais comme nous l'avons vu, la redondance des protéines ne permet pas d'exclure

l'implication des protéines du complexe synaptonémal dans le phénotype méiotique *rad51* et, en perspective, dans celui de du mutant *brca2a brca2b*. De plus, les anomalies méiotiques observées chez le double mutant *brca2a brca2b* et le mutant *rad51* ne sont peut être pas le résultat des mêmes mécanismes.

La protéine Zyp1 pourrait également être testée pour déterminer son implication dans les anomalies chromosomiques méiotiques observées en absence de Brca2. Zyp1, sous forme de dimère, est le composant de l'élément central du complexe synaptonémal. Il existe chez *Arabidopsis*, deux gènes *ZYP1* (a et b) dont les protéines ont une fonction redondante. Lorsque l'expression génique de ces deux gènes *ZYP1* est inactivée par ARNi, il a été observé que le complexe synaptonémal ne se forme pas (Higgins et al., 2005). Nous pourrions éteindre l'expression de *ZYP1* dans un double mutant *brca2a brca2b* afin d'observer si la méiose a un déroulement différent du double mutant *brca2a brca2b*.

Chez *C. elegans*, l'étude de Martin *et al.*, a montré l'implication partielle de la Ligase IV dans les figures chromosomiques observées en méiose. Cette étude a également montré, par immunolocalisation, que la protéine Syp-1, composant du complexe synaptonémal présentait une localisation identique en méiose, en contexte sauvage ou mutant *brca2*. Ainsi, le complexe synaptonémal est mis en place même chez le mutant *brca2* (Martin et al., 2005a). Mais nous avons vu avec mes résultats que l'intervention d'acteur moléculaire en méiose identifié chez *C. elegans* (Ligase IV), n'est pas retrouvé chez *Arabidopsis*. Ainsi, la cause des anomalies chromosomiques observées peut être différente entre les deux organismes.

Cependant, la mutation des acteurs du complexe synaptonémal risque d'être épistatique sur la mutation des gènes *BRCA2a* et *BRCA2b* ce qui ne nous permettrait pas de conclure sur leur implication dans le phénotype méiotique observé en absence de Brca2.

L'observation par immunolocalisation des acteurs du complexe cohésine et du complexe synaptonémal dans un contexte WT ou mutant *brca2a brca2b* permettrait également d'identifier si la formation de ces complexes se fait normalement ou de façon anarchique.

Conclusion

Chez *Arabidopsis*, lorsque l'expression de *BRC A2* est inactivée à la méiose ou chez le double mutant *brca2a brca2b*, des figures chromosomiques aberrantes entraînent la stérilité de la plante et leur origine n'a pas encore été déterminée. Ainsi mes travaux de thèse n'ont pas permis d'identifier les mécanismes ou acteurs responsables des figures méiotiques observées en absence de Brca2. Cependant, mes résultats de thèse ont permis d'éliminer l'implication des mécanismes de réparation de l'ADN : le NHEJ et le SSA ainsi que l'implication de la Ligase 6.

Matériels et méthodes

I. Matériels

1) Matériel végétal

Le modèle végétal utilisé est la plante *Arabidopsis thaliana*, dont l'écotype est Colombia (Col-0).

Le laboratoire a réuni différents mutants d'insertion d'*Arabidopsis thaliana* qui proviennent des collections disponibles pour la communauté scientifique de lignées de mutants SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) et GABI (<http://gabi-kat.de/>).

Les plantes utilisées durant ma thèse sont référencées dans le tableau en annexe 1.

Les plantes sont cultivées soit en serre, soit en chambre de culture.

En serre, elles sont cultivées en terreau, pendant 3 semaines en conditions « jours courts », photopériode : 8 heures de jour à 20°C et 16 heures de nuit à 18°C, puis en conditions « jours longs » : la photopériode dépend de la saison et la température est de 18°C.

En chambre de culture, elles sont cultivées *in vitro* sur milieu MS 0,5

2) Souches de bactéries

Les bactéries utilisées dans ces études sont *Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens*.

La souche DH5a d'*E. coli* ($\Delta(argF-lac)169$ $\phi80dlacZ58(M15)$ *glnV44(AS)* *rfbD1* *gyrA96(NalR)* *recA1* *endA1* *spoT1* *thi-1* *hsdR17*) est utilisée pour les clonages.

La souche *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contenant le vecteur binaire permettant la production d'un ARN interférent et portant les résistances au chloramphénicol et à l'herbicide Basta® (4% glufosinate d'ammonium) est utilisée pour la transformation de plantes.

Les bactéries sont mises en culture dans du milieu LB liquide (LB Broth Base, Invitrogen), ou solide, LB additionné d'agar (Lennox L Agar, Invitrogen). Les antibiotiques adéquats sont ajoutés après stérilisation du milieu, à une concentration finale de 100 µg/ml pour l'ampicilline, 100 µg/ml pour la kanamycine, et 25 ou 100 µg/ml pour le chloramphénicol.

3) Souches de levure

Pour la technique du double hybride, nous utilisons la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A de type sexuel a (MAT a) ou α (MAT α). Son génotype est : *trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4D gal80D LYS2 ::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2 ::GAL7-lacZ*

Les levures sont mises en culture sur du milieu riche YPD, ou SDA-Leucine, SDA-Tryptophane en fonction du plasmide qu'elles portent ou SDA-Leucine, -Tryptophane, SDA-Leucine, -Tryptophane, -Histidine et SDA-Leucine, -Tryptophane, -Adénine (MP Biomedicals). La composition des milieux est décrite en Annexe 2.

4) Vecteurs

- pKannibal (5,9 Kb) Ce plasmide est utilisé pour éteindre les gènes par ARN interférence. Il contient le gène bactérien de résistance à la kanamycine (*NPTII*) et deux séries de sites de clonage situés de part et d'autre d'un intron permettant d'introduire la construction dérivée du gène à inactiver en orientation sens et antisens.

Dans le laboratoire, nous avons deux plasmides qui nous permettent d'exprimer les protéines de manière constitutive (pCaMV35S) ou spécifique au cours de la méiose (pDMC1) et de les introduire dans les plantes à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* :

- pPF408 : Ce plasmide contient le promoteur pDMC1 d'*Arabidopsis* et le gène *BAR*, qui confère la résistance à l'herbicide Basta®. La construction est encadrée par les bordures droite et gauche de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le vecteur contient le gène *CMIA* conférant la résistance au chloramphénicol dans *E. coli* et *A. tumefaciens*.

- pPF111 : Ce plasmide contient le promoteur constitutif pCaMV35S du virus de la mosaïque du chou-fleur et le gène *BAR*, précédemment évoqué. La construction est encadrée par les bordures droite et gauche de l'ADN-T d'*Agrobacterium tumefaciens*. Le vecteur contient le gène *CMIA* permettant la sélection des transformants *E. coli* et *A. tumefaciens*, résistants au chloramphénicol.

Les plasmides utilisés pour le crible double hybride sont commercialisés par Clontech:

- pGBT9 (5,5Kb) contient la séquence du domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (DNA-Binding domain, BD). L'ADNc codant la protéine d'intérêt est cloné dans le site multiple de

clonage dans l'orientation correcte et la bonne phase de lecture entre le domaine BD et le polypeptide d'intérêt, avec le promoteur constitutif *ADHI* et son terminateur, afin de générer une protéine fusion. pGBT9 est un vecteur qui peut se répliquer de manière autonome chez la bactérie et la levure. Il porte le gène *BLA* (pour la résistance à l'ampicilline dans *E. coli*) et le gène *TRP1* qui permet à la levure de pousser sur un milieu minimum dépourvu de tryptophane.

- pGAD424 (6,6 Kb) contient la séquence du domaine d'activation de Gal4 (activation domain, AD). L'ADNc codant pour la protéine d'intérêt est cloné dans le site multiple de clonage dans l'orientation correcte et la bonne phase de lecture entre le domaine AD et le polypeptide d'intérêt, avec le promoteur constitutif *ADHI* et son terminateur, afin de générer une protéine fusion. Un signal d'adressage au noyau a été ajouté d'une source hétérologue. pGAD424 est un vecteur qui peut se répliquer de manière autonome chez la bactérie et la levure. Il porte le gène *BLA* (pour la résistance à l'ampicilline dans *E. coli*) et le gène *LEU2* qui permet à la levure de croître sur un milieu minimum dépourvu de leucine.

5) Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés pour les PCR, RT-PCR et pour le clonage sont indiqués (numéro et séquences) dans l'Annexe 1

II. Méthodes

1) Transformations

- a/ transformation des bactéries *E.coli*

-préparation des bactéries électrocompétentes

Une colonie de bactéries est prélevée à partir d'une strie fraîche, puis placée dans un tube contenant 5 ml de LB (cf annexe 2), incubé 24 heures à 37°C. Cette préculture est

ensemencée 2l de LB. Après 3 heures d'incubation à 37°C (DO600nm=0,5), les bactéries sont centrifugées à 4°C pendant 15 minutes à 5000 g. Le culot est resuspendu dans 1l d'eau stérile à 4°C, et à nouveau centrifugé à 5000 g pendant 15 minutes à froid. Le culot est repris dans 160 ml de glycérol 10% froid et centrifugé à 5000 g, pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est ensuite repris dans 8 ml de glycérol 10% froid. Les bactéries compétentes sont ensuite aliquotées en fractions de 40 µl et conservées à -80°C.

-électroporation

Cinq microlitres d'ADN plasmidique sont placés dans un tube contenant 40 µl de bactéries électrocompétentes. Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation, préalablement refroidie, et soumis à un choc électrique de 1,8 kV à l'aide d'un électroporateur *E.coli* pulser BIO-RAD. Un ml de LB liquide est ensuite ajouté dans la cuve. Les bactéries sont ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C avant d'être étalées sur LB solide contenant l'antibiotique adéquat. Après 24 heures à 37°C, on repique indépendamment les bactéries transformées en les striant sur une nouvelle boîte, incubée pendant 24 heures à 37°C.

- b/ transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

La préparation des agrobactéries électrocompétentes et leur électroporation sont réalisées de la même manière que pour les bactéries *E.coli*. La croissance se faisant 2 jours à 30°C et la DO600nm=0,3.

- c/ Transformation des levures

Les levures sont ensemencées dans 5 ml de SD, pendant une nuit à 30°C, sous agitation. 1 ml de culture est centrifugé pour chaque transformation à réaliser, pendant 1 minute à 3000 g, puis lavé avec 1 ml d'eau stérile, et recentrifugé 1 min. à 3000 g. Le culot est repris dans un mélange de 200 µl de PEG 4000 à 50%, 20 µl de DMSO, 20 µl d'eau, 5 µl de plasmide d'intérêt, et 1 µl d'ADN entraîneur (sperme de saumon). Le mélange est vortexé et mis sous agitation 15 minutes à 30°C, puis placé 15 minutes à 42°C. Un ml d'eau stérile est ajouté, avant de centrifuger 1 minute à 3000 g. Le surnageant est éliminé et 1 ml d'eau stérile est

ajouté avant de centrifuger 1 min. à 3000 g. Le culot est repris dans 100 µl d'eau stérile, puis étalé sur une boîte contenant un milieu sélectif, puis incubé à 30°C pendant 48 heures.

2) Méthodes relatives aux acides nucléiques

- a/ ADN

-Extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis*

Des feuilles sont récoltées en début de croissance de la plante puis stockées à -80°C. Les feuilles sont broyées dans un broyeur Restch MM300 à une fréquence de 1/30s pendant 1 minute. 400µl de tampon d'extraction (Tris-Hcl 200mM pH 7,5, NaCl 250mM, EDTA 25mM pH8) sont ajoutés (Edwards et al., 1991). Le mélange est vortexé puis centrifugé 5 minutes à 3500 rpm. 300µl d'isopropanol sont ajoutés aux 300µl de surnageant récupéré afin de précipiter l'ADN. Après 10 minutes de centrifugation à 3500 rpm, le surnageant est éliminé puis le culot est séché dans l'étuve à 37°C. 100µl d'H₂O sont ajoutés pour resuspendre les culots d'ADN, puis les échantillons sont conservés à 4°C.

-Extraction d'ADN plasmidique

Les ADN plasmidiques sont extraits en utilisant le Plasmid Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

-Digestion enzymatique

Les digestions par des enzymes de restriction sont réalisées dans un volume de 20 ml, une heure à 37°C :

-10 à 100 ng d'ADN plasmidique

-1X de tampon approprié

-1U/mg de l'enzyme de restriction adéquate

L'enzyme est ensuite inactivée par la chaleur (5 minutes à 65°C), et éliminée par extraction avec du phénol-chloroforme (1 volume de phénol-chloroforme / 1 volume d'ADN) suivie d'une précipitation à l'éthanol (1/10 du volume de NaOAcetate 3M pH 4,5 plus 2,5 volumes EtOH 100%/ 1 volume d'ADN).

-Ligation

La réaction de ligation est effectuée 1 nuit à température ambiante dans un volume de 15 µl en présence d'1 unité de T4 DNA ligase (Invitrogen) et de son tampon en respectant une proportion insert/vecteur de 3/1. La réaction est arrêtée par chauffage à 65°C pendant 10 minutes. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol.

-Extraction rapide d'ADN plasmidique par « microlyses »

Cette technique permet de sélectionner rapidement les bactéries contenant un vecteur possédant un insert. Une strie de chaque bactérie transformée suite à la ligation est mélangée à 16 µl de tampon de lyse (Tris-HCl pH8 50 mM, EDTA 50 mM, lysozyme 1 mg/ml, RNase A, 1 mg/ml) et à 1 µl de Phénol/Chloroforme/IAA. Le mélange est vortexé et centrifugé 5 min à 14000 rpm. Le surnageant est déposé avec du bleu de charge sur un gel d'agarose 0,7% avec en témoin le vecteur vide.

On met en culture les colonies susceptibles d'avoir un insert, et après extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le kit cité précédemment, on vérifie par digestion la présence de celui-ci.

- b/ ARN

-Extraction

L'extraction s'effectue sur les inflorescences de plantes. Dès sa récolte, le matériel est plongé dans de l'azote liquide afin d'éviter la dégradation des ARN, et conservé à -80°C.

Les inflorescences sont broyées grâce à un broyeur Restch MM300 à une fréquence de 1/30s trois fois pendant 1 minute. 500 µl de Trizol® sont ajoutés aux échantillons broyés, puis ceux-ci sont agités puis laissés 5 à 10 min. à température ambiante. 200 µl de chloroforme sont ajoutés, les échantillons sont agités, puis centrifugés 15 min. à 14000 rpm à 4°C. Ensuite, 400 µl de la phase aqueuse contenant les ARN sont précipités avec 1 ml d'isopropanol. Après une centrifugation de 10 min. à 14000rpm et 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'EtOH 70% par centrifugation de 5 min. à 14000rpm. Ensuite, le surnageant est éliminé et le culot mis à sécher dans une étuve à 37°C. Enfin, le culot est repris dans 50 µl de H2O puis les échantillons sont conservés à -80°C.

Le kit de purification des ARN totaux de plantes, NucleoSpin® RNA Plant (Macherey Nagel) a aussi été utilisé selon le protocole fourni par le fabricant.

-Dosage

La quantité d'ARN extrait est estimée par un dosage au spectrophotomètre (Nanodrop 1000, Labtech) est réalisé à 260 nm sur 1µl d'échantillon. La quantité d'ARN et la qualité des extraits sont ensuite contrôlées sur gel d'agarose 1%.

-RT-PCR

La reverse transcription (RT) est réalisée sur 2 µg d'ARN grâce au kit Improm-II™ Reverse Transcription System (Promega) dans un thermocycleur Applied Biosystems™ 2720.

Deux microlitres des ADNc synthétisés servent de matrice pour une PCR réalisée dans un volume final de 50 µl contenant 0,2mM de dNTP, 1,7mM de MgCl₂, 20µM de chaque oligonucléotide, 0,5U de Taq DNA polymérase et son tampon 1X final.

Une PCR contrôle avec des oligonucléotides spécifiques de la β-actine (T_m=58°C) amplifiant l'ADNc à 153 pb et l'ADNg à 231 pb, est effectuée afin de vérifier l'intégrité de nos ADNc et pour normaliser la quantité d'ARN des différents échantillons. Puis, des PCR sont réalisées avec les oligonucléotides spécifiques des ADNc de chaque gène (T_m=50°C) (oligonucléotides utilisés en Annexe 1) et déposées sur un gel d'agarose 3% afin d'analyser leur expression.

3) Technique du double-hybride

Pour tester l'existence d'une interaction physique entre protéines, nous utilisons la technique du double hybride.

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* utilisée ici est auxotrophe pour la leucine et pour le tryptophane. On transforme les souches de levures de caractère sexuel α (MAT α) avec le vecteur pGBT9, portant l'ADNc d'un gène d'intérêt fusionné au BD et le gène de prototrophie pour le tryptophane. On transforme les souches de levures de caractère sexuel a (MAT a) avec le vecteur pGAD424, portant l'ADNc d'un autre gène d'intérêt fusionné au AD et le gène de prototrophie pour la leucine. Ces souches de levures sont ensuite croisées afin d'obtenir des diploïdes et d'observer l'éventuelle reconstitution du facteur de

transcription Gal4 si les deux protéines d'intérêt interagissent (Représentation des vecteurs en Annexe 3).

Les différentes levures haploïdes contenant chacune un des deux plasmides avec les gènes à tester en interaction sont striées sur la même boîte SDA-Leu pour les levures Mat a et sur la même boîte SDA-Trp pour les levures Mat α , elles sont ensuite incubées 2 jours à 30°C. Pour obtenir des diploïdes, les levures haploïdes de caractère sexuel sont croisées entre elles à l'aide d'une réplique sur tampon de velours, puis ce croisement ou « mating » est transféré sur une boîte YPD et incubé 24h à 30°C. Le contenu de la boîte YPD est ensuite transféré par réplique sur tampon de velours sur le milieu SDA-LT qui étant dépourvu en leucine et en tryptophane permet la sélection des cellules diploïdes possédant les 2 vecteurs. Après 2 jours d'incubation à 30°C, seuls les diploïdes formés poussent.

Les diploïdes de la boîte SDA-LT sont ensuite transférés par réplique sur tampons de velours sur des boîtes contenant les milieux sélectifs SDA - Leu - Trp - His (SDA-LTH) et SDA - Leu - Trp - Ade (SDA- LTA). Le milieu SDA-LTA, en plus de l'absence de leucine et de tryptophane, ne contient pas d'Adénine. Le milieu SDA-LTH, en plus de l'absence de leucine et de tryptophane, ne contient pas d'histidine. L'utilisation des ces deux milieux restrictifs permet de corréliser les résultats obtenus et d'éliminer ainsi les faux positifs

Si les deux protéines interagissent *in vivo* chez les levures diploïdes, l'activateur de transcription Gal4 sera fonctionnel et pourra activer la transcription des gènes rapporteurs Histidine (His) et Adénine (Ade) situé derrière un promoteur Gal4, permettant la croissance des diploïdes sur milieu sélectif SDA-LTH et SDA-LTA.

4) Méthodes relatives aux plantes

- Stérilisation des graines

Les graines (100 à 200) sont stérilisées par addition de 1,5ml d'une solution de barychlore éthanol préparée extemporanément (1/2 comprimé de barychlore dans 20 ml d'eau milliQ® additionné de 40 ml d'éthanol 100). Sous une hotte à flux laminaire, après 10 min. d'agitation sur roue, le milieu de stérilisation est éliminé et les graines sont rincées 3 fois avec 1 ml d'éthanol 100% avant d'être mises à sécher pendant une nuit.

- Milieu et conditions de culture *in vitro*

Le milieu utilisé pour les cultures de plantes *in vitro* est le milieu MS 0,5 (Murashige and Skoog, 1962), composé de MS à 2,15g/l et d'agar 0,7% (composition des milieux en Annexe 2) Selon les expériences menées, ce milieu peut être supplémenté avec 1% de saccharose.

La croissance des plantes est réalisée en chambre de culture (température 23° C, hygrométrie 75 % et photopériode de 16 heures)

- Stress génotoxiques :

-MMS (Méthyl Methane Sulfonate)

Les graines sont semées sur du milieu MS 0,5 supplémenté avec 1% de saccharose et de MMS, à des doses variant de 0 à 90 ppm. Les semis sont laissés 2 jours à 4°C puis exposés en chambre de culture.

Le développement des plantes sauvages et mutantes est observé après 7, 10 et 14 jours de croissance.

-Irradiations Gamma

Après 48h à 4°C, les graines sont irradiées à 100 ou 200 Gy par une source de Cs¹³⁷ (I. Curie, Orsay) et semées sur MS 0,5. Puis les boîtes sont placées verticalement en chambre de culture jusqu'à observation.

-Rayonnements Ultra-violet

Les graines sont semées sur milieu MS 0,5 et placées en chambre de culture après deux jours à 4°C. Après 3 jours de croissance, les plantes sont soumises aux UV pendant 30 secondes soit 540J/m² (Stratalinker 1800). Après avoir subi une rotation de 90°, les boîtes sont placées en chambre de culture, en présence ou en absence de lumière, afin d'éviter la réparation des CDB de l'ADN par photoréactivation. 3 jours après, les boites sont toutes replacées à la lumière et on observe la reprise de croissance des racines.

- Transformation des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*

Une culture de 400 ml d'Agrobactéries est réalisée en LB supplémenté en chloramphénicol à 100 mg/ml et mise en agitation à 30°C pendant une nuit. Les cultures sont centrifugées 10

min. à 4000g puis le culot bactérien est resuspendu dans 150 ml d'une solution de saccharose 5%, à laquelle est ajouté extemporanément 0,05% final de Silwet (OSi, Crompton Europe SA), un détergent. Les plantes sont transformées par *Agrobacterium* selon la méthode « floral dip » (Clough and Bent, 1998b): les inflorescences sont trempées dans la solution de bactéries pendant 2 minutes, puis les plantes sont placées sous cloche pendant 48h. Elles sont ensuite maintenues sans cloche en serre jusqu'à maturité des siliques.

La sélection des transformants est réalisée par leur résistance au Basta®. Ainsi, les graines sont semées sur terrine de sable imbibée avec de l'herbicide Basta® : seuls les transformants, résistants à l'herbicide, se développent et sont repiqués au stade deux cotylédons en terreau. Environ une à deux semaines après le repiquage, les plantes sont vaporisées avec du Basta® pour une seconde vérification de leur résistance.

- Croisements de plantes d'*Arabidopsis thaliana*

Des boutons floraux d'une première plante (1^{er} mutant) sont sélectionnés au stade où le pistil est mature pour recevoir le pollen. Les étamines de ce bouton sont éliminées. Une fleur d'une deuxième plante (2^{ème} mutant) est prélevée puis les étamines sont frottées au pistil de la première plante jusqu'à saturation en pollen. La pollinisation va donner une silique contenant des graines résultant du croisement, qui vont être ensuite être semées afin d'obtenir des plantes doubles hétérozygotes (F1) pour les gènes d'intérêt.

5) Méthodes cytologiques

- Fixation du matériel

Les inflorescences prélevées sont fixées dans du tampon de fixation (éthanol absolu/acide acétique en proportions 3/1 v/v) à température ambiante. Le mélange de fixation est renouvelé jusqu'à décoloration des inflorescences, avant conservation à -20°C.

Les inflorescences, prélevées pour la coloration d'Alexander, sont utilisées immédiatement ou sont conservées dans de l'éthanol 10%.

Les siliques, prélevées au stade précédant la dissémination des graines, sont fixées dans du tampon de fixation dans le but d'observer le nombre de graines après décoloration des siliques au chloralhydrate.

- Dissection des inflorescences pour observation des méiocytes

Les méiocytes sont localisés dans les anthères du bouton de fleurs. Les inflorescences fixées sont rincées plusieurs fois: deux rinçages de 5 min dans de l'eau distillée puis deux rinçages de 5 min dans du tampon citrate (10mM tri-sodium-citrate à pH 4,5). Les inflorescences sont ensuite digérées dans 100µl de tampon citrate contenant 0,3% (W/V) de pectolyase « Y23 » (MP Biomedicals), 0,3% (W/V) de cytohélicase (Biosepra), 0,3% (W/V) de cellulase « Onozuka R10 » (Kalys) à 37°C pendant 1h30-2h. Les inflorescences sont ensuite rincées 2 fois dans de l'eau distillée à 4°C. Des boutons de 0,5mm environ sont sélectionnés pour être disséqués et libérer les méiocytes. 10µl d'acide acétique 60% sont ajoutés sur la lame de dissection qui est ensuite placée 1 à 2 min sur une plaque chauffante à 45°C. La préparation est alors fixée par quelques gouttes de tampon de fixation et laissée à sécher à température ambiante à l'abri de la poussière.

- Observation des chromosomes après coloration au DAPI (4',6-DiAmidino-2PhénylIndole)

Le matériel déposé sur la lame est ensuite coloré en ajoutant 20µl d'une solution de DAPI (10µg/ml) dans du Citifluor (Agar scientific®) et recouvert d'une lamelle. Les lames sont observées au microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot® (excitation à 380nm).

- Coloration des grains de pollen selon la méthode d'Alexander

Cette technique permet de connaître la proportion de grains de pollen vivants dans une anthère. Les inflorescences fraîchement prélevées ou fixées dans de l'éthanol 10% sont colorées avec le réactif d'Alexander (Alexander, 1969). L'orange G et la fuschine acide colorent le cytoplasme des cellules, tandis que le vert de malachite colore la paroi du grain de pollen (composition en Annexe 2). Ainsi, si le grain de pollen est vivant, il apparaîtra violet alors que s'il est vide, il sera coloré en vert.—L'observation est effectuée par contraste

interférentiel sur un semi-microscope Zeiss Stemi SV11 puis photographiées avec une caméra Sony.

- Réaction TUNEL

Cette méthode permet de détecter les cassures de l'ADN, notamment lors des processus apoptotiques. En effet, les extrémités 3'OH libres de l'ADN sont identifiées par une terminale déoxynucleotidyl transférase, enzyme qui catalyse l'addition de dUTPs marqués à la fluorescéine.

Après la dissection, précédemment décrite, les lames sont lavées 10 minutes avec de l'H₂O puis séchées. Les préparations sont ensuite fixées dans un bain de PFA 4% : 2g de paraformaldéhyde dans 50 ml de PBS 1X, pH 7,4, pendant 10 min, puis elles sont séchées. Elles sont ensuite progressivement réhydratées par des bains rapides d'éthanol de concentrations décroissantes (100%, 95%, 85%, 50%, 30%) puis rincées dans de l'eau. Les lames sont ensuite placées 8 minutes dans une solution de perméabilisation (Triton 0,1%, trisodium citrate 0,1%) préparée extemporanément, puis rincées deux fois avec du PBS 1X pH 7,4. Les lames ne doivent pas sécher. La réaction de TUNEL est effectuée grâce au kit In Situ Cell Death Detection (Roche) selon les recommandations du fournisseur (225 µl de réactif, 225 µl de tampon et 50 µl d'enzyme pendant 1h à 37°C). Deux rinçages rapides dans le PBS 1X pH7,4 sont effectués puis le DAPI est ajouté. Les lames sont recouvertes d'une lamelle et observées au microscope à épifluorescence (Microscope droit Axioskop, ZEISS, équipé pour les observations en fond clair, d'un contraste interférentiel et d'un contraste de phase, ainsi que pour l'épifluorescence avec le luminaire HBO100 autoréglable, ZEISS, et 4 filtres. Le Filtre n°01 est utilisé pour le DAPI (longueur d'onde d'excitation BP 365 +/-12, et d'émission LP 397). Le Filtre n°10 est celui utilisé pour observer les noyaux marqués au TUNEL (excitation : BP 450 à 490 ; émission BP 515 à 565). Nous utilisons le système d'acquisition de la caméra numérique, RT SPOT (Diagnostic instrument, Inc, USA) et son logiciel d'acquisition.

- Décoloration des siliques au chloralhydrate

Les graines contenues dans les siliques sont observées par transparence grâce au chloralhydrate qui décolore l'enveloppe des siliques.

Les siliques mûres conservées dans du fixateur sont rincées dans de l'éthanol 70% pendant 2 heures, puis immergées dans du chloralhydrate (8g chloralhydrate/ 3ml glycérol 66%), à l'abri de la lumière, pendant une nuit. Les siliques sont déposées sur lame et observées sous une loupe Zeiss Stemi SV11 puis photographiées avec une caméra Sony.

Bibliographie

- (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Abe, K., Osakabe, K., Nakayama, S., Endo, M., Tagiri, A., Todoriki, S., Ichikawa, H., and Toki, S.** (2005). *Arabidopsis* RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiol* **139**, 896-908.
- Abe, K., Osakabe, K., Ishikawa, Y., Tagiri, A., Yamanouchi, H., Takyuu, T., Yoshioka, T., Ito, T., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Ichikawa, H., and Toki, S.** (2009). Inefficient double-strand DNA break repair is associated with increased fasciation in *Arabidopsis* BRCA2 mutants. *J Exp Bot* **60**, 2751-2761.
- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M.F., Guerrette, S., Marsischky, G.T., Kolodner, R., and Fishel, R.** (1996). hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13629-13634.
- Adair, G.M., Rolig, R.L., Moore-Faver, D., Zabelshansky, M., Wilson, J.H., and Nairn, R.S.** (2000). Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *EMBO J* **19**, 5552-5561.
- Ade, J., Belzile, F., Philippe, H., and Doutriaux, M.P.** (1999). Four mismatch repair paralogues coexist in *Arabidopsis thaliana*: AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6-1 and AtMSH6-2. *Mol Gen Genet* **262**, 239-249.
- Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P.** (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-313.
- Aihara, H., Ito, Y., Kurumizaka, H., Yokoyama, S., and Shibata, T.** (1999). The N-terminal domain of the human Rad51 protein binds DNA: structure and a DNA binding surface as revealed by NMR. *J Mol Biol* **290**, 495-504.
- Albala, J.S., Thelen, M.P., Prange, C., Fan, W., Christensen, M., Thompson, L.H., and Lennon, G.G.** (1997). Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics* **46**, 476-479.
- Alexander, M.P.** (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol* **44**, 117-122.
- Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M.A., Chen, D.J., and Nickoloff, J.A.** (2002). DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3758-3763.
- Allers, T., and Lichten, M.** (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47-57.
- Alou, A.H., Azaiez, A., Jean, M., and Belzile, F.J.** (2004). Involvement of the *Arabidopsis thaliana* AtPMS1 gene in somatic repeat instability. *Plant Mol Biol* **56**, 339-349.
- Andreuzza, S., Li, J., Guitton, A.E., Faure, J.E., Casanova, S., Park, J.S., Choi, Y., Chen, Z., and Berger, F.** (2010). DNA LIGASE I exerts a maternal effect on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **137**, 73-81.
- Armstrong, S.J., Franklin, F.C., and Jones, G.H.** (2001). Nucleolus-associated telomere clustering and pairing precede meiotic chromosome synapsis in *Arabidopsis thaliana*. *J Cell Sci* **114**, 4207-4217.
- Atanassov, B.S., Barrett, J.C., and Davis, B.J.** (2005). Homozygous germ line mutation in exon 27 of murine *Brc2* disrupts the Fancd2-*Brc2* pathway in the homologous recombination-mediated DNA interstrand cross-links' repair but does not affect meiosis. *Genes Chromosomes Cancer* **44**, 429-437.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P.** (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* **279**, 55117-55126.

- Bailey, S.M., Meyne, J., Chen, D.J., Kurimasa, A., Li, G.C., Lehnert, B.E., and Goodwin, E.H.** (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14899-14904.
- Ban, C., and Yang, W.** (1998). Structural basis for MutH activation in *E. coli* mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *EMBO J* **17**, 1526-1534.
- Barnes, D.E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., and Lindahl, T.** (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr Biol* **8**, 1395-1398.
- Bentley, D., Selfridge, J., Millar, J.K., Samuel, K., Hole, N., Ansell, J.D., and Melton, D.W.** (1996). DNA ligase I is required for fetal liver erythropoiesis but is not essential for mammalian cell viability. *Nat Genet* **13**, 489-491.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gadelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A., and Forterre, P.** (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**, 414-417.
- Bernstein, N.K., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., Mani, R., Dianov, G., Glover, J.N., and Weinfeld, M.** (2008). Polynucleotide kinase as a potential target for enhancing cytotoxicity by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem* **8**, 358-367.
- Bishop, D.K.** (1994). RecA homologs Dmc1 and Rad51 interact to form multiple nuclear complexes prior to meiotic chromosome synapsis. *Cell* **79**, 1081-1092.
- Bishop, D.K., Park, D., Xu, L., and Kleckner, N.** (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439-456.
- Bleuyard, J.Y., and White, C.I.** (2004). The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *EMBO J* **23**, 439-449.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2004). Meiotic defects in the Arabidopsis rad50 mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* **113**, 197-203.
- Bleuyard, J.Y., Gallego, M.E., Savigny, F., and White, C.I.** (2005). Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *Plant J* **41**, 533-545.
- Bonatto, D., Brendel, M., and Henriques, J.A.** (2005a). The eukaryotic Pso2p/Snm1p family revisited: in silico analyses of Pso2p A, B and Plasmodium groups. *Comput Biol Chem* **29**, 420-433.
- Bonatto, D., Revers, L.F., Brendel, M., and Henriques, J.A.** (2005b). The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. *Braz J Med Biol Res* **38**, 321-334.
- Bork, P., Blomberg, N., and Nilges, M.** (1996). Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet* **13**, 22-23.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J.P., and Revy, P.** (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-299.
- Bundock, P., van Attikum, H., and Hooykaas, P.** (2002). Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an *Arabidopsis* KU70 mutant. *Nucleic Acids Res* **30**, 3395-3400.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J.** (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**, 42462-42467.

- Callebaut, I., Moshous, D., Mornon, J.P., and de Villartay, J.P.** (2002a). Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Res* **30**, 3592-3601.
- Callebaut, I., Moshous, D., Mornon, J.P., and de Villartay, J.P.** (2002b). Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Res* **30**, 3592-3601.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H.** (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**, 477-486.
- Caryl, A.P., Armstrong, S.J., Jones, G.H., and Franklin, F.C.** (2000). A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma* **109**, 62-71.
- Champoux, J.J.** (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**, 369-413.
- Charbonnel, C., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2010a). Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in *Arabidopsis* plants. *Plant J* **64**, 280-290.
- Charbonnel, C., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2010b). Xrcc1-dependent and Ku-dependent DNA double-strand break repair kinetics in *Arabidopsis* plants. *Plant J* **64**, 280-290.
- Charbonnel, C., Allain, E., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2011). Kinetic analysis of DNA double-strand break repair pathways in *Arabidopsis*. *DNA Repair (Amst)* **in press**.
- Chelysheva, L., Diallo, S., Vezon, D., Gendrot, G., Vrielynck, N., Belcram, K., Rocques, N., Marquez-Lema, A., Bhatt, A.M., Horlow, C., Mercier, R., Mezard, C., and Grelon, M.** (2005). AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J Cell Sci* **118**, 4621-4632.
- Chen, J., Silver, D.P., Walpita, D., Cantor, S.B., Gazdar, A.F., Tomlinson, G., Couch, F.J., Weber, B.L., Ashley, T., Livingston, D.M., and Scully, R.** (1998a). Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* **2**, 317-328.
- Chen, J.J., Silver, D., Cantor, S., Livingston, D.M., and Scully, R.** (1999). BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res* **59**, 1752s-1756s.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E.** (2001). Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* **8**, 1105-1115.
- Chen, P.L., Chen, C.F., Chen, Y., Xiao, J., Sharp, Z.D., and Lee, W.H.** (1998b). The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5287-5292.
- Clerici, M., Mantiero, D., Lucchini, G., and Longhese, M.P.** (2005). The *Saccharomyces cerevisiae* Sae2 protein promotes resection and bridging of double strand break ends. *J Biol Chem* **280**, 38631-38638.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998a). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998b). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.

- Cohen, P.E., Pollack, S.E., and Pollard, J.W.** (2006). Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr Rev* **27**, 398-426.
- Cooper, M.P., Machwe, A., Orren, D.K., Brosh, R.M., Ramsden, D., and Bohr, V.A.** (2000). Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein. *Genes Dev* **14**, 907-912.
- Cordoba-Canero, D., Dubois, E., Ariza, R.R., Doutriaux, M.P., and Roldan-Arjona, T.** (2010). Arabidopsis uracil DNA glycosylase (UNG) is required for base excision repair of uracil and increases plant sensitivity to 5-fluorouracil. *J Biol Chem* **285**, 7475-7483.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D., and Doutriaux, M.P.** (1999a). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 1623-1634.
- Couteau, F., Belzile, F., Horlow, C., Grandjean, O., Vezon, D., and Doutriaux, M.P.** (1999b). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 1623-1634.
- Crackower, M.A., Scherer, S.W., Rommens, J.M., Hui, C.C., Poorkaj, P., Soder, S., Cobben, J.M., Hudgins, L., Evans, J.P., and Tsui, L.C.** (1996). Characterization of the split hand/split foot malformation locus SHFM1 at 7q21.3-q22.1 and analysis of a candidate gene for its expression during limb development. *Hum Mol Genet* **5**, 571-579.
- Culligan, K.M., and Hays, J.B.** (1997). DNA mismatch repair in plants. An Arabidopsis thaliana gene that predicts a protein belonging to the MSH2 subfamily of eukaryotic MutS homologs. *Plant Physiol* **115**, 833-839.
- Daboussi, F., Dumay, A., Delacote, F., and Lopez, B.S.** (2002). DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal* **14**, 969-975.
- Daley, J.M., Palmbo, P.L., Wu, D., and Wilson, T.E.** (2005). Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet* **39**, 431-451.
- Daniels, M.J., Wang, Y., Lee, M., and Venkitaraman, A.R.** (2004). Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* **306**, 876-879.
- Dany, A.L., and Tissier, A.** (2001). A functional OGG1 homologue from Arabidopsis thaliana. *Mol Genet Genomics* **265**, 293-301.
- Davies, A.A., Masson, J.Y., McIlwraith, M.J., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A.R., and West, S.C.** (2001). Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell* **7**, 273-282.
- De Muyt, A., Vezon, D., Gendrot, G., Gallois, J.L., Stevens, R., and Grelon, M.** (2007). AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in Arabidopsis thaliana. *EMBO J* **26**, 4126-4137.
- Deans, B., Griffin, C.S., Maconochie, M., and Thacker, J.** (2000). Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J* **19**, 6675-6685.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G.** (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* **21**, 3192-3200.
- Delacote, F., and Lopez, B.S.** (2008). Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* **7**, 33-38.

- Delacote, F., Han, M., Stamato, T.D., Jasin, M., and Lopez, B.S.** (2002). An *xrcc4* defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **30**, 3454-3463.
- Di Virgilio, M., and Gautier, J.** (2005). Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of *Mre11*. *J Cell Biol* **171**, 765-771.
- Domenichini, S., Raynaud, C., Ni, D.A., Henry, Y., and Bergounioux, C.** (2006). *Atmnd1-delta1* is sensitive to gamma-irradiation and defective in meiotic DNA repair. *DNA Repair (Amst)* **5**, 455-464.
- Dosanjh, M.K., Collins, D.W., Fan, W., Lennon, G.G., Albala, J.S., Shen, Z., and Schild, D.** (1998). Isolation and characterization of *RAD51C*, a new human member of the *RAD51* family of related genes. *Nucleic Acids Res* **26**, 1179-1184.
- Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K., and Lees-Miller, S.P.** (2005). DNA-PK-dependent phosphorylation of *Ku70/80* is not required for non-homologous end joining. *DNA Repair (Amst)* **4**, 1006-1018.
- Doutriaux, M.P., Couteau, F., Bergounioux, C., and White, C.** (1998). Isolation and characterisation of the *RAD51* and *DMC1* homologs from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **257**, 283-291.
- Dray, E., Siaud, N., Dubois, E., and Doutriaux, M.P.** (2006). Interaction between *Arabidopsis* *Brca2* and its partners *Rad51*, *Dmc1*, and *Dss1*. *Plant Physiol* **140**, 1059-1069.
- Dubest, S., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2002). Role of the *AtRad1p* endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Rep* **3**, 1049-1054.
- Dubest, S., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2004a). Roles of the *AtErcc1* protein in recombination. *Plant J* **39**, 334-342.
- Dubest, S., Gallego, M.E., and White, C.I.** (2004b). Roles of the *AtErcc1* protein in recombination. *Plant J* **39**, 334-342.
- Dudasova, Z., Dudas, A., and Chovanec, M.** (2004). Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 581-601.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W.** (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* **86**, 43-112.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.
- Ellenberger, T., and Tomkinson, A.E.** (2008). Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights. *Annu Rev Biochem* **77**, 313-338.
- Enomoto, R., Kinebuchi, T., Sato, M., Yagi, H., Kurumizaka, H., and Yokoyama, S.** (2006). Stimulation of DNA strand exchange by the human *TBPIP/Hop2-Mnd1* complex. *J Biol Chem* **281**, 5575-5581.
- Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S.C.** (2005). CDK-dependent phosphorylation of *BRCA2* as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**, 598-604.
- Essers, J., Hendriks, R.W., Wesoly, J., Beerens, C.E., Smit, B., Hoeijmakers, J.H., Wyman, C., Dronkert, M.L., and Kanaar, R.** (2002). Analysis of mouse *Rad54* expression and its implications for homologous recombination. *DNA Repair (Amst)* **1**, 779-793.
- Evans, E., Moggs, J.G., Hwang, J.R., Egly, J.M., and Wood, R.D.** (1997). Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* **16**, 6559-6573.

- Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R.** (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. *Nucleic Acids Res* **34**, 4126-4137.
- Featherstone, C., and Jackson, S.P.** (1999). Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions? *Mutat Res* **434**, 3-15.
- Fidantsef, A.L., Mitchell, D.L., and Britt, A.B.** (2000). The Arabidopsis UVH1 gene is a homolog of the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiol* **124**, 579-586.
- Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E.** (1992). Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1. *Science* **258**, 480-484.
- Flygare, J., Benson, F., and Hellgren, D.** (1996). Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1312**, 231-236.
- Frank-Vaillant, M., and Marcand, S.** (2001). NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway. *Genes Dev* **15**, 3005-3012.
- Friedberg, E.C.** (2003). DNA damage and repair. *Nature* **421**, 436-440.
- Friesner, J., and Britt, A.B.** (2003). Ku80- and DNA ligase IV-deficient plants are sensitive to ionizing radiation and defective in T-DNA integration. *Plant J* **34**, 427-440.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A., and Dogliotti, E.** (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* **271**, 9573-9578.
- Galkin, V.E., Esashi, F., Yu, X., Yang, S., West, S.C., and Egelman, E.H.** (2005). BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 8537-8542.
- Gallego, M.E., Bleuyard, J.Y., Daoudal-Cotterell, S., Jallut, N., and White, C.I.** (2003). Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in *Arabidopsis*. *Plant J* **35**, 557-565.
- Gallego, M.E., Jeanneau, M., Granier, F., Bouchez, D., Bechtold, N., and White, C.I.** (2001). Disruption of the Arabidopsis RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant J* **25**, 31-41.
- Gallinari, P., and Jiricny, J.** (1996). A new class of uracil-DNA glycosylases related to human thymine-DNA glycosylase. *Nature* **383**, 735-738.
- Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D.T., and Alt, F.W.** (1998). A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity* **9**, 367-376.
- Gary, R., Park, M.S., Nolan, J.P., Cornelius, H.L., Kozyreva, O.G., Tran, H.T., Lobachev, K.S., Resnick, M.A., and Gordenin, D.A.** (1999). A novel role in DNA metabolism for the binding of Fen1/Rad27 to PCNA and implications for genetic risk. *Mol Cell Biol* **19**, 5373-5382.
- Genschel, J., and Modrich, P.** (2003). Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol Cell* **12**, 1077-1086.
- Goedecke, W., Eijpe, M., Offenbergh, H.H., van Aalderen, M., and Heyting, C.** (1999). Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* **23**, 194-198.
- Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P.** (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131-142.
- Grawunder, U., Zimmer, D., and Leiber, M.R.** (1998a). DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Curr Biol* **8**, 873-876.

- Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K., and Lieber, M.R.** (1998b). DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell* **2**, 477-484.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G.** (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J* **20**, 589-600.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T.** (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503-514.
- Grilley, M., Welsh, K.M., Su, S.S., and Modrich, P.** (1989). Isolation and characterization of the *Escherichia coli* mutL gene product. *J Biol Chem* **264**, 1000-1004.
- Gu, Y., Jin, S., Gao, Y., Weaver, D.T., and Alt, F.W.** (1997). Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8076-8081.
- Gudmundsdottir, K., Lord, C.J., Witt, E., Tutt, A.N., and Ashworth, A.** (2004). DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. *EMBO Rep* **5**, 989-993.
- Haaf, T., Golub, E.I., Reddy, G., Radding, C.M., and Ward, D.C.** (1995). Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2298-2302.
- Haber, J.E.** (1998). The many interfaces of Mre11. *Cell* **95**, 583-586.
- Haber, J.E.** (2000). Recombination: a frank view of exchanges and vice versa. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 286-292.
- Hanawalt, P.C., Crowley, D.J., Ford, J.M., Ganesan, A.K., Lloyd, D.R., Nospikel, T., Smith, C.A., Spivak, G., and Tornaletti, S.** (2000). Regulation of nucleotide excision repair in bacteria and mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 183-191.
- Hartlerode, A.J., and Scully, R.** (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* **423**, 157-168.
- Hartsuiker, E., Mizuno, K., Molnar, M., Kohli, J., Ohta, K., and Carr, A.M.** (2009). Ctp1CtIP and Rad32Mre11 nuclease activity are required for Rec12Spo11 removal, but Rec12Spo11 removal is dispensable for other MRN-dependent meiotic functions. *Mol Cell Biol* **29**, 1671-1681.
- Hartung, F., and Puchta, H.** (2000). Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **28**, 1548-1554.
- Hartung, F., and Puchta, H.** (2001). Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene* **271**, 81-86.
- Hartung, F., Blattner, F.R., and Puchta, H.** (2002). Intron gain and loss in the evolution of the conserved eukaryotic recombination machinery. *Nucleic Acids Res* **30**, 5175-5181.
- Hays, S.L., Firmenich, A.A., and Berg, P.** (1995). Complex formation in yeast double-strand break repair: participation of Rad51, Rad52, Rad55, and Rad57 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6925-6929.
- Heacock, M.L., Idol, R.A., Friesner, J.D., Britt, A.B., and Shippen, D.E.** (2007). Telomere dynamics and fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV. *Nucleic Acids Res* **35**, 6490-6500.
- Hefner, E., Preuss, S.B., and Britt, A.B.** (2003a). *Arabidopsis* mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J Exp Bot* **54**, 669-680.

- Hefner, E., Preuss, S.B., and Britt, A.B.** (2003b). Arabidopsis mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J Exp Bot* **54**, 669-680.
- Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S.** (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**, 27-47.
- Hickson, I.D.** (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* **3**, 169-178.
- Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Jones, G.H., and Franklin, F.C.** (2005). The Arabidopsis synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev* **19**, 2488-2500.
- Hohl, M., Thorel, F., Clarkson, S.G., and Scharer, O.D.** (2003). Structural determinants for substrate binding and catalysis by the structure-specific endonuclease XPG. *J Biol Chem* **278**, 19500-19508.
- Holliday, R.** (1964). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* **50**, 323-335.
- Hollingsworth, N.M., Goetsch, L., and Byers, B.** (1990). The HOP1 gene encodes a meiosis-specific component of yeast chromosomes. *Cell* **61**, 73-84.
- Horlow, C., and Doutriaux, M.P.** (2003). [Molecular mechanisms of meiosis in plants]. *Med Sci (Paris)* **19**, 717-723.
- Iliakis, G.** (2009). Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiother Oncol* **92**, 310-315.
- Ivanov, E.L., and Haber, J.E.** (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**, 2245-2251.
- Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L.** (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* **106**, 302-323.
- Jantti, J., Lahdenranta, J., Olkkonen, V.M., Soderlund, H., and Keranen, S.** (1999). SEM1, a homologue of the split hand/split foot malformation candidate gene *Dss1*, regulates exocytosis and pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 909-914.
- Jasin, M.** (2002). Homologous repair of DNA damage and tumorigenesis: the BRCA connection. *Oncogene* **21**, 8981-8993.
- Jaskelioff, M., Van Komen, S., Krebs, J.E., Sung, P., and Peterson, C.L.** (2003). Rad54p is a chromatin remodeling enzyme required for heteroduplex DNA joint formation with chromatin. *J Biol Chem* **278**, 9212-9218.
- Jean, M., Pelletier, J., Hilpert, M., Belzile, F., and Kunze, R.** (1999). Isolation and characterization of AtMLH1, a MutL homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **262**, 633-642.
- Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C.** (2010a). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**, 678-683.
- Jensen, R.B., Carreira, A., and Kowalczykowski, S.C.** (2010b). Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**, 678-683.
- Jiricny, J., Su, S.S., Wood, S.G., and Modrich, P.** (1988). Mismatch-containing oligonucleotide duplexes bound by the *E. coli* mutS-encoded protein. *Nucleic Acids Res* **16**, 7843-7853.
- Johnson, A.P., and Fairman, M.P.** (1997). The identification and purification of a novel mammalian DNA ligase. *Mutat Res* **383**, 205-212.
- Johnston, L.H.** (1979). The DNA repair capability of *cdc9*, the *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in DNA ligase. *Mol Gen Genet* **170**, 89-92.

- 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.
- Jolivet, S., Vezon, D., Froger, N., and Mercier, R.** (2006). Non conservation of the meiotic function of the Ski8/Rec103 homolog in *Arabidopsis*. *Genes Cells* **11**, 615-622.
- Kass, E.M., and Jasin, M.** (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Lett* **584**, 3703-3708.
- Keeney, S.** (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* **52**, 1-53.
- 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.
- Kegel, A., Sjostrand, J.O., and Astrom, S.U.** (2001). Nej1p, a cell type-specific regulator of nonhomologous end joining in yeast. *Curr Biol* **11**, 1611-1617.
- Kerzendorfer, C., Vignard, J., Pedrosa-Harand, A., Siwiec, T., Akimcheva, S., Jolivet, S., Sablowski, R., Armstrong, S., Schweizer, D., Mercier, R., and Schlogelhofer, P.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* MND1 homologue plays a key role in meiotic homologous pairing, synapsis and recombination. *J Cell Sci* **119**, 2486-2496.
- Kimura, S., and Sakaguchi, K.** (2006). DNA repair in plants. *Chem Rev* **106**, 753-766.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., 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.
- Klungland, A., and Lindahl, T.** (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* **16**, 3341-3348.
- Kojic, M., Kostrub, C.F., Buchman, A.R., and Holloman, W.K.** (2002a). BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **10**, 683-691.
- Kojic, M., Kostrub, C.F., Buchman, A.R., and Holloman, W.K.** (2002b). BRCA2 homolog required for proficiency in DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **10**, 683-691.
- Kojic, M., Yang, H., Kostrub, C.F., Pavletich, N.P., and Holloman, W.K.** (2003). The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Mol Cell* **12**, 1043-1049.
- Krejci, L., Damborsky, J., Thomsen, B., Duno, M., and Bendixen, C.** (2001). Molecular dissection of interactions between Rad51 and members of the recombination-repair group. *Mol Cell Biol* **21**, 966-976.
- Krejci, L., Song, B., Bussen, W., Rothstein, R., Mortensen, U.H., and Sung, P.** (2002). Interaction with Rad51 is indispensable for recombination mediator function of Rad52. *J Biol Chem* **277**, 40132-40141.
- Kulaksiz, G., Reardon, J.T., and Sancar, A.** (2005). Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties. *Mol Cell Biol* **25**, 9784-9792.
- Kuznetsov, S.G., Haines, D.C., Martin, B.K., and Sharan, S.K.** (2009). Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. *Cancer Res* **69**, 863-872.
- Lahue, R.S., Au, K.G., and Modrich, P.** (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science* **245**, 160-164.

- Lakshmipathy, U., and Campbell, C.** (1999). The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 3869-3876.
- Lee, J.H., and Paull, T.T.** (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**, 93-96.
- Lee, S.A., Roques, C., Magwood, A.C., Masson, J.Y., and Baker, M.D.** (2009). Recovery of deficient homologous recombination in Brca2-depleted mouse cells by wild-type Rad51 expression. *DNA Repair (Amst)* **8**, 170-181.
- Lee, S.E., Mitchell, R.A., Cheng, A., and Hendrickson, E.A.** (1997). Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **17**, 1425-1433.
- Leu, J.Y., Chua, P.R., and Roeder, G.S.** (1998). The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* **94**, 375-386.
- Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T.** (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**, 471-483.
- Li, W., Chen, C., Markmann-Mulisch, U., Timofejeva, L., Schmelzer, E., Ma, H., and Reiss, B.** (2004). The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10596-10601.
- Liang, F., Han, M., Romanienko, P.J., and Jasin, M.** (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5172-5177.
- Lieber, M.R.** (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* **79**, 181-211.
- Lim, D.S., and Hasty, P.** (1996). A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* **16**, 7133-7143.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., and Heyer, W.D.** (2010a). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1260-1262.
- Liu, J., Doty, T., Gibson, B., and Heyer, W.D.** (2010b). Human BRCA2 protein promotes RAD51 filament formation on RPA-covered single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1260-1262.
- Liu, N., Lamerdin, J.E., Tebbs, R.S., Schild, D., Tucker, J.D., Shen, M.R., Brookman, K.W., Siciliano, M.J., Walter, C.A., Fan, W., Narayana, L.S., Zhou, Z.Q., Adamson, A.W., Sorensen, K.J., Chen, D.J., Jones, N.J., and Thompson, L.H.** (1998). XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell* **1**, 783-793.
- Liu, Y., and Maizels, N.** (2000). Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep* **1**, 85-90.
- Liu, Y., Masson, J.Y., Shah, R., O'Regan, P., and West, S.C.** (2004). RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells. *Science* **303**, 243-246.
- Lundin, C., North, M., Erixon, K., Walters, K., Jenssen, D., Goldman, A.S., and Helleday, T.** (2005). Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* **33**, 3799-3811.
- Luo, G., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., Bradley, A., and Petrini, J.H.** (1999). Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7376-7381.
- Lynn, A., Soucek, R., and Borner, G.V.** (2007). ZMM proteins during meiosis: crossover artists at work. *Chromosome Res* **15**, 591-605.

- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R.** (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781-794.
- Mahaney, B.L., Meek, K., and Lees-Miller, S.P.** (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* **417**, 639-650.
- Malik, S.B., Ramesh, M.A., Hulstrand, A.M., and Logsdon, J.M., Jr.** (2007). Protist homologs of the meiotic Spo11 gene and topoisomerase VI reveal an evolutionary history of gene duplication and lineage-specific loss. *Mol Biol Evol* **24**, 2827-2841.
- Markmann-Mulisch, U., Wendeler, E., Zobell, O., Schween, G., Steinbiss, H.H., and Reiss, B.** (2007). Differential requirements for RAD51 in *Physcomitrella patens* and *Arabidopsis thaliana* development and DNA damage repair. *Plant Cell* **19**, 3080-3089.
- Marmorstein, L.Y., Ouchi, T., and Aaronson, S.A.** (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13869-13874.
- Marsischky, G.T., Filosi, N., Kane, M.F., and Kolodner, R.** (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* **10**, 407-420.
- Marston, N.J., Richards, W.J., Hughes, D., Bertwistle, D., Marshall, C.J., and Ashworth, A.** (1999). Interaction between the product of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 and DSS1, a protein functionally conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Biol* **19**, 4633-4642.
- Martin, I.V., and MacNeill, S.A.** (2002). ATP-dependent DNA ligases. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3005.
- Martin, J.S., Winkelmann, N., Petalcorin, M.I., McIlwraith, M.J., and Boulton, S.J.** (2005a). RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **25**, 3127-3139.
- Martin, J.S., Winkelmann, N., Petalcorin, M.I., McIlwraith, M.J., and Boulton, S.J.** (2005b). RAD-51-dependent and -independent roles of a *Caenorhabditis elegans* BRCA2-related protein during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **25**, 3127-3139.
- Masson, J.Y., and West, S.C.** (2001). The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends Biochem Sci* **26**, 131-136.
- Mazin, A.V., Alexeev, A.A., and Kowalczykowski, S.C.** (2003). A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J Biol Chem* **278**, 14029-14036.
- McAllister, K.A., Bennett, L.M., Houle, C.D., Ward, T., Malphurs, J., Collins, N.K., Cachafeiro, C., Haseman, J., Goulding, E.H., Bunch, D., Eddy, E.M., Davis, B.J., and Wiseman, R.W.** (2002). Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene. *Cancer Res* **62**, 990-994.
- McWhir, J., Selfridge, J., Harrison, D.J., Squires, S., and Melton, D.W.** (1993). Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat Genet* **5**, 217-224.
- Milman, N., Higuchi, E., and Smith, G.R.** (2009). Meiotic DNA double-strand break repair requires two nucleases, MRN and Ctp1, to produce a single size class of Rec12 (Spo11)-oligonucleotide complexes. *Mol Cell Biol* **29**, 5998-6005.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S.** (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* **455**, 770-774.

- Modrich, P., and Lahue, R.** (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* **65**, 101-133.
- Moens, P.B., and Pearlman, R.E.** (1988). Chromatin organization at meiosis. *Bioessays* **9**, 151-153.
- Molinier, J., Stamm, M.E., and Hohn, B.** (2004). SNM-dependent recombinational repair of oxidatively induced DNA damage in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep* **5**, 994-999.
- Montecucco, A., Rossi, R., Levin, D.S., Gary, R., Park, M.S., Motycka, T.A., Ciarrocchi, G., Villa, A., Biamonti, G., and Tomkinson, A.E.** (1998). DNA ligase I is recruited to sites of DNA replication by an interaction with proliferating cell nuclear antigen: identification of a common targeting mechanism for the assembly of replication factories. *EMBO J* **17**, 3786-3795.
- Moreau, S., Ferguson, J.R., and Symington, L.S.** (1999). The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **19**, 556-566.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D.** (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev* **8**, 2257-2269.
- Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I., and Rothstein, R.** (1996). DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10729-10734.
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L.H., and Fousteri, M.I.** (2007). Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol Cell* **27**, 311-323.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., and de Villartay, J.P.** (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* **105**, 177-186.
- Moynahan, M.E., Pierce, A.J., and Jasin, M.** (2001). BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* **7**, 263-272.
- Muyt, A.D., Mercier, R., Mezard, C., and Grelon, M.** (2009). Meiotic recombination and crossovers in plants. *Genome Dyn* **5**, 14-25.
- Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S.** (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* **436**, 1053-1057.
- New, J.H., Sugiyama, T., Zaitseva, E., and Kowalczykowski, S.C.** (1998). Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature* **391**, 407-410.
- Nick McElhinny, S.A., and Ramsden, D.A.** (2004). Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunol Rev* **200**, 156-164.
- Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J., and Ramsden, D.A.** (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol* **20**, 2996-3003.
- Nicolaidis, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Wei, Y.F., Carter, K.C., Ruben, S.M., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Fleischmann, R.D., Fraser, C.M., and et al.** (1994). Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* **371**, 75-80.
- Niewolik, D., Pannicke, U., Lu, H., Ma, Y., Wang, L.C., Kulesza, P., Zandi, E., Lieber, M.R., and Schwarz, K.** (2006). DNA-PKcs dependence of Artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *J Biol Chem* **281**, 33900-33909.

- Nouspikel, T.** (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* **66**, 994-1009.
- Nussenzweig, A., Sokol, K., Burgman, P., Li, L., and Li, G.C.** (1997). Hypersensitivity of Ku80-deficient cell lines and mice to DNA damage: the effects of ionizing radiation on growth, survival, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13588-13593.
- Panoli, A.P., Ravi, M., Sebastian, J., Nishal, B., Reddy, T.V., Marimuthu, M.P., Subbiah, V., Vijaybhaskar, V., and Siddiqi, I.** (2006). AtMND1 is required for homologous pairing during meiosis in Arabidopsis. *BMC Mol Biol* **7**, 24.
- Pascucci, B., Stucki, M., Jonsson, Z.O., Dogliotti, E., and Hubscher, U.** (1999). Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem* **274**, 33696-33702.
- Patel, K.J., Yu, V.P., Lee, H., Corcoran, A., Thistlethwaite, F.C., Evans, M.J., Colledge, W.H., Friedman, L.S., Ponder, B.A., and Venkitaraman, A.R.** (1998). Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* **1**, 347-357.
- Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R.** (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**, 287-293.
- Petalcorin, M.I., Galkin, V.E., Yu, X., Egelman, E.H., and Boulton, S.J.** (2007). Stabilization of RAD-51-DNA filaments via an interaction domain in *Caenorhabditis elegans* BRCA2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8299-8304.
- Petrini, J.H., Xiao, Y., and Weaver, D.T.** (1995). DNA ligase I mediates essential functions in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **15**, 4303-4308.
- Petukhova, G.V., Romanienko, P.J., and Camerini-Otero, R.D.** (2003). The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Dev Cell* **5**, 927-936.
- Petukhova, G.V., Pezza, R.J., Vanevski, F., Ploquin, M., Masson, J.Y., and Camerini-Otero, R.D.** (2005). The Hop2 and Mnd1 proteins act in concert with Rad51 and Dmcl1 in meiotic recombination. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 449-453.
- Pittman, D.L., and Schimenti, J.C.** (2000). Midgestation lethality in mice deficient for the RecA-related gene, Rad51d/Rad51l3. *Genesis* **26**, 167-173.
- Pittman, D.L., Weinberg, L.R., and Schimenti, J.C.** (1998a). Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics* **49**, 103-111.
- Pittman, D.L., Cobb, J., Schimenti, K.J., Wilson, L.A., Cooper, D.M., Brignull, E., Handel, M.A., and Schimenti, J.C.** (1998b). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmcl1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* **1**, 697-705.
- Popanda, O., and Thielmann, H.W.** (1992). The function of DNA topoisomerases in UV-induced DNA excision repair: studies with specific inhibitors in permeabilized human fibroblasts. *Carcinogenesis* **13**, 2321-2328.
- Preuss, S.B., Jiang, C.Z., Baik, H.K., Kado, C.I., and Britt, A.B.** (1999). Radiation-sensitive Arabidopsis mutants are proficient for T-DNA transformation. *Mol Genet* **261**, 623-626.
- Prigent, C., Satoh, M.S., Daly, G., Barnes, D.E., and Lindahl, T.** (1994). Aberrant DNA repair and DNA replication due to an inherited enzymatic defect in human DNA ligase I. *Mol Cell Biol* **14**, 310-317.
- Prolla, T.A., Christie, D.M., and Liskay, R.M.** (1994). Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene. *Mol Cell Biol* **14**, 407-415.

- Puebla-Osorio, N., Lacey, D.B., Alt, F.W., and Zhu, C.** (2006). Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III. *Mol Cell Biol* **26**, 3935-3941.
- 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.
- Pukkila, P.J., Peterson, J., Herman, G., Modrich, P., and Meselson, M.** (1983). Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*. *Genetics* **104**, 571-582.
- 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.
- Reardon, J.T., Nichols, A.F., Keeney, S., Smith, C.A., Taylor, J.S., Linn, S., and Sancar, A.** (1993). Comparative analysis of binding of human damaged DNA-binding protein (XPE) and *Escherichia coli* damage recognition protein (UvrA) to the major ultraviolet photoproducts: T[c,s]T, T[t,s]T, T[6-4]T, and T[Dewar]T. *J Biol Chem* **268**, 21301-21308.
- Riha, K., Heacock, M.L., and Shippen, D.E.** (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu Rev Genet* **40**, 237-277.
- Riha, K., Watson, J.M., Parkey, J., and Shippen, D.E.** (2002). Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in *Arabidopsis* mutants deficient in Ku70. *Embo J* **21**, 2819-2826.
- Rijkers, T., Van Den Ouweland, J., Morolli, B., Rolink, A.G., Baarends, W.M., Van Sloun, P.P., Lohman, P.H., and Pastink, A.** (1998). Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **18**, 6423-6429.
- Rosidi, B., Wang, M., Wu, W., Sharma, A., Wang, H., and Iliakis, G.** (2008). Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* **36**, 1610-1623.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H., and Lobrich, M.** (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**, 5706-5715.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H.** (2008a). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**, 229-257.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H.** (2008b). Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**, 229-257.
- Sanchez-Moran, E., Santos, J.L., Jones, G.H., and Franklin, F.C.** (2007). ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes Dev* **21**, 2220-2233.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P.** (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-514.
- Schild, D., Lio, Y.C., Collins, D.W., Tsomondo, T., and Chen, D.J.** (2000). Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* **275**, 16443-16449.
- Schlissel, M.S.** (2002). Does artemis end the hunt for the hairpin-opening activity in V(D)J recombination? *Cell* **109**, 1-4.
- Schommer, C., Beven, A., Lawrenson, T., Shaw, P., and Sablowski, R.** (2003). AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in Arabidopsis meiosis. *Plant J* **36**, 1-11.

- Scully, R., and Livingston, D.M.** (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* **408**, 429-432.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M.** (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* **88**, 265-275.
- Seigneur, M., Ehrlich, S.D., and Michel, B.** (2000). RuvABC-dependent double-strand breaks in dnaBts mutants require recA. *Mol Microbiol* **38**, 565-574.
- Selfridge, J., Hsia, K.T., Redhead, N.J., and Melton, D.W.** (2001). Correction of liver dysfunction in DNA repair-deficient mice with an ERCC1 transgene. *Nucleic Acids Res* **29**, 4541-4550.
- Sharan, S.K., and Kuznetsov, S.G.** (2007). Resolving RAD51C function in late stages of homologous recombination. *Cell Div* **2**, 15.
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A.** (1997a). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**, 804-810.
- Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A.** (1997b). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* **386**, 804-810.
- Sharples, G.J., and Leach, D.R.** (1995). Structural and functional similarities between the SbcCD proteins of Escherichia coli and the RAD50 and MRE11 (RAD32) recombination and repair proteins of yeast. *Mol Microbiol* **17**, 1215-1217.
- Shen, Z., Cloud, K.G., Chen, D.J., and Park, M.S.** (1996). Specific interactions between the human RAD51 and RAD52 proteins. *J Biol Chem* **271**, 148-152.
- Shinohara, A., and Shinohara, M.** (2004). Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet Genome Res* **107**, 201-207.
- 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.
- Shivji, M.K., and Venkitaraman, A.R.** (2004). DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA Repair (Amst)* **3**, 835-843.
- Shu, Z., Smith, S., Wang, L., Rice, M.C., and Kmiec, E.B.** (1999). Disruption of muREC2/RAD51L1 in mice results in early embryonic lethality which can be partially rescued in a p53(-/-) background. *Mol Cell Biol* **19**, 8686-8693.
- Siaud, N., Dray, E., Gy, I., Gerard, E., Takvorian, N., and Doutriaux, M.P.** (2004). Brca2 is involved in meiosis in *Arabidopsis thaliana* as suggested by its interaction with Dmc1. *EMBO J* **23**, 1392-1401.
- Siaud, N., Dubois, E., Massot, S., Richaud, A., Dray, E., Collier, J., and Doutriaux, M.P.** (2010). The SOS screen in *Arabidopsis*: a search for functions involved in DNA metabolism. *DNA Repair (Amst)* **9**, 567-578.
- Sigurdsson, S., Van Komen, S., Bussen, W., Schild, D., Albala, J.S., and Sung, P.** (2001). Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev* **15**, 3308-3318.
- Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., and de Lange, T.** (2002). DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol* **12**, 1635-1644.
- Soderhall, S., and Lindahl, T.** (1975). Mammalian DNA ligases. Serological evidence for two separate enzymes. *J Biol Chem* **250**, 8438-8444.
- Solinger, J.A., Kiianitsa, K., and Heyer, W.D.** (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol Cell* **10**, 1175-1188.

- Spampinato, C.P., Gomez, R.L., Galles, C., and Lario, L.D.** (2009). From bacteria to plants: a compendium of mismatch repair assays. *Mutat Res* **682**, 110-128.
- Stacey, N.J., Kuromori, T., Azumi, Y., Roberts, G., Breuer, C., Wada, T., Maxwell, A., Roberts, K., and Sugimoto-Shirasu, K.** (2006). Arabidopsis SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J* **48**, 206-216.
- Stamato, T.D., Weinstein, R., Giaccia, A., and Mackenzie, L.** (1983). Isolation of cell cycle-dependent gamma ray-sensitive Chinese hamster ovary cell. *Somatic Cell Genet* **9**, 165-173.
- Sturtevant, A.H.** (1915). Castle and Wright on Crossing over in Rats. *Science* **42**, 342.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., and Hoeijmakers, J.H.** (1998). Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* **2**, 223-232.
- Sugimoto-Shirasu, K., Stacey, N.J., Corsar, J., Roberts, K., and McCann, M.C.** (2002). DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in Arabidopsis. *Curr Biol* **12**, 1782-1786.
- Sugiyama, T., New, J.H., and Kowalczykowski, S.C.** (1998). DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6049-6054.
- Sunderland, P.A., West, C.E., Waterworth, W.M., and Bray, C.M.** (2006). An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **47**, 356-367.
- Sung, P.** (1997). Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem* **272**, 28194-28197.
- Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Hakem, R., Elia, A., Yoshida, R., Mo, R., Nishina, H., Chuang, T., Wakeham, A., Itie, A., Koo, W., Billia, P., Ho, A., Fukumoto, M., Hui, C.C., and Mak, T.W.** (1997). Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes Dev* **11**, 1242-1252.
- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., and Stahl, F.W.** (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**, 25-35.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S.** (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* **21**, 2858-2866.
- Takata, M., Tachiiri, S., Fujimori, A., Thompson, L.H., Miki, Y., Hiraoka, M., Takeda, S., and Yamazoe, M.** (2002). Conserved domains in the chicken homologue of BRCA2. *Oncogene* **21**, 1130-1134.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S.** (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J* **17**, 5497-5508.
- Tamura, K., Adachi, Y., Chiba, K., Oguchi, K., and Takahashi, H.** (2002). Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J* **29**, 771-781.
- Tan, T.L., Essers, J., Citterio, E., Swagemakers, S.M., de Wit, J., Benson, F.E., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R.** (1999). Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* **9**, 325-328.
- Tanaka, S., Ishii, C., Hatakeyama, S., and Inoue, H.** (2010). High efficient gene targeting on the AGAMOUS gene in an *Arabidopsis AtLIG4* mutant. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 289-293.

- Tarsounas, M., Davies, A.A., and West, S.C.** (2004). RAD51 localization and activation following DNA damage. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 87-93.
- Tebbs, R.S., Flannery, M.L., Meneses, J.J., Hartmann, A., Tucker, J.D., Thompson, L.H., Cleaver, J.E., and Pedersen, R.A.** (1999). Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol* **208**, 513-529.
- Thorslund, T., and West, S.C.** (2007). BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* **26**, 7720-7730.
- Thorslund, T., Esashi, F., and West, S.C.** (2007). Interactions between human BRCA2 protein and the meiosis-specific recombinase DMC1. *EMBO J* **26**, 2915-2922.
- Thorslund, T., McIlwraith, M.J., Compton, S.A., Lekomtsev, S., Petronczki, M., Griffith, J.D., and West, S.C.** (2010a). The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1263-1265.
- Thorslund, T., McIlwraith, M.J., Compton, S.A., Lekomtsev, S., Petronczki, M., Griffith, J.D., and West, S.C.** (2010b). The breast cancer tumor suppressor BRCA2 promotes the specific targeting of RAD51 to single-stranded DNA. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 1263-1265.
- Tian, M., Shinkura, R., Shinkura, N., and Alt, F.W.** (2004). Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Mol Cell Biol* **24**, 1200-1205.
- Timson, D.J., Singleton, M.R., and Wigley, D.B.** (2000a). DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutat Res* **460**, 301-318.
- Timson, D.J., Singleton, M.R., and Wigley, D.B.** (2000b). DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutat Res* **460**, 301-318.
- Tsubouchi, H., and Roeder, G.S.** (2002). The Mnd1 protein forms a complex with hop2 to promote homologous chromosome pairing and meiotic double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **22**, 3078-3088.
- Tsutakawa, S.E., and Cooper, P.K.** (2000). Transcription-coupled repair of oxidative DNA damage in human cells: mechanisms and consequences. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**, 201-215.
- Tsutsui, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Toh, H., and Shinagawa, H.** (2000). A recombination repair gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *rhp57*, is a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD57 gene and is phylogenetically related to the human XRCC3 gene. *Genetics* **154**, 1451-1461.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita T.** (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6236-6240.
- Tutt, A., Gabriel, A., Bertwistle, D., Connor, F., Paterson, H., Peacock, J., Ross, G., and Ashworth, A.** (1999). Absence of *Brca2* causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Curr Biol* **9**, 1107-1110.
- Umar, A., Buermeyer, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M., and Kunkel, T.A.** (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87**, 65-73.
- 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.
- Valencia, M., Bentele, M., Vaze, M.B., Herrmann, G., Kraus, E., Lee, S.E., Schar, P., and Haber, J.E.** (2001). NEJ1 controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **414**, 666-669.

- Valerie, K., and Povirk, L.F.** (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792-5812.
- van Attikum, H., Bundock, P., Overmeer, R.M., Lee, L.Y., Gelvin, S.B., and Hooykaas, P.J.** (2003). The Arabidopsis AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of Agrobacterium T-DNA. *Nucleic Acids Res* **31**, 4247-4255.
- van der Kemp, P.A., Thomas, D., Barbey, R., de Oliveira, R., and Boiteux, S.** (1996). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5197-5202.
- Van Dyck, E., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., and West, S.C.** (2001). Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. *EMBO Rep* **2**, 905-909.
- Wang, H., Perrault, A.R., Takeda, Y., Qin, W., and Iliakis, G.** (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* **31**, 5377-5388.
- Wang, H., Zeng, Z.C., Perrault, A.R., Cheng, X., Qin, W., and Iliakis, G.** (2001). Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **29**, 1653-1660.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G.** (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* **65**, 4020-4030.
- Wang, J.C.** (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 430-440.
- Wang, S., Durrant, W.E., Song, J., Spivey, N.W., and Dong, X.** (2010a). *Arabidopsis* BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22716-22721.
- Wang, S., Durrant, W.E., Song, J., Spivey, N.W., and Dong, X.** (2010b). *Arabidopsis* BRCA2 and RAD51 proteins are specifically involved in defense gene transcription during plant immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22716-22721.
- Wang, T.F., Kleckner, N., and Hunter, N.** (1999). Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13914-13919.
- Wang, Y.G., Nnakwe, C., Lane, W.S., Modesti, M., and Frank, K.M.** (2004). Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279**, 37282-37290.
- Wang, Y.K., Chang, W.C., Liu, P.F., Hsiao, M.K., Lin, C.T., Lin, S.M., and Pan, R.L.** (2010c). Ovate family protein 1 as a plant Ku70 interacting protein involving in DNA double-strand break repair. *Plant Mol Biol* **74**, 453-466.
- Waterworth, W.M., Kozak, J., Provost, C.M., Bray, C.M., Angelis, K.J., and West, C.E.** (2009). DNA ligase 1 deficient plants display severe growth defects and delayed repair of both DNA single and double strand breaks. *BMC Plant Biol* **9**, 79.
- Waterworth, W.M., Masnavi, G., Bhardwaj, R.M., Jiang, Q., Bray, C.M., and West, C.E.** (2010a). A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J* **63**, 848-860.
- Waterworth, W.M., Masnavi, G., Bhardwaj, R.M., Jiang, Q., Bray, C.M., and West, C.E.** (2010b). A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant J* **63**, 848-860.

- West, C.E., Waterworth, W.M., Jiang, Q., and Bray, C.M.** (2000). Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* **24**, 67-78.
- West, C.E., Waterworth, W.M., Story, G.W., Sunderland, P.A., Jiang, Q., and Bray, C.M.** (2002). Disruption of the Arabidopsis AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant J* **31**, 517-528.
- West, S.C.** (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 435-445.
- Willer, M., Rainey, M., Pullen, T., and Stirling, C.J.** (1999). The yeast CDC9 gene encodes both a nuclear and a mitochondrial form of DNA ligase I. *Curr Biol* **9**, 1085-1094.
- Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V., and Bartel, P.L.** (1997a). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem* **272**, 31941-31944.
- Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V., and Bartel, P.L.** (1997b). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2. *J Biol Chem* **272**, 31941-31944.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G.** (1995a). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-792.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G.** (1995b). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-792.
- Wyatt, M.D., and Pittman, D.L.** (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol* **19**, 1580-1594.
- Xia, F., Taghian, D.G., DeFrank, J.S., Zeng, Z.C., Willers, H., Iliakis, G., and Powell, S.N.** (2001). Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8644-8649.
- Xiao, Y., and Weaver, D.T.** (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **25**, 2985-2991.
- Xie, A., Kwok, A., and Scully, R.** (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 814-818.
- Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.L., Lee, W.H., and Pavletich, N.P.** (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**, 1837-1848.
- Yano, K., Morotomi-Yano, K., Wang, S.Y., Uematsu, N., Lee, K.J., Asaithamby, A., Weterings, E., and Chen, D.J.** (2008). Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO Rep* **9**, 91-96.
- Yin, Y., Cheong, H., Friedrichsen, D., Zhao, Y., Hu, J., Mora-Garcia, S., and Chory, J.** (2002). A crucial role for the putative Arabidopsis topoisomerase VI in plant growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10191-10196.
- Yoo, S., and Dynan, W.S.** (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* **27**, 4679-4686.
- Yoshida, K., Kondoh, G., Matsuda, Y., Habu, T., Nishimune, Y., and Morita, T.** (1998). The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* **1**, 707-718.

- Yu, D.S., Sonoda, E., Takeda, S., Huang, C.L., Pellegrini, L., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R.** (2003). Dynamic control of Rad51 recombinase by self-association and interaction with BRCA2. *Mol Cell* **12**, 1029-1041.
- Yu, V.P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L.A., van Gool, A.J., West, S.C., and Venkitaraman, A.R.** (2000a). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* **14**, 1400-1406.
- Yu, V.P., Koehler, M., Steinlein, C., Schmid, M., Hanakahi, L.A., van Gool, A.J., West, S.C., and Venkitaraman, A.R.** (2000b). Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev* **14**, 1400-1406.
- Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E., and Lee, E.Y.** (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res* **59**, 3547-3551.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kharbanda, S., Wang, R., Sung, P., Shinohara, A., Weichselbaum, R., and Kufe, D.** (1998). Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem* **273**, 3799-3802.
- Zhang, L., Tao, J., Wang, S., Chong, K., and Wang, T.** (2006). The rice OsRad21-4, an orthologue of yeast Rec8 protein, is required for efficient meiosis. *Plant Mol Biol* **60**, 533-554.
- Zhang, Y., Lim, C.U., Williams, E.S., Zhou, J., Zhang, Q., Fox, M.H., Bailey, S.M., and Liber, H.L.** (2005). NBS1 knockdown by small interfering RNA increases ionizing radiation mutagenesis and telomere association in human cells. *Cancer Res* **65**, 5544-5553.
- Zickler, D., and Kleckner, N.** (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* **32**, 619-697.
- Zickler, D., and Kleckner, N.** (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* **33**, 603-754.

Annexe

Annexe 1

Name	Gene	DNA sequence (5'-3')	Use
87	Gabi T-DNA o8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	genotyping
88	Salk T-DNA LBA1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	genotyping
721	AtBRCA2a (At4g00020/10)	GATTGTGCTCTGAATGCTAC	genotyping
722	AtBRCA2a (At4g00020/10)	CAATTTCTTTACCTTGAGGA	genotyping
797	AtBRCA2a (At4g00020/10)	GTTCTTTTGAAGCTTGCATGTGGATAGT	RT-PCR
798	AtBRCA2a (At4g00020/10)	CCAATTTCTTTACAGAAGCCTAGTCG	RT-PCR
328	AtBRCA2b (At5g01630)	GCTCTGAATATCAGTAAACCTGCT	genotyping and RT-PCR
404	AtBRCA2b (At5g01630)	TGTATCACACGATACAACAGACA	genotyping
799	AtBRCA2b (At5g01630)	TACAACAGACAAACCACCTGAAGCTTGCT	RT-PCR
177	AtKU80 ((At1g48050)	TGTCTTTTGCTTGTGTGCAG	genotyping
178	AtKU80 ((At1g48050)	GCAGAAGGTGCAAGGTCAAG	genotyping
456	AtKU80 ((At1g48050)	ATGGCACGAAATCGGGAGGGTTTG	RT-PCR
457	AtKU80 ((At1g48050)	ACGATCAAGAAAGTCTCCAGCTAC	RT-PCR
454	AtKU80 ((At1g48050)	GAAGATTAAGGTGTGGGTTATAAG	RT-PCR
455	AtKU80 ((At1g48050)	GTA AACGAATCAGGAGTATCATCTC	RT-PCR
458	AtKU80 ((At1g48050)	CAAGGAGAATCCAAAGTTGAAGAAGG	RT-PCR
459	AtKU80 ((At1g48050)	CGTCTACTATATCACTGTCCGCTG	RT-PCR
510	AtLIGASE6 (At1g66730)	TCATTGCAGAATTGCTAAGGG	genotyping
509	AtLIGASE6 (At1g66730)	GAAGACGCAGACTTCAACCTG	genotyping
637	AtLIGASE6 (At1g66730)	AGAGCACGCTTGTGGAGGG	RT-PCR
638	AtLIGASE6 (At1g66730)	TAAATTACGGGCCAATGTTCTAACAAG	RT-PCR
686	AtLIGASE6 (At1g66730)	GAGGGTGTCTGCTGCAGTAGTTGAGGCTTACAA	RT-PCR
640	AtLIGASE6 (At1g66730)	AAGAGCCAACAGCTGTTCTCCA	RT-PCR
641	AtLIGASE6 (At1g66730)	TTCATGGCTCAAGGTTAAGCGAGAT	RT-PCR
642	AtLIGASE6 (At1g66730)	GTTTGAGCATGAAACATCTCTGCGA	RT-PCR
Act-464	AtACT2 (At3g18780)	TGAGACCTTAACTCTCCCG	RT-PCR
Act-465	AtACT2 (At3g18780)	GATGGCATGAGGAAGAGAGA	RT-PCR
350	AtLIGASEIV (At5g57160)	AAA AAG AGC AGC AAC TGG ATT C	genotyping
351	AtLIGASEIV (At5g57160)	GAG CGG AGA AAA CTT TGG TTC	genotyping
336	AtLIGASEIV (At5g57160)	TTGCTGCTGAGGTATTGCAACGTAGAC	RT-PCR
445	AtLIGASEIV (At5g57160)	CCATCAAGGATACACTTGTCCACCAAT	RT-PCR
338	AtLIGASEIV (At5g57160)	aacctctatatacctggcgcttgt	RT-PCR
337	AtLIGASEIV (At5g57160)	tgctgccaaagtacttctccacctc	RT-PCR
446	AtLIGASEIV (At5g57160)	AAGACGTTTCTCCATTTGCTTTTCG	RT-PCR
521	AtLIGASEIV (At5g57160)	ccctgcacttAAGAGAGGAGAGAAAAAGAATGTC	cloning
522	AtLIGASEIV (At5g57160)	aaactgcagccCAGTATCAGACTCTTCCATATACTTAGG	cloning
446	AtLIGASEIV (At5g57160)	AAGACGTTTCTCCATTTGCTTTTCG	RT-PCR
89	AtERCC1 (At3g05210)	TTGAGGTTGAAAAGTCGGAAA	genotyping
90	AtERCC1 (At3g05210)	TATCGTTTCCAAATAACGGGC	genotyping
449	AtERCC1 (At3g05210)	GGCGCTTCTCAGTGCCCC	RT-PCR
450	AtERCC1 (At3g05210)	GATATGTTAAGAAGCGGGTTc	RT-PCR
452	AtERCC1 (At3g05210)	cccacagtcaagccaacgcac	RT-PCR
453	AtERCC1 (At3g05210)	acattctgcatgctccaggcac	RT-PCR
377	AtXRCC4 (At3g23100)	TTGTTGTCGAGAACTACCTCG	genotyping
378	AtXRCC4 (At3g23100)	AGCAAGAAGATCACTGTTGGG	genotyping
604	AtXRCC4 (At3g23100)	GACTCAAATCTTCGTCGACGACTTT	RT-PCR
605	AtXRCC4 (At3g23100)	tttttttaaaccaagaaggttgacaaacaat	RT-PCR
472	AtXRCC4 (At3g23100)	gggGAATTCatggtgaatcgagaaaacg	cloning
470	AtXRCC4 (At3g23100)	atGGATCCattagctccgtcagctctctt	cloning
215	AtXRCC4-like (At1g61410)	ACCGTTGTACAATAATGCCCC	genotyping
216	AtXRCC4-like (At1g61410)	GGTCTATGGTTTCTCCGATGC	genotyping
607	AtXRCC4-like (At1g61410)	tcaaggcaggggaatctctaa	RT-PCR
608	AtXRCC4-like (At1g61410)	CGCGCAAGGTGAAAACTATGC	RT-PCR
470	AtXRCC4-like (At1g61410)	atGGATCCattagctccgtcagctctctt	cloning
471	AtXRCC4-like (At1g61410)	gggGAATTCatggaggtaacaagaagccta	cloning
511	AtLIGASEI (At1g08130)	CAATTTGACCATGCTGTAGTG	genotyping
512	AtLIGASEI (At1g08130)	CCTTTCATTTCAACCCATACG	genotyping
625	AtLIGASEI (At1g08130)	cgtaattgaggagattcaaac	RT-PCR
626	AtLIGASEI (At1g08130)	caatttgcgaacgtatcgaacac	RT-PCR
627	AtLIGASEI (At1g08130)	gttgctgcgaaggttaatacattaa	RT-PCR

628	<i>AtLIGASEI</i> (At1g08130)	GATTGAGGCTGTCTCCAACCTC	RT-PCR
629	<i>AtLIGASEI</i> (At1g08130)	CATGCTTGACGAGCGGTCG	RT-PCR
630	<i>AtLIGASEI</i> (At1g08130)	gtcACCTTTGACTTCATTACTTGGA	RT-PCR
723	<i>AtLIGASEI</i> (At1g08130)	ggctcgagttagaTACCAAGTCTCCTTTAGAAGAGGCTGCAAAGATTG	cloning
724	<i>AtLIGASEI</i> (At1g08130)	ggaagcttgggtaccCGAGTGCTCAAAATCTGGAACGGAAGAATTTTC	cloning
515	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	GAAAGCAATGGATCACCTGTG	genotyping
516	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	TTGGTAGAACTGAGTCCCACG	genotyping
631	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	cccaaatcagatagggttacc	RT-PCR
632	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	CTTGATATTTGGGGGCggctta	RT-PCR
633	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	AGATACGCCACCGACTAGGG	RT-PCR
634	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	AGGCGAAGTGTATCAGCAACCT	RT-PCR
635	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	GGTACAGTCGAGATATTCAGTAGAC	RT-PCR
636	<i>AtLIGASEI-like</i> (At1g49250)	CTGGAAGACAAATCTGAAGCTCCA	RT-PCR
106	<i>AtRAD51</i> (At5g20850)	GGTTCCATCACGGAGTTATATGG	genotyping
107	<i>AtRAD51</i> (At5g20850)	AGCCATGATATTTCCACCAATC	genotyping
680	<i>AtMND1</i> (At4g29170)	TACGTGTGCTTTTCACCAGA	genotyping
682	<i>AtMND1</i> (At4g29170)	CATCAAACAGGATTTTCGCC	genotyping

Annexe 2

Milieu LB :

Extrait de trypsine de bactéries	10g
Extrait de levures	5g
NaCl	10g
H2O qsp	1L

Ajuster le pH à 7,0

Autoclavage à 121°C pendant 15 min

Milieu YPD :

Yeast Extract	10g/L
Bacto peptone	20g/L
H2O qsp	800ml

Autoclavage à 121°C pendant 15 minutes

Milieu SDA :

Dextrose	20g
Sulfate d'ammonium	5g
YNB	1,7g
H2O qsp	800ml
Agar	17g

Ajuster le pH à 5,8

Autoclavage 15 minutes à 121°C

Milieu MS 0,5 :

Select Agar	7g
MS	2,15g
H2O qsp	1L

Ajuster le pH à 5,8

Autoclavage 15 minutes à 121°C

Tampon pour électrophorèse TAE 1X :

Tris-acétate	0,004 mol/L
EDTA	0,001 mol/L

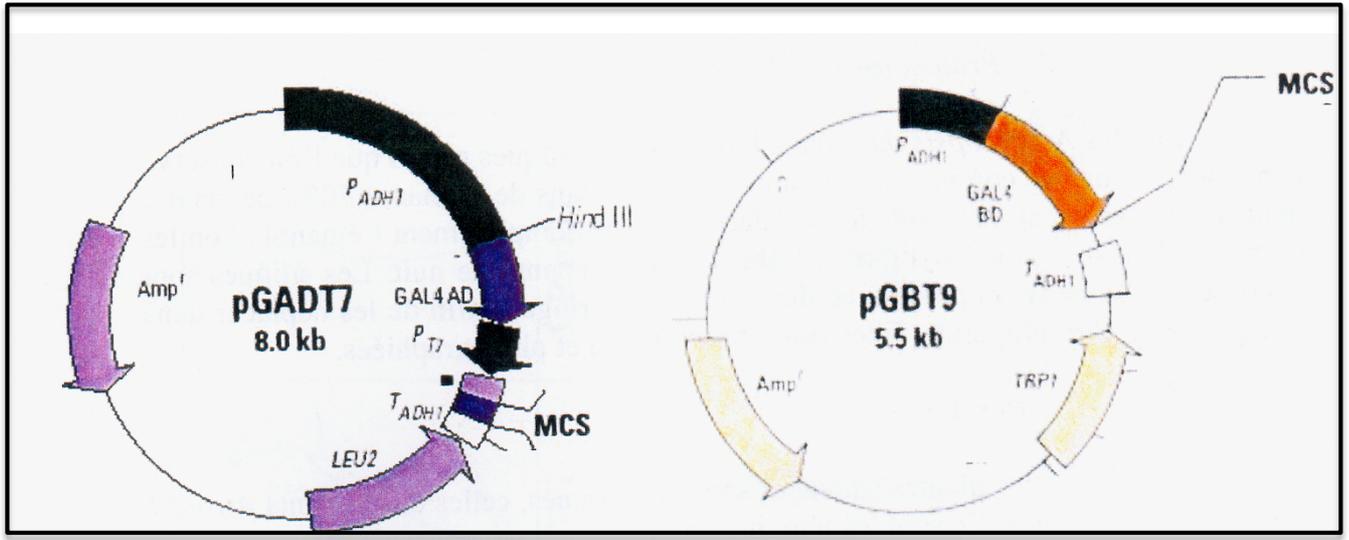
Gel d'agarose 0,7% :

Agarose	6,3g
BET	25 µl
TAE 1X qsp	900ml

Alexander

Ethanol	10 ml
Vert malachite (1% dans éthanol 95%)	1ml
Eau distillé	50ml
Glycérol	25 ml
Fuschine acide (1% dans l'eau)	5ml
Orange G (1% dans l'eau)	0,5ml
Acide acétique glacial	1 à 4 ml
Phénol	5g
Chloral hydrate (sigma)	5g

Annexe 3



Annexe 4

Gènes	AGI	Lignées	localisation insertion
<i>KU80</i>	At1g48050	S_112921 (612921)	intro 6
<i>LIGASE4</i>	At5g57160	S_044027	exon 6
<i>XRCC4</i>	At3g23100	S_128480	intron
<i>XRCC4-like*</i>	At1g61410	S_093939	exon (2)
<i>ERCCI</i>	At3g05210	S_033397	exon 3
<i>LIGASE-I</i>	At1g08130	S_013442	exon 12
<i>LIGASE - like</i>	At1g49250	S_026361	intron 2 Dom Nter
<i>LIGASE 6</i>	At1g66730	S_065307	exon 10 dom ATP dep DNA ligase

Dubest S et al., 2004,
Plant J

Résumé

En phase somatique, plusieurs mécanismes de réparations de l'ADN interviennent pour réparer les cassures double brin (CDB) de l'ADN. En phase méiotique, les CDB de l'ADN engendrées de façon programmées par Spo11 sont réparées par la recombinaison homologue (RH) dont les acteurs principaux sont Rad51 et Dmc1 aidés de Brca2. Chez *Arabidopsis*, en absence de Brca2, le déroulement méiotique est perturbé, les chromosomes ne s'associent pas en bivalents, ils apparaissent emmêlés. Ainsi, en absence de Brca2, la recombinaison homologue pourrait ne plus être fonctionnelle et les anomalies chromosomiques observées pourraient être le résultat de réparations aberrantes des CDB de l'ADN effectuée par d'autres mécanismes de réparation de l'ADN. Nous avons montrés, chez *Arabidopsis*, que le Non homologous End Joining (NHEJ) et/ou le Single Strand Annealing (SSA), mécanismes de réparation des CDB de l'ADN en phase somatique, n'intervenaient pas en phase méiotique dans la formation des anomalies observées en absence de Brca2. Toujours dans l'hypothèse où ces figures méiotiques soient le résultat de liaisons covalentes, nous avons regardé si les ADN-ligases ne pourraient pas être impliquées. Ainsi, nous avons pu montrer que la Ligase 6, ADN-ligase spécifique des plantes, n'avait pas de rôle dans les anomalies chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2. D'ailleurs la Ligase 6 ne semble pas non plus intervenir dans les figures chromosomiques observées chez les mutants *rad51* et *mdl1*. Le rôle de la Ligase 6 n'ayant pas été déterminé lorsque nous avons démarré ce travail, nous avons voulu identifier son rôle en étudiant le mutant correspondant. Le mutant *ligase 6* ne présente pas de sensibilité aux stress génotoxiques utilisés ce qui indique que la Ligase 6 ne semble pas intervenir dans la réparation de l'ADN. La mutation dans le gène *LIGASE I* est létal à l'état homozygote, de plus nous avons pu observer une ségrégation anormale chez l'hétérozygote mutant pour le gène *LIGASE I*. La létalité du mutant *ligase I* a été contournée par l'utilisation d'un système ARNi pour éteindre l'expression du gène *LIGASE I* uniquement en méiose. Cependant, l'implication de la Ligase I, dans les anomalies méiotiques observées en absence de Brca2 n'a pas pu être déterminée. Enfin, nous avons confirmé que, chez *Arabidopsis*, *Xrcc4* avait un rôle dans le NHEJ *via* son interaction avec la Ligase IV et *via* la sensibilité du mutant *xrcc4* à différents stress génotoxiques. En revanche, *Xrcc4-like* ne semble pas interagir avec les acteurs du complexe de ligation du NHEJ et le mutant ne présente pas de sensibilité aux stress génotoxique, indiquant que cette protéine n'est pas impliquée dans le NHEJ et plus généralement dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

Mots clés : *Arabidopsis*, réparation de l'ADN, Brca2, ADN-ligases, méiose.

In somatic cells, several mechanisms are involved in the repair of DNA double strand breaks (DSB). In meiotic cells, programmed DSBs are caused by Spo11 and repaired by homologous recombination (HR), whose main players are Rad51 and Dmc1 aided by Brca2. In *Arabidopsis*, in the absence of Brca2, meiosis is disturbed, chromosomes do not organize into bivalents, they appear stuck and entangled together. Thus, in the absence of Brca2, HR may be non-functional and the chromosomal anomalies we observe could result from the aberrant repair of the DNA DSBs due to other mechanisms of DNA repair. We have shown in *Arabidopsis* that the homologous end joining (NHEJ) and/or Single Strand Annealing (SSA), mechanisms of DNA DSB repair that are active in the somatic phase, were not involved in the formation of the meiotic anomalies observed in the absence of Brca2 in meiotic cells. Still assuming that these figures are the result of meiotic covalent bond, we checked whether DNA ligases could be involved. Thus, we have shown that Ligase 6, DNA ligase specific plants, had no role in the chromosomal abnormalities observed in meiosis in the absence of Brca2. Besides Ligase 6 does not seem to interfere with the meiotic figures observed in *rad51* and *mnd1* mutants. We wanted to identify the Ligase 6 role in studying its mutant. Ligase 6 mutant did not show sensitivity to genotoxic stress. The Ligase 6 does not seem to be involved in DNA repair. The lethality of the *ligase I* mutant was bypassed with a RNAi construct aimed at extinguishing the gene expression of *LIGASE I* at meiosis only. However, the involvement of Ligase I in the meiotic anomalies observed in the absence of Brca2 could not be determined. Finally, we confirmed that, in *Arabidopsis*, Xrcc4 has a role in NHEJ through its interaction with ligase IV and the sensitivity of the *xrcc4* mutant to different genotoxic stress. In contrast, Xrcc4-like does not appear to interact with players in the NHEJ ligation complex and the mutant shows no sensitivity to genotoxic stress. These results indicated that this protein is not involved in NHEJ and, more generally in the mechanisms of DNA repair.

Résumé

En phase somatique, plusieurs mécanismes de réparations de l'ADN interviennent pour réparer les cassures double brin (CDB) de l'ADN. En phase méiotique, les CDB de l'ADN engendrées de façon programmées par Spo11 sont réparées par la recombinaison homologue (RH) dont les acteurs principaux sont Rad51 et Dmc1 aidés de Brca2. Chez *Arabidopsis*, en absence de Brca2, le déroulement méiotique est perturbé, les chromosomes ne s'associent pas en bivalents, ils apparaissent emmêlés. Ainsi, en absence de Brca2, la recombinaison homologue pourrait ne plus être fonctionnelle et les anomalies chromosomiques observées pourraient être le résultat de réparations aberrantes des CDB de l'ADN effectuée par d'autres mécanismes de réparation de l'ADN. Nous avons montrés, chez *Arabidopsis*, que le Non homologous End Joining (NHEJ) et/ou le Single Strand Annealing (SSA), mécanismes de réparation des CDB de l'ADN en phase somatique, n'intervenaient pas en phase méiotique dans la formation des anomalies observées en absence de Brca2. Toujours dans l'hypothèse où ces figures méiotiques soient le résultat de liaisons covalentes, nous avons regardé si les ADN-ligases ne pourraient pas être impliquées. Ainsi, nous avons pu montrer que la Ligase 6, ADN-ligase spécifique des plantes, n'avait pas de rôle dans les anomalies chromosomiques observées en méiose en absence de Brca2. D'ailleurs la Ligase 6 ne semble pas non plus intervenir dans les figures chromosomiques observées chez les mutants *rad51* et *mnd1*. Le rôle de la Ligase 6 n'ayant pas été déterminé lorsque nous avons démarré ce travail, nous avons voulu identifier son rôle en étudiant le mutant correspondant. Le mutant *ligase 6* ne présente pas de sensibilité aux stress génotoxiques utilisés ce qui indique que la Ligase 6 ne semble pas intervenir dans la réparation de l'ADN. La mutation dans le gène *LIGASE I* est létal à l'état homozygote, de plus nous avons pu observer une ségrégation anormale chez l'hétérozygote mutant pour le gène *LIGASE I*. La létalité du mutant *ligase I* a été contournée par l'utilisation d'un système ARNi pour éteindre l'expression du gène *LIGASE I* uniquement en méiose. Cependant, l'implication de la Ligase I, dans les anomalies méiotiques observées en absence de Brca2 n'a pas pu être déterminée. Enfin, nous avons confirmé que, chez *Arabidopsis*, *Xrcc4* avait un rôle dans le NHEJ *via* son interaction avec la Ligase IV et *via* la sensibilité du mutant *xrcc4* à différents stress génotoxiques. En revanche, *Xrcc4*-like ne semble pas interagir avec les acteurs du complexe de ligation du NHEJ et le mutant ne présente pas de sensibilité aux stress génotoxique, indiquant que cette protéine n'est pas impliquée dans le NHEJ et plus généralement dans les mécanismes de réparation de l'ADN.

Mots clés : *Arabidopsis*, réparation de l'ADN, Brca2, ADN-ligases, méiose.

In somatic cells, several mechanisms are involved in the repair of DNA double strand breaks (DSB). In meiotic cells, programmed DSBs are caused by Spo11 and repaired by homologous recombination (HR), whose main players are Rad51 and Dmc1 aided by Brca2. In *Arabidopsis*, in the absence of Brca2, meiosis is disturbed, chromosomes do not organize into bivalents, they appear stuck and entangled together. Thus, in the absence of Brca2, HR may be no functional and the chromosomal anomalies we observe could result from the aberrant repair of the DNA DSBs due to other mechanisms of DNA repair. We have shown in *Arabidopsis* that the homologous end joining (NHEJ) and/or Single Strand Annealing (SSA), mechanisms of DNA DSB repair that are active in the somatic phase, were not involved in the formation of the meiotic anomalies observed in the absence of Brca2 in meiotic cells. Still assuming that these figures are the result of meiotic covalent bond, we checked whether DNA ligases could be involved. Thus, we have shown that 6 Ligase, DNA ligase specific plants, had no role in the chromosomal abnormalities observed in meiosis in the absence of Brca2. Besides the Ligase 6 does not seem to interfere with the meiotic figures observed in *rad51* and *mnd1* mutants. We wanted to identify the Ligase 6 role in studying its mutant. Ligase 6 mutant did not show sensitivity to genotoxic stress. The Ligase 6 does not seem to be involved in DNA repair. The lethality of the *ligase I* mutant was bypassed with a RNAi construct aimed at extinguishing the gene expression of *LIGASE I* at meiosis only. However, the involvement of Ligase I in the meiotic anomalies observed in the absence of Brca2 could not be determined. Finally, we confirmed that, in *Arabidopsis*, *Xrcc4* has a role in NHEJ through its interaction with ligase IV and the sensitivity of the *xrcc4* mutant to different genotoxic stress. In contrast, *Xrcc4*-like does not appear to interact with players in the NHEJ ligation complex and the mutant shows no sensitivity to genotoxic stress. These result indicated that this protein is not involved in NHEJ and, more generally in the mechanisms of DNA repair.